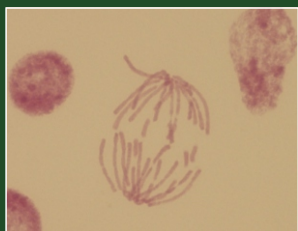


Różnorodność biologiczna

Rośliny i grzyby
– badania środowiskowe i laboratoryjne



pod redakcją
Andrzeja Bajguza
i **Iwony Ciereszko**

**Różnorodność biologiczna
– od komórki do ekosystemu.**

Rośliny i grzyby –
badania środowiskowe i laboratoryjne



Polskie Towarzystwo Botaniczne
Oddział w Białymstoku

**Różnorodność biologiczna
– od komórki do ekosystemu.**
Rośliny i grzyby –
badania środowiskowe i laboratoryjne

pod redakcją
Andrzeja Bajguza i Iwony Ciereszko

Białystok 2016

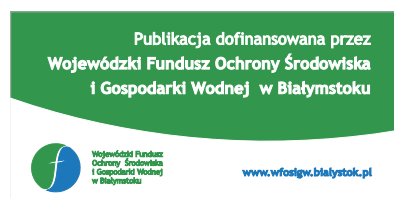
Redakcja naukowa

dr hab. **Andrzej Bajguz**, prof. UwB

dr hab. **Iwona Ciereszko**, prof. UwB

Recenzenci

prof. dr hab. **Emilia Brzosko**; prof. dr hab. **Wiesław Fałtynowicz**; prof. dr hab. **Andrzej Kornaś**;
prof. dr hab. **Andrzej Skoczowski**; dr hab. **Andrzej Bajguz**, prof. UwB; dr hab. **Iwona Ciereszko**,
prof. UwB; dr hab. **Danuta Drzymulska**; dr hab. **Katarzyna Jadwiszczak**; dr hab. **Mirosława Kupry-**
janowicz, prof. UwB; dr hab. **Grażyna Łaska**, prof. PB; dr hab. **Agnieszka Pietrosiuk**; dr hab. **Justyna**
Polit, prof. UŁ; dr hab. **Katarzyna Sykłowska-Baranek**; dr hab. **Adam Tylicki**; dr hab. **Małgorzata**
Wójcik; dr **Anna Matwiejuk**



Copyright © 2016 by: Polskie Towarzystwo Botaniczne – Oddział w Białymstoku.
Wszystkie prawa zastrzeżone

ISBN 978-83-62069-72-9

Korekta językowa:

Urszula Gliška

Projekt okładki:

Agencja Wydawnicza EkoPress / fot.: Andrzej Bajguz, Justyna Polit, Piotr Tałałaj

Redaktor techniczny:

Andrzej Poskrobko

Wydawca:

Agencja Wydawnicza EkoPress

601 311 838

Spis treści

Wstęp	7
1. Agnieszka Chmielnicka, Aneta Żabka, Konrad Winnicki, Janusz Maszewski, Justyna Polit , Podzielić czy powielić? O trudnych wyborach komórek roślinnych decydujących o wzroście i rozwoju całego organizmu	9
2. Iwona Ciereszko , Cukry jako regulatory wzrostu i rozwoju roślin	21
3. Iwona Rajewska, Andrzej Bajguz , Aminy biogenne, neurotransmitery zwierzęce u roślin	33
4. Barbara Bokina, Andrzej Bajguz , Zadziwiający świat roślin. Hormony owadzie – ekdysteroidy w roślinach	45
5. Katarzyna Ciąčka, Urszula Krasuska, Agnieszka Gniazdowska , Modyfikacja endogennego stężenia tlenu azotu w regulacji spoczynku nasion	61
6. Aleksandra Maria Staszak, Tomasz Andrzej Pawłowski , Proteomika nasion – w poszukiwaniu markerów spoczynku i kielkowania	73
7. Paweł Rogowski, Wioleta Wasilewska, Elżbieta Romanowska , Reakcja roślin C3, C4 i CAM na zmiany temperatury	87
8. Magdalena Trojak, Ernest Skowron, Tomasz Sobala , Rola modyfikacji aktywności cyklu ksantofilowego w podnoszeniu tolerancji roślin na stres cieplny ..	99
9. Aleksandra Koźmińska, Iwona Kamińska, Ewa Hanus-Fajerska , Rola osmolitów w tolerancji roślin na stres zasolenia	113
10. Alicja Piotrowska-Niczyporuk, Andrzej Bajguz , Rola metalotionein w adaptacjach roślin do stresu metali ciężkich	127
11. Ewa Oleńska, Wanda Małek , Zakres specyficzności gospodarza bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej pochodzącej ze starej hałdy Zn-Pb Bolesław oraz stanowiska kontrolnego	143
12. Adam Tylicki, Urszula Czyżewska, Magdalena Siemieniuk , Genetyczne i biochemiczne zróżnicowanie grzybów z rodzaju <i>Malassezia</i> ze szczególnym uwzględnieniem szczepów <i>Malassezia pachydermatis</i> od zdrowych i chorych zwierząt	155

13.	Zofia Tyszkiewicz, Grażyna Łaska , Dominacja gatunkowa grzybów glebowych w wybranym zbiorowisku grądu <i>Tilio-Carpinetum</i> z terenu Puszczy Białowieskiej w 2015 roku	167
14.	Anna Matwiejuk , Porosty Choroszczy w województwie podlaskim	177
15.	Izabela Tałałaj, Ada Wróblewska, Beata Ostrowiecka, Edyta Jermakowicz, Paweł Mirski, Emilia Brzosko , Inwazyjne rośliny zielne w Suwalskim Parku Krajobrazowym	191
16.	Grażyna Łaska, Aneta Sienkiewicz , Wpływ czynników abiotycznych środowiska przyrodniczego na stan zachowania populacji sasanki otwartej <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej	205
17.	Danuta Drzymulska , Holocenska sukcesja roślinności przybrzeżnej jeziora humusowego Suchar Zachodni (Wigierski Park Narodowy)	219
18.	Grażyna Łaska , Różnorodność biologiczna obszarów po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego w gminie Supraśl na terenie Puszczy Knyszyńskiej	231
19.	Karolina Ruraż , Rozmieszczenie i oddziaływanie nawłoci kanadyjskiej (<i>Solidago canadensis</i>) na stan zachowania muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej	245
20.	Michalina Panek , Murawy kserotermiczne w miejskim krajobrazie Sandomierza – bogactwo gatunkowe i zagrożenia	257
21.	Mirosława Kupryjanowicz, Magdalena Fiłoc, Anna Mordasewicz, Małgorzata Mach , Ocena palinologiczna wybranych polskich miodów odmianowych	269
22.	Alina Stankiewicz , Opinie uczniów szkół ponadgimnazjalnych z województwa podlaskiego na temat różnorodności biologicznej	285

Prezentowana Państwu monografia jest piątą pozycją wydawniczą cyklu poświęconego najnowszym osiągnięciom z zakresu badań nad bioróżnorodnością, prowadzonych na wszystkich poziomach organizacji życia roślin, grzybów i porostów – od komórki do ekosystemu. Motywem przewodnim cyklu jest wszechstronna analiza funkcjonowania roślin i grzybów w zmieniających się warunkach środowiska, uzyskana poprzez badania biochemiczne, cytologiczne, genetyczne, fizjologiczne, florystyczne, demograficzne oraz fitosocjologiczne. Poszczególne rozdziały monografii prezentują szeroki zakres zagadnień naukowych związanych z ekofizjologią, biochemią, biologią rozwoju roślin, ekologią populacji, fitosocjologią, florystyką i systematyką. Autorami rozdziałów są pracownicy uczelni krajowych, uznani badacze naukowci, w większości członkowie Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

W monografii omówione zostały szczegółowo różnorodne zagadnienia przedstawiane w świetle najnowszych badań, między innymi: mechanizmy regulacji komórkowego cyklu mitotycznego i endoreplikacji, sacharydy jako cząsteczki sygnałowe w komórkach roślinnych i ich rola w procesach wzrostu i rozwoju roślin, aktywność neurotransmiterów zwierzęcych i hormonów owadów (ekdysteroidów) występujących i działających w roślinach, rola tlenu azotu w regulacji spoczynku nasion, różnego rodzaju reakcje roślin na stres abiotyczny (temperatura, zasolenie, obecność metali ciężkich), rola zbiorowisk roślinnych występujących na terenach obszarów chronionych oraz na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Została również przedstawiona problematyka paleobotaniczna, dotycząca wpływu holocenijskiej sukcesji roślinności przybrzeżnej jezior oraz ocena palinologiczna próbek polskich miodów. Jeden z rozdziałów monografii poświęcono dydaktyce biologii, w którym zaprezentowano opinie uczniów szkół ponadgimnazjalnych województwa podlaskiego na temat bioróżnorodności.

Życząc Państwu miłej lektury, mamy nadzieję, że monografia przyczyni się do owocnej dyskusji, kontynuacji interdyscyplinarnych badań nad bioróżnorodnością lub określenia nowych interesujących kierunków badań w tym zakresie.

Na zakończenie chcielibyśmy serdecznie podziękować Recenzentom za nieodpłatne oceny artykułów – konstruktywne uwagi zawarte w recenzjach poszczególnych rozdziałów pozwoliły na uniknięcie błędów i nadanie ostatecznym wersjom w pełni naukowego wymiaru.

Andrzej Bajguz, Iwona Cierieszko

Białystok, grudzień 2016 r.

Podzielić czy powielić? O trudnych wyborach komórek roślinnych decydujących o wzroście i rozwoju całego organizmu

Agnieszka **Chmielnicka** / Aneta **Żabka** /
Konrad **Winnicki** / Janusz **Maszewski**, Justyna **Polit***

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Cytofizjologii

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

* e-mail: politj@biol.uni.lodz.pl

Streszczenie: Aby z jednej komórki macierzystej powstał dojrzały organizm roślinny zbudowany z wielu tkanek, zarówno ona sama, jak i powstałe z niej liczne pokolenia komórek siostrzanych, dokonują w trakcie swojego życia wyboru pomiędzy klasycznym cyklem podziałowym a endocyklem. O ile cykle mitotyczne służą zwielokrotnieniu liczby komórek w obrębie organizmu, o tyle przyczyny, dla których komórki rozpoczynają endoreplikację są różnorodne; nie zostały one dostatecznie poznane i pozostają nadal w sferze dyskusji. Na decyzję o wejściu komórki na jedną z obu możliwych dróg, bez wątpienia, znaczny wpływ wywiera zarówno środowisko wewnętrzne jej samej, otaczających tkanek czy organów, jak i środowisko zewnętrzne, w którym przyszło żyć całemu organizmowi roślinnemu. Mechanizm biochemiczny, z którego korzystają oba procesy, oparty jest na tych samych głównych cząsteczkach regulatorowych, a ich aktywność podlega odmiennemu sterowaniu w odpowiedzi na określone sygnały wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe. Wzajemne relacje białek enzymatycznych, regulatorowych i strukturalnych leżą nadal w centrum zainteresowania współczesnych badaczy.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, endomitoza, endoreplikacja, somatyczna poliploidyzacja

1. Wstęp

Modyfikowanie przebiegu klasycznego cyklu komórkowego, związane z pominięciem mitotycznej separacji chromosomów oraz cytokinezy i jednocześnie wejście na drogę prowadzącą do zwielokrotnienia zawartości jądrowego DNA, zapewnia homeostazę na poziomie organizmu. Eliminacja reguły pojedynczej rundy replikacyjnej w jednym cyklu komórkowym umożliwia realizację fizjologicznych wymagań poszczególnych typów komórek, tkanek i organów, prowadząc do ich rozwoju i różnicowania. Wzrost zawartości materiału genetycznego może odbywać się na drodze endocykli, określanych również mianem endoreplikacji, endoreduplikacji lub endoploidyzacji. Po kolejnych rundach endoreplikacji DNA, chromatydy siostrzane nie ulegają rozdzieleniu, nie następuje więc zwiększenie liczby chromosomów, lecz wzrost ploidalności jąder. W efekcie kolejnych cykli replikacji DNA, bez następstwa etapu segregacji chromatyd siostrzanych, mogą powstawać gigantyczne chromosomy politeniczne (Joubès, Chevalier 2000; Lee i in. 2009; De Veylder i in. 2011; Krawczyk, Wąsek 2011; Dante i in. 2014). Proces powielania materiału genetycznego, w wyniku którego chromatydy siostrzane ulegają rozdzieleniu i następuje wzrost liczby chromosomów w obrębie jądra otoczonego otoczką, określa się mianem cyklu endomitotycznego lub endomitozy (Fox, Duronio 2013). W cyklu endoreplikacyjnym, w którym odbywa się pełna replikacja genomu podstawowego, następuje zwiększenie zawartości DNA w postępie geometrycznym: $4C - 8C - 16C - 32C$ itd., a tym samym znaczny wzrost objętości jądra. Wzrost poziomu ploidalności może również dokonać się na drodze endoreplikacji niezupełnej. W takim procesie replikowana jest większa część genomu, natomiast pomijane są niewielkie fragmenty heterochromatynowe. W przeciwnej sytuacji, gdy w obrębie genomu replikacji ulegają tylko niewielkie odcinki DNA, proces taki nazywany jest amplifikacją (Krawczyk, Wąsek 2011; Galbraith 2014).

2. Występowanie endopoliploidyzacji u roślin

Proces endoreplikacji w królestwie roślin jest szeroko rozpowszechniony i ma charakter gatunkowo- lub tkankowo-specyficzny. Najczęściej występuje u okrytonasiennych (u około 90% gatunków), często również spotykany jest u paproci jednakozarodnikowych i mszaków oraz u różnych gatunków ramienic, natomiast rzadko pojawia się u zielenic (*Chlorophyta*), paprotników (*Pteridophyta*) i iglastych (*Coniferophytina*). Cykle endoreplikacyjne stanowią główny, niezbędny element programów rozwojowych i pojawiają się już we wczesnych etapach embriogenezy

w komórkach o wysokiej aktywności metabolicznej, tworzących tkanki troficzne, takie jak: liścienie, bielmo, haustoria bielmowe i wieszadełka, a ich liczba jest w nich z reguły większa niż w korzeniach, łodygach i liściach o co najmniej kilka rund endoreplikacji DNA (Nagl 1976a, b, 1993; Joubès, Chevalier 2000; Rewers, Sliwinska 2012; Sabelli i in. 2013). Proces endoreplikacji często pojawia się w organach związanych z rozmnażaniem płciowym, np. w woreczku zalążkowym w synergidach i antypodach oraz w tapetum pylnikowym. Jest on charakterystyczny również dla komórek, które przechodzą wyspecjalizowane różnicowanie, np. komórki włóśnikowe, komórki metaksylemu czy epidermy, komórki mięksiszowe oraz tarczki, manubria i komórki główkowate anterydiostanów ramienic (Kwiatkowska, Żylińska 1988; Joubès, Chevalier 2000; Sugimoto-Shirasu, Roberts 2003; Barow 2006). U roślin okrytozalążkowych endoreplikacja nie występuje z reguły w tkankach merystematycznych, komórkach macierzystych i w gametach, a u pewnych gatunków wyjątkowo nie występuje również w całych organach, np. w korzeniu u krasnokwiatu, tulipana czy lubczyka ogrodowego oraz w korzeniu i liściach kliwii czy amarylisu (Nagl 1978; Marciniak 1991a, b; Krawczyk, Wąsek 2011). Poziomy ploidalności różnią się również w poszczególnych organach i tkankach. Najczęściej obserwuje się wzrost poziomu endopoliploidalności w kierunku od zewnętrznych warstw tkanek organu do jego centrum, lub od wierzchołka do podstawy. Szczególnie widoczne jest to w owocach, gdzie komórki wewnętrznych warstw perykarpu mają wyższą zawartość DNA niż komórki warstw zewnętrznych. Podobnie w łodygach: poziom endopoliploidalności jest wyższy w komórkach rdzenia niż w komórkach kory, wyższy w komórkach kory niż w komórkach subepidermalnych i epidermalnych. W korzeniach komórki o największym stopniu poliploidalności mogą występować w warstwach środkowych i wewnętrznych walca osiowego lub obserwuje się brak wyraźnego gradientu ploidalności. W liściach endopoliploidalność zmniejsza się ku ich podstawom i w kierunku od mięksiszu do epidermy. W liścieniach, podobnie jak w bielmie, endoreplikacja jest często najwyższa w strefach centralnych. Rozpatrując pokrój całej rośliny, stopień poliploidalności jest najczęściej wyższy w liścieniach, ogonkach liściowych i dolnych liściach, niższy w organach kwiatowych i korzeniach, a bardzo niski w młodych liściach. Jednak w związku z tym, że maksymalny poziom poliploidalności jest podobny w korzeniach i liściach danego gatunku, można przypuszczać, że istnieje gatunkowo specyficzny potencjał endoreplikacyjny (Knake-Sobkowicz, Marciniak 2005; Barow 2006).

3. Rola procesu endopoliploidyzacji

Mimo powszechności zjawiska endopoliploidyzacji w świecie roślin, jego rola nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Istnieją różnorodne hipotezy próbujące tłumaczyć przyczyny, dla których komórki opuszczają klasyczny cykl komórkowy i wchodzi na drogę mniej lub bardziej licznych endocykli. Jedną z hipotez, przedstawioną w 1976 roku przez Naglę zakładała, że istnieje odwrotna korelacja pomiędzy podstawową zawartością jądrowego DNA a osiąganym przez komórkę stopniem endopoliploidalności (Nagle 1976a, b). W takiej sytuacji, endoreplikacji podlegałyby komórki tych gatunków, które posiadają niską podstawową zawartość DNA (2C około 1-3 pg), a zdolność do endoreplikacji stanowiłaby u nich ewolucyjną strategię, kompensując niski poziom filogenetycznie zdeterminowanej zawartości materiału genetycznego i służyłaby powielaniu nielicznych kopii poszczególnych genów, uczestniczących w różnicowaniu. Z kolei gatunki o wysokiej zawartości DNA, w wyniku osiągnięcia niezbędnej liczby kopii genów, nie musiałyby ich powielać na drodze endocyklu. Hipoteza ta oparta była na stosunkowo niewielkiej liczbie dowodów doświadczalnych, uzyskanych metodą cytofotometryczną, a proponowane zależności okazały się nie być powszechne. Na podstawie badań przeprowadzonych na ponad 100 gatunkach roślin dwu- i jednoliściennych, Olszewska i Osiecka (1982, 1983, 1984) wykazały, że dynamika endoreplikacji jądrowego DNA, wyrażona maksymalną wielokrotnością C w jądrach komórek zróżnicowanych, jest cechą rodziny. Wśród dwuliściennych najwyższą dynamiką endoreplikacji DNA charakteryzuje się rodzina *Brassicaceae*, najmniejszą – *Compositae* i *Ranunculaceae*; nie można zatem upatrywać zależności ewolucyjnej. Wśród jednoliściennych, najwyższą dynamikę endoreplikacji wykazują gatunki z rodziny *Gramineae*, najmniejszą – z rodziny *Amaryllidaceae* i *Iridaceae*. Ogólnie, gatunki z małymi genomami mają tendencje do osiągania wysokich stopni poliploidalności (np. *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae* i *Chenopodiaceae*), jednak niektóre gatunki o małych genomach nie wykazują lub wykazują niewielki stopień endopoliploidalności (np. *Rosaceae* i *Fagaceae*), a inne (np. *Alliceae*, *Fabaceae* i *Poaceae*) przejawiają endopoliploidalność pomimo dużych genomów (Olszewska, Osiecka 1982, 1983; Barow, Meister 2003). W obrębie tej samej rodziny, gatunki jednoroczne charakteryzują się większą dynamiką endoreplikacji niż byliny, drzewa i krzewy. Tylko wśród gatunków z tej samej rodziny i o tym samym typie cyklu życiowego występuje postulowana przez Naglę odwrotna zależność między zawartością 2C DNA a dynamiką endoreplikacji DNA. Endoreplikacja może być więc jednym ze sposobów na przyspieszenie wzrostu danego organu, a w konsekwencji – całej rośliny (Barow 2006). Endopoliploidyzujące komórki roślinne pomijają fazę G2 i mitozę,

a tym samym skracają czas trwania cyklu komórkowego o około 25%, gdyż nie formuje się w nich wrzeciono podziałowe, nie dochodzi do kondensacji i dekon-densacji chromosomów, rozpadu i rekonstrukcji otoczki jądrowej, a zarazem zmniejszone jest także zapotrzebowanie na materiały do budowy ścian komórko-wych. Ponadto, podczas endoreplikacji może być stale utrzymywany proces tran-skrypcji. Stąd, wzrost roślin zachodzący jednocześnie poprzez ekspansję komórek związaną z endopoliploidyzacją oraz przez podziały komórkowe, może być o wiele szybszy od wzrostu odbywającego się jedynie na drodze podziałów komórkowych. Potwierdzeniem dla powyższej roli endopoliploidyzacji jest o wiele częstsze wystę-powanie tego zjawiska u wymagających szybkiego wzrostu i rozwoju gatunków roślin zielnych (jednorocznych i dwuletnich), niż u roślin wieloletnich, głównie u drzew. Wynika z tego, że im więcej biomasy (w stosunku do biomasy początko-wej) roślina wytworzyć musi w czasie sezonu wegetacyjnego do etapu powstania nasion, tym większe jest prawdopodobieństwo wystąpienia u niej procesu endopo-liploidyzacji (Barow, Meister 2003; Barow 2006).

Z hipotezą Nagla polemizował Barlow (1978). Poparł on pogląd, że postulo-wana przez Nagla odwrotna zależność między zawartością 2C DNA a dynamiką endoreplikacji nie ma zastosowania w przypadku wielu grup taksonomicznych. Według hipotezy Barlowa, endoreplikacja umożliwia komórkom pełnienie tych funkcji, których nie są w stanie spełnić komórki diploidalne. Liczba cykli endore-plikacyjnych jest kontrolowana rozwojowo i środowiskowo. Badania procesów ontogenetycznych, w których pojawia się endopoliploidalność wykazują, że endo-replikacja ma miejsce wcześniej w rozwoju i jest ściśle związana z różnicowaniem komórek oraz z ich ekspansją. Dojrzałe komórki endoploidalne pochodzą od diplo-idealnych komórek merystematycznych i są z nimi połączone poprzez młodsze komórki siostrzane o niższych poziomach ploidyzacji. Taki model wzrostu i rozwo-ju stwarza liniowy ciąg komórek, w którym możliwe jest uzyskanie gradientu stężeń dla wielu składników i produktów komórkowych. Komórki o wysokich poziomach endoploidalności, pełniłyby w takim układzie funkcje regulatorowe i wpływały na aktywność sąsiadujących z nimi komórek diploidealnych (Barlow 1978).

Upatruje się także ważnej roli endoreplikacji w osiąganiu ostatecznej struktury tkanki lub organu, w nabywaniu odpowiedniego kształtu oraz rozmiaru. U roślin, wzrost przez podziały komórkowe ograniczony jest do stref merystematycznych, w których zachodzą one zgodnie z charakterystycznym wzorem pod względem płaszczyzny i czasu, pozwalającym na osiągnięcie optymalnej morfologii tkankowej. Do jej osiągnięcia i utrzymania w pozostałych strefach, potrzebna jest również utrata zdolności podziałowych, która charakteryzuje komórki endoploidalne. Odbywająca się w nich endoreplikacja pozwalałaby z jednej strony, na wybiórcze

zatrzymanie podziałów komórkowych, z drugiej zaś, wspierałaby różnorodność rozmiarów i kształtów poszczególnych komórek. Za taką hipotezą przemawiają badania oparte na blokowaniu procesu endoreplikacji w wyniku mutacji, które ujawniają pojawianie się anomalii rozwojowych (Barlow 1978; Kondorosi i in. 2000, 2005; Sako i in. 2010; Chevalier i in. 2011; Krawczyk, Wąsek 2011; Dante i in. 2014). Stanowisko to potwierdzają również badania Bramsiepe i in. (2010), które wykazały, że u *Arabidopsis*, w wyniku obniżenia poziomu endoreplikacji, można dokonać przekształcenia trichomów znajdujących się w zaawansowanym stadium różnicowania w płaskie komórki epidermy i odwrotnie, przywrócić właściwy przestrzenny pokrój włosków w wyniku wzmożenia procesu endoreplikacji.

Przez długi czas uważano, że zwiększenie rozmiarów komórek w wyniku endopoliploidyzacji następuje proporcjonalnie do zwielokrotnienia zawartości C DNA. Zależność ta nie jest jednak stała i w wielu przypadkach nie ma miejsca. Uważa się, że endoreduplikacja nie jest regulatorem ekspansji komórek, natomiast pozwala na zapewnienie odpowiedniej ilości DNA w celu przygotowania do rozległej ekspansji i przyszłego wzrostu masy tkanek. Poszczególne poziomy ploidalności pozwalają raczej osiągnąć określoną objętość, niż determinują końcowe rozmiary komórki, które ustalane są następnie przez inne czynniki. Wynika to z obserwacji zjawiska, w którym te same komórki, z tą samą zawartością DNA, mogą osiągać różne rozmiary, zależnie od środowiska (Inzé 2005; Krawczyk, Wąsek 2011). Być może, endoreplikacja ustala optymalny stosunek pomiędzy rozmiarem komórki a rozmiarem jądra. Komórki, które przeszły endoreplikację, przeważnie są większe niż porównywalne, które nie przeszły tego procesu. Sugeruje się, że duże komórki mają zdolność do szybszego zwiększania objętości niż mniejsze, co w przypadku szybko rosnących organów, np. nasion i owoców, może być korzystne (Bourdon i in. 2010; Chevalier i in. 2011; Bourdon i in. 2012). Według najbardziej powszechnej ostatnio hipotezy, endoreplikacji przypisuje się funkcję zwiększania aktywności metabolicznej komórek. Przyspieszenie metabolizmu wymaga większej ilości białek, których synteza z kolei zależy od wydajności transkrypcji. Uwidacznia się to szczególnie w trakcie dojrzewania owoców i nasion, kiedy to zachodzi synteza, polimeryzacja i gromadzenie materiałów zapasowych w miększu spichrzowym lub bielmie. Komórki tych tkanek są przeważnie wysoce poliploidalne, a zwielokrotnienie liczby alleli danego genu pozwala na wzrost poziomu transkrypcji i translacji, oraz syntezę ogromnych ilości białek zapasowych i skrobi w krótkim czasie i na ograniczonej powierzchni (Larkins i in. 2001; Mizukami 2001; Sabelli, Larkins 2009a, b; Rewers i in. 2009; Chevalier i in. 2011; Sabelli i in. 2013). Podobnie wysoką aktywnością transkrypcyjną charakteryzują się bardzo duże i wysoko poliploidalne komórki przystosowane do wiązania azotu w brodawkach korzeniowych

u roślin motylkowych. Aktywność translacyjna i transkrypcyjna może wzrastać z każdym podwojeniem genomu, więc aktywność metaboliczna wysoko poliploidalnej komórki może być funkcjonalnie równoważna aktywności wielu komórek diploidalnych (Mergaert i in. 2003; Inzé 2005; González-Sama i in. 2006; Chevalier i in. 2011).

Wzrost poziomu transkrypcji i translacji będący skutkiem endoreplikacji może mieć również zastosowanie w osłabianiu skutków mutacji, jakie gromadzą się w czasie życia rośliny. Wiele roślin w cyklu życiowym narażonych jest na działanie niesprzyjających czynników, których – ze względu na osiadły tryb życia – nie są w stanie uniknąć, a posiadanie wielokrotnych kopii genomu zapewnia zachowanie jego funkcjonalności. Możliwość uszkodzenia DNA stwarzana jest również poprzez nagromadzenie w komórce szkodliwych, końcowych produktów przemiany materii. Dlatego rośliny, nie mając możliwości ich usunięcia, gromadzą je w dużych, wyspecjalizowanych poliploidalnych komórkach w postaci kryształów (Inzé 2005; Inzé, De Veylder 2006; Krawczyk, Wąsek 2011). Adachi i in. (2011) wykazali, że w korzeniach *Arabidopsis* wczesne wystąpienie endoreplikacji jest indukowane poprzez pojawienie się dwuniciowych pęknięć DNA, co sugeruje, że rośliny zamieniają cykl komórkowy na endocykl w celu uniknięcia produkcji komórek potomnych zawierających błędne informacje genetyczne.

4. Endoreplikacja a czynniki środowiskowe

Endoreplikacja może stanowić mechanizm adaptacyjny do niesprzyjających warunków środowiskowych, umożliwiając wzrost w obecności czynników stresowych. Mechanizm kompensacyjnego wzrostu jest szczególnie ważny w warunkach ekstremalnych, które ograniczają podziały komórkowe, a nie blokują przestrzennej ekspansji komórek (Cookson i in. 2006; De Veylder i in. 2011). Czynniki środowiskowe z kolei, mogą wywierać wpływ na poziom endoreplikacji w komórkach roślin (Chevalier i in. 2011). Czynnikiem związanym z kontrolą poziomu ploidalności jest obecność lub brak światła. W epikotyli *Pisum sativum* oraz w hypokotyli *Arabidopsis thaliana* i *Brassica oleracea* hodowanych w ciemności, występuje jeden endocykl więcej niż u roślin hodowanych na świetle. Zwiększenie poliploidalności w siewkach może wpływać na zwiększenie wzrostu wydłużeniowego rośliny, a tym samym powodować szybsze osiągnięcie dostępu do światła. Jednak rośliny z zaburzeniami endocyklu również wydłużają się w ciemności, co sugeruje, że endoreplikacja może jedynie usprawniać proces wydłużania, a nie jest dla niego warunkiem bezwzględnie koniecznym. W liściach siewek *Arabidopsis thaliana*, hodowanych

przy zredukowanym oświetleniu, zaobserwowano z kolei spadek poliploidalności, co wskazuje, że światło może oddziaływać na endocykle w zróżnicowany sposób, zależny od organu czy tkanki (De Veylder i in. 2011; Krawczyk, Wąsek 2011). Poziom endoreplikacji warunkowany może być nie tylko natężeniem światła, ale również jego jakością. Światło czerwone oraz daleka czerwień hamują endoreduplikację w somatycznych zarodkach storczyków *Doritaenopsis* (Park i in. 2010), z kolei ekspozycja na UV-B indukuje endoreduplikację w komórkach epidermalnych otaczających włoski na liściach ogórka (Yamasaki i in. 2010). Z drugiej strony, endoreduplikacja może wzmacniać tolerancję na promieniowanie UV-B, ponieważ w porównaniu z diploidalnymi roślinami *Arabidopsis*, osobniki tetraploidalne są znacznie bardziej odporne na to promieniowanie (Hase i in. 2006).

Innym czynnikiem środowiskowym, związanym z poziomem endoploidalności, jest stan uwodnienia. U dzikiej odmiany *Arabidopsis* stres suszy wywołuje redukcję wielkości komórek i zawartości DNA, co w rezultacie skutkuje wytworzeniem mniejszych liści. U roślin transgenicznych, o podwyższonym poziomie endoreplikacji, obserwowano utrzymanie rozmiarów komórek i większy stopień ekspansji liści. Zatem wysokie poziomy poliploidalności są korzystne w warunkach deficytu wodnego dla stymulacji wzrostu organów i całych roślin (Cookson i in. 2006; De Veylder i in. 2011). Kolejnym czynnikiem, który może oddziaływać na proces endopoliploidyacji jest temperatura. Uważa się, że rośliny hodowane w niższych temperaturach, w wyniku zatrzymania podziałów komórkowych mogą przechodzić więcej cykli endoreplikacyjnych, wspomagających wzrost. Jednak istnieją pewne krytyczne zakresy temperatur (bardzo niskich i bardzo wysokich), przy których następuje spadek poziomu endoreplikacji (Joubès, Chevalier 2000; Barow 2006; Granier i in. 2007).

Zwielokrotniona zawartość DNA występuje również w miększu asymilacyjnym roślin realizujących metabolizm CAM (ang. *Crassulacean Acid Metabolism*), a więc narażonych zarówno na wysoką temperaturę, jak i na brak wody. Ze względu na warunki środowiskowe, rośliny CAM otwierają szparki i pobierają dwutlenek węgla głównie w nocy, magazynując go w formie związków pośrednich. O efektywności prowadzonej w ciągu dnia fotosyntezy, decyduje zarówno tempo, jak i ilość zmagazynowanego CO₂. Zatem zwielokrotnienie kopii genów związanych z tym procesem może przyczynić się do zwiększenia tempa transkrypcji oraz translacji, a tym samym do intensyfikacji procesów metabolicznych w określonych warunkach. Endoreplikacja może również stanowić sposób zabezpieczenia informacji genetycznej przed szkodliwymi czynnikami (Krawczyk, Wąsek 2011; Chevalier i in. 2011). Zdolność do przeprowadzenia endoreplikacji jest również konieczna do przeżycia w warunkach stresu solnego. W jądrach komórek kory pierwotnej korze-

ni *Sorghum bicolor*, poddanych działaniu stresu solnego, następuje znaczny wzrost poliploidalności, podczas gdy rośliny niezdolne do endoreplikacji nie radzą sobie z niesprzyjającymi warunkami środowiska (Ceccarelli i in. 2006).

U wielu roślin okrytonasiennych szeroko rozpowszechnionym zjawiskiem jest indukcja endoreplikacji przez obecne w środowisku mikroorganizmy symbiotyczne: bakterie wiążące azot – w przypadku tworzenia brodawek korzeniowych lub grzyby symbiotyczne – w przypadku mikoryzy. Endoreplikacja jest też uruchamiana w miejscu interakcji z patogenami, np. z mącznikiem (*Blumeria graminis*) lub nicieniami z rodziny *Heteroderidae* (mątwikowate). Zarówno symbiont, jak i pasożyt, zmieniają metabolizm i rozwój komórki w celu pozyskania substancji odżywczych. W pierwszej kolejności wyłączone zostają geny, których produkty wchodziły w skład układu obronnego rośliny. Następnie, przeprofilowana zostaje ekspresja genów cyklu komórkowego oraz genów, których produkty uczestniczą w transporcie i wzroście powierzchni ściany komórkowej. Indukowana infekcją poliploidyzaacja wywołuje zwiększenie ekspresji genów i nasilenie metabolizmu, a przejęcie kontroli nad transportem zapewnia stały dopływ substratów i produktów koniecznych dla rozwoju i reprodukcji patogenu lub organizmu symbiotycznego (Vinar-dell i in. 2003; Barow 2006; González-Sama i in. 2006; De Veylder i in. 2011; Krawczyk, Wąsek 2011).

Literatura

- Adachi S., Minamisawa K., Okushima Y., Inagaki S., Yoshiyama K., Kondou Y., Kaminuma E., Kawashima M., Toyoda T., Matsui M., Kurihara D., Matsunaga S., Umeda M., 2011. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 10004-10009.
- Barlow P.W., 1978. Endopolyploidy: towards an understanding of its biological significance. *Acta Biotheor.*, 27: 1-18.
- Barow M., 2006. Endopoliploidy in seed plants. *Bioessays*, 28: 271-281.
- Barow M., Meister A., 2003. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ.*, 26: 571-584.
- Bourdon M., Frangne N., Mathieu-Rivet E., Chevalier Ch., 2010. Endoreduplication and growth of fleshy fruits. [W:] Lüttge U., Beyschlag W., Büdel B., Francis D. (red.), *Progress in Botany*, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 71: 101-132.
- Bourdon, M., Pirrello, J., Cheniclet, C., Coriton, O., Bourge, M., Brown, S., Moïse A., Peypelut M., Rouyère V., Renaudin J.P., Chevalier C., Frangne N., 2012. Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth. *Development*, 139: 3817-3826.

- Bramsiepe J., Wester K., Weinl C., Roodbarkelari, F., Kasili, R., Larkin, J.C., Hülkamp M., Schnittger A., 2010. Endoreplication controls cell fate maintenance. *PLOS Genet.* 6:e1000996.
- Ceccarelli M., Santantonio E., Marmottini F., Amzallag G.N., Cionini P.G., 2006. Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. *Protoplasma*, 227: 113-118.
- Chevalier Ch., Nafati M., Mathieu-Rivet E., Bourdon M., Frangne N., Cheniclet C., Renaudin J-P., Gévaudant F., Hernould M., 2011. Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann. Bot.*, 107: 1159-1169.
- Cookson S.J., Radziejewski A., Granier C., 2006. Cell and leaf size plasticity in Arabidopsis: what is the role of endoreduplication? *Plant Cell Environ.*, 29: 1273-1283.
- Dante R.A., Larkins B.A., Sabelli P.A., 2014. Cell cycle control and seed development. *Front. Plant Sci.*, 5:493.
- De Veylder L., Larkin J.C., Schnittger A., 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.*, 16: 624-634.
- Fox D.T., Duronio R.J., 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*, 140: 3-12.
- Galbraith D.W., 2014. Endoreduplicative Standards for Calibration of Flow Cytometric C-Value Measurements. *Cytometry Part A*, 85A: 368-374.
- González-Sama A., Coba de la Peña T., Kevei Z., Mergaert P., Lucas M.M., de Felipe M.R., Kondorosi E., Pueyo J.J., 2006. Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19: 176-180.
- Granier Ch., Cookson S.J., Tardieu F., Muller B., 2007. Cell cycle and environmental stresses. [W:] Inzé D. (red.), *Cell cycle control and plant development*. Blackwell Publishing UK, USA Australia. 32: 335-351.
- Hase Y., Trung K.H., Matsunaga T., Tanaka A., 2006. A mutation in the uvi4 gene promotes progression of endoreduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *Plant J.*, 46: 317-326.
- Inzé D., 2005. Green light for the cell cycle. *EMBO J.*, 24: 657-662.
- Inzé D., De Veylder L., 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Ann. Rev. Genet.*, 407: 77-105.
- Joubès J., Chevalier C., 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 43: 735-745.
- Knake-Sobkowicz S., Marciniak K., 2005. Cellular accumulation of protein bodies and changes in DNA ploidy level during seed development of *Lathyrus tuberosus* L. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 47: 147-157.

- Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E., 2000. Plant cell size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 488-492.
- Kondorosi E., Redondo-Nieto M., Kondorosi A., 2005. Ubiquitin-mediated proteolysis: to be in the right place at the right moment during nodule development. *Plant Physiol.*, 137: 1197-1204.
- Krawczyk J., Wąsek I., 2011. Endoreduplikacja jako jeden z mechanizmów zmiany ilości jądrowego DNA w komórce roślinnej. *Wiad. Bot.*, 55: 7-22.
- Kwiatkowska M., Żylińska K., 1988. Ultrastructural and autoradiographic studies of non-generative cells in the antheridium of *Chara vulgaris* L. III. Shield cells. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 26: 225-235.
- Larkins B.A., Dilkes B.P., Dante R.A., Coelho M., Woo Y., Liu Y., 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J. Exp. Bot.*, 52: 183-192.
- Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J., 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Gene. Dev.*, 23: 2461-2477.
- Marciniak K., 1991a. DNA endoreplication level in endosperm and in cotyledons during seed development in three dicotyledonous species. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 60: 273-284.
- Marciniak K., 1991b. DNA endoreplication level in endosperm during seed development in three dicotyledonous species. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 62: 143-147.
- Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E., 2003. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.*, 132: 161-173.
- Mizukami Y., 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 533-539.
- Nagl W., 1976a. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature*, 261: 614-615.
- Nagl W., 1976b. Early embryogenesis of in *Tropaeolum majus* L.: Evolution of DNA content and polyteny in the suspensor. *Plant Sci. Lett.*, 7: 1-6.
- Nagl W., 1978. Endoploidy and polyteny in differentiation and evolution: towards an understanding of quantitative and qualitative variation of nuclear DNA in ontogeny and phylogeny. North Holland Publishing Company.
- Nagl W., 1993. Induction of high polyploidy in *Phaseolus* cell cultures by the protein kinase inhibitor, K-252a. *Plant Cell Rep.*, 12: 170-174.
- Olszewska M.J., Osiecka R., 1982. The relationship between 2C DNA content, life cycle type, systematic position, and the level of DNA endoreplication in nuclei of parenchyma cells during growth and differentiation of roots in some monocotyledonous herbaceous species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 177: 319-336.

- Olszewska M.J., Osiecka R., 1983. The relationship between 2C DNA content, life cycle type, systematic position, and the level of DNA endoreplication in parenchyma nuclei during growth and differentiation of roots in some dicotyledonous herbaceous species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 178: 581-599.
- Olszewska M.J., Osiecka R., 1984. The relationship between 2C DNA content, systematic position and level of DNA endoreplication during differentiation of root parenchyma in dicot shrubs and trees. Comparison with herbaceous species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 179: 641-657.
- Park S.Y., Yeung E.C., Paek K.Y., 2010. Endoreduplication in *Phalaenopsis* is affected by light quality from light-emitting diodes during somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol. Rep.*, 4: 303-309.
- Rewers M., Sadowski J., Sliwinska E., 2009. Endoreduplication in cucumber (*Cucumis sativus*) seeds during development, after processing and storage, and during germination. *Ann. Appl. Biol.*, 155: 431-438.
- Rewers M., Sliwinska E., 2012. Endoreduplication intensity as a marker of seed developmental stage in the *Fabaceae*. *Cytometry*, 81: 1067-1075.
- Sabelli P.A., Larkins B.A., 2009a. The contribution of cell cycle regulation to endosperm development. *Sex. Plant Reprod.*, 22: 207-219.
- Sabelli P.A., Larkins B.A., 2009b. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol.*, 149: 14-26.
- Sabelli P.A., Liu Y., Dante R.A., Lizarraga L.E., Nguyen H.N., Brown S.W., Klingler J.P., Yu J., LaBrant E., Layton T.M., Feldman M., Larkins B.A., 2013. Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: E1827-E1836.
- Sako K., Maki Y., Imai K., Aoyama T., Goto D., Yamaguchi J., 2010. Control of endoreduplication of trichome by RPT2a, a subunit of the 19S proteasome in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.*, 123: 701-706.
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts K., 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 544-553.
- Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A., Kevei Z., Horvath G., Kelemen Z., Tarayre S., Roudier F., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E., 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell*, 15: 2093-2105.
- Yamasaki S., Shimada E., Kuwano T., Kawano T., Noguchi N., 2010. Continuous UV-B irradiation induces endoreduplication and peroxidase activity in epidermal cells surrounding trichomes on cucumber cotyledons. *J. Radiat. Res.*, 51: 187-196.

Iwona Ciereszko*

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Fizjologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
* e-mail: icier@uwb.edu.pl

Streszczenie: Cukrowce pełnią ważne funkcje w życiu roślin: są substancjami budulcowymi, zapasowymi, substratami reakcji oddechowych, metabolitami pośrednimi procesów biochemicznych; są transportowane na duże odległości. Cukry mogą pełnić rolę ochronną przed czynnikami stresowymi, np. jako osmoprotektanty. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na regulacyjną rolę cukrów. Glukoza, sacharoza lub trehalozo-6-fosforan (Tre6P) mogą regulować szereg procesów wzrostowych i metabolicznych, działając niezależnie od podstawowych funkcji, mogą być także cząsteczkami sygnałowymi. Zmiany stężenia cukrów, składu jakościowego oraz transportu następują stale w tkankach roślin – zachodzą zarówno w ciągu doby, jak i w czasie kolejnych etapów rozwoju. Rośliny wykształciły sprawny system percepcji i przekazywania sygnałów wywołanych obniżeniem lub podwyższeniem dostępu cukrów. Niewielkie zmiany ich stężenia wpływają na podziały komórkowe, proces kiełkowania, wzrost wegetatywny, zakwitanie oraz starzenie roślin, niezależnie od funkcji metabolicznych. Mechanizmy regulacji wzrostu roślin, w zależności od dostępu cukrów, są aktualnie poznawane. W skład systemu stymulującego procesy wzrostowe roślin wchodzi heksokinaza, jako sensor glukozowy, Tre6P oraz kinaza białkowa TOR; brak trehalozo-6-fosforanu lub kinazy TOR hamuje, między innymi, wzrost roślin i przejście do fazy generatywnej. Uważa się, że system hamujący procesy wzrostowe roślin składa się z kinaz białkowych SnRK1 oraz czynników transkrypcyjnych C/S1 bZIP; przy czym indukcja SnRK1 lub C/S1 bZIP najczęściej hamuje wzrost roślin. Drogi transdukcji sygnałów wywołanych przez cukry, współdziałają ze szlakami hormonalnymi i szlakami odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych, tworząc w komórkach roślinnych złożoną sieć komunikacyjno-sygnałową, precyzyjnie kontrolującą procesy wzrostowe i rozwojowe roślin.

Słowa kluczowe: glukoza, heksokinaza, hormony, receptory, sacharoza, transdukcja

1. Wstęp

Cukrowce w tkankach roślinnych wytwarzane są przede wszystkim z trioza-fosforanów powstałych podczas fotosyntezy zachodzącej w liściach. Sacharoza i skrobia, powstałe jako końcowe produkty fotosyntezy, mogą być czasowo magazynowane w liściach, jednak większość puli sacharozy jest odtransportowana do niewytwarzających cukrów tkanek akceptorowych. Podstawowe funkcje cukrowców w tkankach roślin są dobrze znane. Cukry pełnią funkcje budulcowe, strukturalne, są substratami reakcji oddechowych, metabolitami pośrednimi wielu procesów biochemicznych. Cukry są transportowane również na duże odległości, są także substancjami zapasowymi (Ciereszko 2006; Starck 2008). Cukry mogą pełnić rolę ochronną przed czynnikami stresowymi, np. jako osmoprotektanty. Zmiany stężenia cukrów, składu jakościowego oraz zmiany transportu następują w tkankach roślin w ciągu doby oraz podczas kolejnych etapów rozwojowych. Pod koniec fotoperiodu obserwowana jest najczęściej kumulacja skrobi asymilacyjnej w liściach, w postaci ziaren skrobiowych. Zwiększone zapotrzebowanie na cukry wykazują wierzchołki wzrostu pędu i korzenia oraz pąki kwiatowe, a następnie rozwijające się owoce i nasiona. Nagromadzanie cukrowców obserwuje się także w warunkach stresu chłodu, suszy, niedoboru fosforu czy w wyniku ataku patogenów (Ciereszko 2006, 2009; Starck 2008; Keunen i in. 2013; Morkunas, Ratajczak 2014; Łukaszyk, Ciereszko 2015). Wyniki badań opublikowane w ostatnich latach wykazały, że cukry mogą regulować szereg procesów wzrostowych, rozwojowych i metabolicznych, działając niezależnie od podstawowych funkcji (Koch 2004; Gibson 2005; Smeekens i in. 2010; van den Ende 2014). Cukry, w stężeniu milimolarnym, wpływają regulująco na niektóre etapy cyklu komórkowego, różnicowania komórek, na wzrost wegetatywny, tworzenie organów, zakwitanie, formowanie owoców, aż po starzenie (ryc. 1). Rośliny, monitorując poziom cukrów w tkankach, wykształciły sprawne systemy percepcji i transdukcji sygnałów wywołanych obniżeniem lub podwyższeniem dostępu cukrów. Dzięki ich funkcjonowaniu, cukry wywołują odpowiednie reakcje na poziomie komórki, wpływają na ekspresję licznych genów oraz procesy metaboliczne i wzrostowe (Price i in. 2004; Rolland i in. 2006; Kunz i in. 2014; Lastdrager i in. 2014; Sheen 2014; Figueroa, Lunn 2016).

Cukry mogą pełnić funkcje cząsteczek sygnałowych: sygnał natury chemicznej odbierany jest przez receptory, a następnie przekazywany przez specyficzne przekaźniki, wywołując odpowiednią reakcję rośliny (na poziomie komórki). Cząsteczkami sygnałowymi i regulatorowymi są różnorodne cukry; u roślin badano jednak najczęściej wpływ glukozy, sacharozy, trehalozy oraz niektórych fosforanów (Tre6P). Pierwsze prace doświadczalne wskazujące na regulatorowe/sygnałowe funk-

cje cukrów zaczęły się pojawiać w latach 90. XX wieku. Obecnie sygnałna i regulatorowa funkcja cukrów jest obszernie udokumentowana (m.in. Koch 2004; Price i in. 2004; Rolland i in. 2006; Chen 2007; Ciereszko 2007; Lastdrager i in. 2014; Sheen 2014). Celem niniejszego artykułu jest dokonanie przeglądu aktualnych doniesień dotyczących regulatorowej roli cukrów oraz wybranie danych dotyczących regulacji różnorodnych etapów wzrostu roślin, pod kątem informacji przydatnych botanikom i fizjologom roślin.

2. Procesy regulowane u roślin przez cukry

Zmiany stężenia cukrów, nawet niewielkie, mogą wpływać na kiełkowanie i wzrost siewek roślin (ryc. 1). Wykazano, że obecność glukozy w podłożu, o stężeniu powyżej 6%, znacząco obniżało kiełkowanie nasion i rozwój siewek *Arabidopsis thaliana*, niezależnie od zmian potencjału osmotycznego (takie same stężenia manitolu nie wpływały na kiełkowanie). Przykładem niezależnego oddziaływania cukrów był także hamujący wpływ glukozy (25 mM), która obniżała syntezę α -amylazy – enzymu degradującego skrobię zapasową w kiełkujących nasionach jęczmienia (prace cyt. w: Ciereszko 2002; Gibson 2005).



Rycina 1. Procesy wzrostowe i metaboliczne roślin regulowane przez cukry

Źródło: opracowanie własne

Cukry mogą wpływać na poszczególne etapy cyklu komórkowego roślin. Deficyt sacharozy prowadzi do indukcji punktów kontrolnych PCP1 i PCP2, które blokują cykl komórkowy w fazie G1 i G2 (prace cyt. w: Polit, Ciereszko 2009). Blokada cyklu jest procesem odwracalnym, wzbogacenie pożywki w sacharozę uruchamiało aktywność replikacyjną i mitotyczną, z około 12-godzinnym opóźnieniem (Polit, Ciereszko 2009). Czas ten może być modulowany przy pomocy regulatorów wzrostu. Fitohormony, wraz z sacharozą, podane komórkom zablokowanym w PCP przyspieszają wznowienie replikacji (cytokinina) lub opóźniają (auksyna) (prace cyt. w: Polit, Ciereszko 2009). Ostatnie badania wykazały, że cukry (wraz z auksyną) regulują ekspresję cyklin typu D (CYCD) podczas fazy G1 (Wang, Ruan 2013). Zaktywowany (ufosforylowaniem) kompleks CYCD z CDKA uczestniczy w uwolnieniu innego kompleksu: E2F-DP, który stymuluje transkrypcję genów fazy S. Ponadto obecność cukrów uaktywnia kinazę TOR, która przyłącza resztę fosforanową do S6K (**S6 kinase**). Zaktywowana S6K oddziałuje na kompleks CDKA-CYCD oraz RBR1-E2FB, podczas fazy S, w wyniku czego następuje wzrost elongacyjny komórki (Wang, Ruan 2013; Xiong, Sheen 2014).

Cukry wpływają na wzrost, wytwarzanie i metabolizm liści, pędów, korzeni lub innych akceptorów. W liściach zmiany poziomu glukozy lub sacharozy wpływają głównie na intensywność fotosyntezy i eksport asymilatów (wyższe stężenie cukru obniża fotosyntezę), podczas gdy w korzeniach zmiany transportu i stężenia cukrów oddziałują głównie na metabolizm oddechowy i magazynowanie (Ciereszko 2006). Trehaloza (25 mM) hamowała wydłużanie korzeni w siewkach *Arabidopsis*, natomiast sacharoza nie miała wpływu na ten proces (Figuerola, Lunn 2016). Cukry mogą wpływać na strukturę lub ruchy organelli komórkowych (van Dingenen i in. 2016). Podanie sacharozy zmieniało morfologię, wielkość i liczbę chloroplastów w komórkach liści rozetowych *Arabidopsis* (po dostarczeniu do podstawy liścia lub części wierzchołkowej), obserwowano wówczas mniejsze i nieregularne plastydy w komórkach mezofilu. Wskazuje to na funkcję chloroplastów w regulacji zwiększania powierzchni liścia, zależnej od cukrów/sacharozy (van Dingenen i in. 2016).

Przyjęto, od lat 30. XX w., że zjawisko dominacji wierzchołkowej uwarunkowane jest transportem auksyn z miejsca wytwarzania, merystemu wierzchołkowego pędu głównego, do korzenia. Ostatnie badania wskazują na cukry i ich transport jako czynniki decydujące o rozwoju pędów bocznych (Mason i in. 2014; Barbier i in. 2015). Zmiany w transporcie/zawartości sacharozy w pąkach bocznych grochu, po usunięciu pędu głównego, zachodziły znacznie wcześniej (po 4-6 godz.) nim rejestrowano zmianę stężenia auksyny (po ok. 24 godz.). Autorzy zasugerowali, że dominacja wierzchołkowa jest wynikiem zwiększonego zapotrzebowania pędu

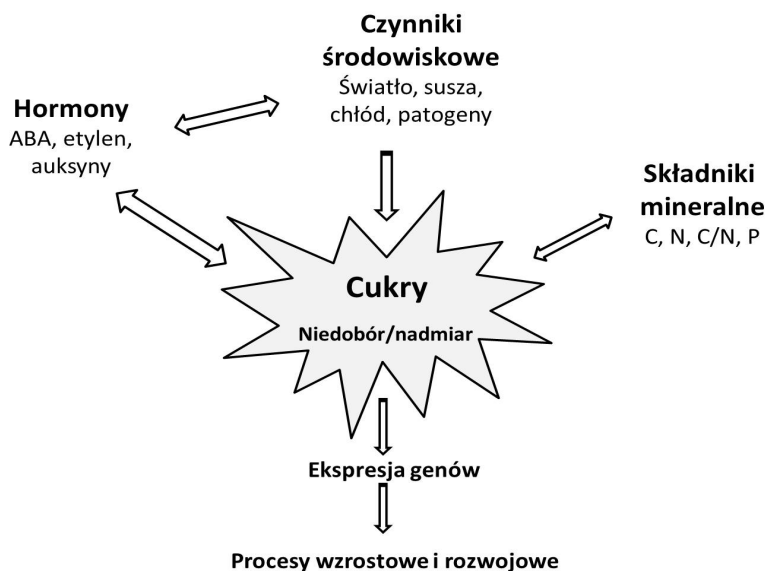
głównego na cukry, co limituje dostępność cukrów dla rozwoju pędów bocznych. Stwierdzono, że BRC1 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w hamowanie rozwoju pędów bocznych, jego ekspresja zależy, między innymi, od cytokinin i strigolaktonów. Wykazano, że egzogenne podana sacharoza powoduje inhibicję ekspresji *BRC1*, podobną do tej po dekapitacji wierzchołka pędu (Mason i in. 2014).

Na dalsze odległości, floemem, transportowana jest głównie sacharoza (lub rafinoza czy stachioza). Jednak rośliny z rodzin: *Ranunculaceae* i *Papaveraceae* transportują floemem glukozę, która stanowi ponad 80% cukrów w soku floemowym (cyt. w: Starck 2008). Odkryto ponadto nowe transportery błonowe cukrów, SWEET, które, między innymi, z symporterem H^+ /sacharozy uczestniczą w procesie załadunku floemu (Eom i in. 2015). Stwierdzono, że zlokalizowany w plazmolemie AtSWEET4 jest transporterem heksoz; zablokowanie genu *AtSWEET4* obniżało wzrost *A. thaliana*, a nadekspresja tego genu powodowała powiększenie średnicy i masy rozety liściowej (Liu i in. 2016). Cukry, jako asymilaty, są niezbędne do inicjacji zakwitania (Matsoukas 2014), a badania z ostatnich lat wskazują na regulacyjną rolę sacharozy oraz miRNA156 i Tre6P w kontroli procesu kwitnienia (Yu i in. 2015).

Cukry wpływają na proces starzenia się roślin. Opublikowane dane wskazują, że starzenie może być indukowane zarówno deficytem (Morkunas i in. 2012), jak i nadmiarem cukrów (Pourtau i in. 2006). Wykazano, że w liściach *Arabidopsis* podczas starzenia (żółknięcia) była nagromadzana glukoza i fruktoza oraz silnie był indukowany marker starzenia SAG12 (Pourtau i in. 2006). Mutant *gin2* (z obniżoną wrażliwością na glukozę) nie akumulował heksoz, a starzenie było opóźnione, wskazuje to na związek procesów starzenia z wrażliwością na cukry. Efekt glukozy był ponadto stymulowany w warunkach obniżonego żywienia azotowego roślin (Pourtau i in. 2006).

Regulacja procesów wzrostowych i metabolicznych przy udziale cukrów następuje najczęściej poprzez zmiany w ekspresji genów. Badania z zastosowaniem mikromacierzy DNA wykazywały zarówno stymulację, jak i obniżenie ekspresji kilkuset różnych genów, w tym regulację czynników transkrypcyjnych (Price i in. 2004). Geny regulowane przez glukozę biorą udział we wszystkich procesach metabolicznych i wzrostowych roślin oraz odpowiedziach na czynniki stresowe (Sheen 2014). Kontrola ekspresji genów przez cukry może następować na poziomie transkrypcji, poprzez modyfikacje potranskrypcyjne, na poziomie translacji (np. kontrola syntezy czynników transkrypcyjnych bZIP grupy S przez sacharozę) lub poprzez regulację potranslacyjną (np. modyfikacje reszt aminokwasów). Regulacyjna rola cukrów wynika także z powiązań dróg sygnałnych z hormonalnymi oraz

z metabolizmem azotowym (ryc. 2) (Moore i in. 2003; Ciereszko 2006; Matsoukas 2014; Ljung i in. 2015). Cukry wpływają na syntezę i przemieszczanie niektórych fitohormonów (m.in. ABA i giberelin), natomiast hormony mogą regulować metabolizm cukrowców. Stwierdzono, że glukoza zwiększa stężenie prekursorów syntezy auksyn, ponadto wpływa na czynniki transkrypcyjne, kontrolujące syntezę auksyn oraz na ekspresję genów kodujących receptory hormonów (prace cyt. w: Wang, Ruan 2013; Ljung i in. 2015).



Rycina 2. Procesy wzrostowe i rozwojowe roślin są regulowane przez cukry oraz hormony i zmiany czynników środowiskowych

Źródło: opracowanie własne.

3. Odbiór i przekazywanie sygnału wywołanego przez cukry

Percepcja sygnału wywołanego przez cukry może odbywać się przy udziale błonowych specyficznych sensorów cukrowych, transporterów cukrowych lub ich analogów albo też wewnątrz komórki. Heksokinaza1 *A. thaliana* (AtHXX1) jest najlepiej scharakteryzowanym receptorem wewnątrzkomórkowym cukrów (Moore i in. 2003; Cho i in. 2006; Sheen 2014). Znane są też analogi AtHXX1 u ryżu: OsHXX5 i OsHXX6. Ponadto analog heksokinazy AtHKL1 (**hexokinase-like1 protein**) może

działać jako regulator wzrostu oraz czynnik integrujący cukrowe drogi sygnałowe z hormonalnymi (Karve, Moore 2009; Granot i in. 2013). Heksokinaza (EC 2.7.1.1, HXK) była uważana za typowy enzym cytozolowy, związany z procesem glikolizy. Ostatnie badania wykazały jednak, że oprócz frakcji cytozolowej, występują izoformy związane z mitochondriami, HXK chloroplastowe lub związane z błoną komórkową; zlokalizowano także niewielką frakcję na terenie jądra komórkowego. Tak różnorodna lokalizacja komórkowa enzymu może wskazywać na inne funkcje HXK niż tylko na udział w glikolizie. Początkowo, udział HXK w percepcji cukrów i przekazywaniu sygnału badano podając do liści analogi cukrowe fosforylowane i niefosforylowane przez HXK oraz inhibitor aktywności HXK, następnie stosując rośliny transgeniczne, głównie *Arabidopsis*, z genem heksokinazy (*AtHXK1*) w orientacji antysens lub nadekspresją tego genu (prace cyt. w: Ciereszko 2002, 2007). Oddzielenie funkcji katalitycznych enzymu od roli HXK jako wewnątrzkomórkowego sensora glukozy możliwe było z wykorzystaniem mutantów HXK, *gin2* i roślin transgenicznych skonstruowanych z tych mutantów (Moore i in. 2003). Fenotyp mutantu różnił się od typu dzikiego; w warunkach wyższego promieniowania, wzrost i wytwarzanie rozety oraz pędu kwiatowego u *gin2* były zahamowane. Mutanty *gin2* charakteryzowały się obniżoną produkcją białka i znacznie obniżoną aktywnością HXK (fosforylacji glukozy). Rośliny transgeniczne produkowały nieaktywne katalitycznie białko HXK1 (w większości), wykazywały jednak funkcje sygnałowe (represja genów kodujących białka, np. CAB, niezbędne w procesie fotosyntezy). Poznano wiele szlaków percepcji cukrów i transdukcji sygnału, w których uczestniczy HXK. Wynikiem jest na przykład represja niektórych genów fotosyntezy (CAB, RBCS), indukcja metabolizmu sacharozy czy kumulacja antocyjanów (Ciereszko, Kleczkowski 2002; Rolland i in. 2006; Ciereszko 2007; Granot i in. 2013). Mechanizm działania heksokinazy1, jako sensora, pozwoliły wyjaśnić badania Cho i in. (2006) wskazujące, że HXK1, wchodząc w skład specyficznego białkowego kompleksu zlokalizowanego na terenie jądra komórkowego, może bezpośrednio oddziaływać na ekspresję genów. Z HXK1 współpracują VHA-B1 i RPT5B oraz czynniki transkrypcyjne. VHA-B1 jest analogiem jednej z trzech izoform podjednostki B peryferyjnej części kompleksu V1 wakuolarniej H⁺-ATPazy. RPT5B jest izoformą jednej z sześciu podjednostek AAA-ATPazy, wchodzącej w skład 19S – regulatorowego elementu proteasomu 26S (Cho i in. 2006; Chen 2007).

Percepcja sygnału wywołanego zmianą dostępu cukrów może zachodzić również niezależnie od heksokinazy. Funkcje sensorów błonowych mogą pełnić przenośniki białkowe cukrów, np. transportery glukozy lub sacharozy, zlokalizowane w plazmolemie. Funkcje sensora cukrów mogłyby pełnić także analogi transporterów cukrowych czy receptory sprzężone z białkami G (GPCR). Ukazały się też

prace wskazujące na udział białek G (lub ich analogów) w szlakach transdukcji sygnału cukrowego u roślin (prace cyt. w: Ciereszko 2007), niezależnych od heksokinazy. Ponadto zaprezentowano model działania regulatorowego białka RGS1 (sprzężonego z białkiem G) jako receptora cukrowego zlokalizowanego w plazmolemie (Grigston i in. 2008; Smeekens i in. 2010). Mechanizm działania RGS1 i roślinnych białek G jest aktualnie intensywnie badany (Trusov, Botella 2016).

W transdukcji sygnału cukrowego pośredniczą różnorodne przekaźniki wtórne, w tym specyficzne kinazy i fosfatazy białkowe. Taką rolę przypisuje się kompleksom kinaz serynowo-treoninowych SnRK (sucrose non-fermenting1-related protein kinases), CDPK (Ca^{+2} -dependent protein kinases), kinazom MAP (mitogen-activated protein), ostatnio także kinazom TOR (target of rapamycin) (Rolland i in. 2006; Dobrenel i in. 2013; Xiong, Sheen 2014).

Zaproponowano kilka mechanizmów regulacji wzrostu roślin, w zależności od dostępu cukrów. System promujący/stymulujący procesy wzrostowe roślin, to: heksokinaza (jako sensor glukozy), Tre6P (jako sygnał) i kinaza TOR. Brak Tre6P czy kinazy TOR hamuje wzrost i przejście do fazy generatywnej roślin (może być letalne, podczas embriogenezy). System hamujący procesy wzrostowe roślin to SnRK1 i czynniki transkrypcyjne C/S1 bZIP (*C/S class basic region leucine zipper*). Indukcja SnRK1 i C/S1 bZIP najczęściej hamuje procesy wzrostowe (Lastdrager i in. 2014).

Trehaloza była znana jako cukier występujący u mikroorganizmów i grzybów. U roślin wykryta późno, uważano, że może pełnić rolę osmoprotektanta w warunkach suszy. W ostatnim dziesięcioleciu stwierdzono, że Tre6P jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin oraz stabilnej gospodarki cukrowej (O'Hara i in. 2013). Wykryto wiele genów kodujących syntazę trehalozofosforanową oraz fosfatazę u roślin, nie wszystkie ich produkty są aktywne katalitycznie, mogą więc pełnić inne funkcje. Poziom Tre6P wzrasta po podaniu sacharozy, sugerowano więc, że Tre6P może być sensorem sygnału cukrowego. Tre6P wpływa ponadto na aktywność innych komponentów szlaków transdukcji, m.in. SnRK1 (O'Hara i in. 2013; Lastdrager i in. 2014; Figueroa, Lunn 2016).

Kompleks serynowo-treoninowych kinaz SnRK1 uczestniczy w regulacji metabolizmu cukrów oraz w metabolizmie azotowym, np. poprzez fosforylację białka enzymatycznego syntazy sacharozofosforanowej, syntazy sacharozowej i α -amylazy czy reduktazy azotanowej (Jossier i in. 2009; Sheen 2014). Aktywność kinaz SnRK jest regulowana poprzez fosforylację, przez glukozo-6-fosforan, ale także przez Tre6P, który hamuje aktywność SnRK (w warunkach deficytowego zaopatrzenia). Wykazano, że SnRK, kontrolowane za pośrednictwem cukrów (sacharozy, na poziomie genu) oraz hormonów (auksyny, cytokininy, ABA), wpływa

na procesy wzrostowe i rozwojowe organów roślin (prace cyt. w: Ljung i in. 2015). Rola SnRK1 w transdukcji sygnału cukrowego, a zwłaszcza ich podjednostek katalitycznych KIN10/KIN11, była intensywnie badana w komórkach roślinnych. Kinazy białkowe KIN10 i KIN11 są uważane obecnie za kluczowe w koordynacji odpowiedzi roślin na cukry i czynniki stresowe, wpływają na homeostazę energetyczną komórki (Smeekens i in. 2010). Niedobór energii aktywuje KIN10 i KIN11, które stymulują bądź inaktywują szereg procesów w komórce, co prowadzi do polepszenia gospodarki energetycznej, dostosowania wzrostu i umożliwia odpowiednią reakcję rośliny na zaistniały czynnik stresowy (O'Hara i in 2013; Lastdrager i in. 2014; Sheen 2014).

System kinaz białkowych TOR wcześniej dobrze poznano w komórkach drożdży i zwierząt – ich funkcją jest regulacja wzrostu, proliferacji, różnicowania i ruchu komórek, a także procesów transkrypcji i translacji. TOR funkcjonuje jako sensor/regulator komórkowego poziomu związków energetycznych i stanu redoks (Dobrenel i in. 2013; Xiong, Sheen 2014). Drożdże i ssaki zawierają dwa kompleksy: TORC1 i TORC2, u *Arabidopsis* znany jest jeden kompleks – TORC1. U roślin zmiany ekspresji TOR prowadzą do zmian wzrostowych i rozwojowych, począwszy od rozwoju embrionalnego po procesy starzenia. Kinazy TOR tworzą kompleksy z innymi białkami, np. z RAPTOR1 (Xiong, Sheen 2014). Wykazano, że szlaki sygnałowe z udziałem TOR wpływają na metabolizm pierwotny i wtórny komórek roślinnych oraz procesy wzrostowe – przykładowo stymulacja wzrostu korzeni *Arabidopsis*, wywołana przez glukozę, jest kontrolowana przez kinazy TOR (Dobrenel i in. 2013; Xiong, Sheen 2014).

W przekazywaniu sygnału cukrowego mogą brać udział fitohormony, np. ABA, etylen (ryc. 2). Izolacja i charakterystyka licznych mutantów, cukrowych i hormonalnych, dostarczyła dowodów na współdziałanie hormonalnych i cukrowych dróg sygnalnych. Wykazano, że fenotyp mutantu z nadprodukcją etylenu, *eto1*, jest taki sam jak mutantu *gin1* (brak wrażliwości na glukozę). Stwierdzono, że mutanty *gin1*, *isi4*, *sis4* są alleliczne do *aba2* (o obniżonej syntezie kwasu abscysynowego), a *gin6*, *isi3*, *sis5*, *sun6* są alleliczne do *abi4*. Udowodniono udział czynników transkrypcyjnych ABI3, ABI4, ABI5, a także ABF2, ABF3, ABF4 w transdukcji sygnałów cukrowych, zależnych bądź nie od heksokinazy. Ponadto wyniki badań wskazują na współdziałanie cytokinin, giberelin oraz na współdziałanie kwasu jasmonowego, salicylowego czy brasinosteroidów ze szlakami cukrowymi (prace cyt. w: Ciereszko 2007; Ljung i in. 2015; Zhang, He 2015). Sugeruje się, że zwłaszcza białka DELLA oraz PIF (phytochrome-interacting factor) odgrywają kluczową rolę w koordynacji procesów wzrostowych kontrolowanych, dzięki interakcjom pomiędzy drogami sygnałowymi wywołanymi przez hormony i cukry (prace cyt. w: Ljung

i in. 2015). Drogi transdukcji sygnałów uaktywnione przez cukry współdziałają z wieloma szlakami hormonalnymi oraz szlakami odpowiedzi na czynniki środowiskowe, tworząc w komórkach roślinnych złożoną sieć komunikacyjno-sygnałową. Współdziałanie różnych szlaków transdukcji umożliwia sprawną regulację procesów wzrostowych i rozwojowych roślin, jednak dokładne poznanie mechanizmów regulacji wymaga na pewno dalszych badań.

Literatura

- Barbier F.F., Lunn J.E., Beveridge C.A., 2015. Ready, steady, go! A sugar hit starts the race to shoot branching. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 25: 39-45.
- Cho Y.H., Yoo S.D., Sheen J., 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579-89.
- Chen J.-G., 2007. Sweet sensor, surprising partners. *Sci. STKE*, 373: pe7.
- Ciereszko I., 2002. Regulacyjna rola cukrów. Percepcja cukrów i przekazywanie sygnałów w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Kom.*, 29: 269-289.
- Ciereszko I., 2006. Kontrola metabolizmu sacharozy u roślin w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska. *Kosmos*, 55: 229-241.
- Ciereszko I., 2007. Odbiór i przekazywanie sygnału wywołanego zmianami poziomu cukrów w komórkach roślin. *Post. Biol. Kom.*, 34: 693-711.
- Ciereszko I., 2009. Sucrose metabolism in plant tissues under stress conditions: key enzymes, localization and function. [W:] Maksymiec W. (red.). *Compartmentation of responses to stresses in higher plants, true or false*. Trans. Res. Net., Kerala, India, 193-218.
- Ciereszko I., Kleczkowski L.A., 2002. Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via different hexokinase-dependent transduction mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 907-911.
- Dobrenel T., Marchive C., Azzopardi M., Clément G., Moreau M., Sormani R., Robaglia C., Meyer C., 2013. Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Front. Plant Sci.*, 4: 93.
- Eom J.-S., Chen L.-Q., Sosso D., Julius B.T., Lin I.W., Qu X.-Q., Braun D.M., Frommer W.B., 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 25: 53-62.
- Figueroa C.M., Lunn J.E., 2016. A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol.*, 172: 7-27.
- Gibson S.I., 2005. Control of plant development and gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 93-102.

- Granot D., Schwartz R.D., Kelly G., 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front. Plant Sci.*, 4: 44.
- Grigston J.C., Osuna D., Scheible W.-R., Liu C., Stitt M., Jones A.M., 2008. D-glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, *AtRGS1*. *FEBS Letters*, 582: 3577-3584.
- Jossier M., Bouly J.-P., Meimoun P., Arjmand A., Lessard P., Hawley S., Grahame Hardie D., Thomas M., 2009. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 59: 316-328.
- Karve A., Moore B.D., 2009. Function of *Arabidopsis* hexokinase-like1 as a negative regulator of plant growth. *J. Exp. Bot.*, 60: 4137-4149.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van Den Ende W., Cuypers A., 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant Cell Environ.*, 36: 1242-1255.
- Koch K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 235-246.
- Kunz S., Pesquet E., Kleczkowski L.A., 2014. Functional dissection of sugar signals affecting gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 9: e100312.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S., 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.*, 65: 799-807.
- Liu X., Zhang Y., Yang C., Tian Z., Li J., 2016. AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. *Sci. Rep.*, 6: 24563.
- Ljung K., Nemhauser J.L., Perata P., 2015. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 25: 130-137.
- Łukaszuk E., Ciereszko I., 2015. Metabolizm cukrów w warunkach stresu zranienia. [W:] Bajguz A., Ciereszko I. (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja*. Polskie Towarzystwo Botaniczne, Białystok 2015. Agencja Wyd. EkoPress Białystok, 37-49.
- Matsoukas I.G., 2014. Interplay between sugar and hormone signaling pathways modulate floral signal transduction. *Front. Genet.*, 5: 218.
- Mason M.G., Ross J.J., Babst B.A., Wienclaw B.N., Beveridge C.A., 2014. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 6092-6097.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.-H., Liu Y.-X., Hwang I., Jones T., Sheen J., 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300: 332-336.
- Morkunas I., Borek S., Formela M., Ratajczak L., 2012. Plant responses to sugar starvation. [W:] Chang C.-F. (red.), *Carbohydrates – comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology*. InTech, 409-438.

- Morkunas I., Ratajczak L., 2014. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.*, 36: 1607-1619.
- O'Hara L.E., Paul M.J., Wingler A., 2013. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Mol. Plant*, 6: 261-274.
- Polit J.T., Ciereszko I., 2009. *In situ* activities of hexokinase and fructokinase in relation to phosphorylation status of root meristem cells of *Vicia faba* during reactivation from sugar starvation. *Physiol. Plant.*, 135: 342-350.
- Pourtau N., Jennings R., Pelzer E., Pallas J., Wingler A., 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, 224: 556-568.
- Price J., Laxmi A., Martin S.K.St., Jang J.-C., 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2128-2150.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 675-709.
- Sheen J., 2014. Master regulators in plant glucose signaling networks. *J. Plant Biol.*, 57: 67-79.
- Smeeckens S., Ma J., Hanson J., Rolland F., 2010. Sugar signal and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13: 274-279.
- Starck Z., 2008. Funkcja tkanek przewodzących: zaopatrzenie w substancje pokarmowe i udział w koordynacji procesów w roślinach. *Kosmos*, 57: 67-83.
- Trusov Y., Botella J.R., 2016. Plant G-proteins come of age: breaking the bond with animal models. *Front. Chem.*, 4: 24.
- Van den Ende W., 2014. Sugars take a central position in plant growth, development and, stress responses. A focus on apical dominance. *Front. Plant Sci.*, 5: 313.
- Van Dingenen J., De Milde L., Vermeersch M., Maleux K., De Rycke R., De Bruyne M., Storme V., Gonzalez N., Dhondt S., Inzé D., 2016. Chloroplasts are central players in sugar-induced leaf growth. *Plant Physiol.*, 171: 590-605.
- Wang L., Ruan Y.-L., 2013. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Front. Plant Sci.*, 4: 163.
- Xiong Y., Sheen J., 2014. The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol.*, 164: 499-512.
- Yu S., Lian H., Wang J.-W., 2015. Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 27: 1-7.
- Zhang Y., He J., 2015. Sugar-induced plant growth is dependent on brassinosteroids. *Plant Signal. Beh.* 10: 12, e1082700.

Iwona **Rajewska*** / Andrzej **Bajguz****

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: * bina2@poczta.onet.pl, ** abajguz@uwb.edu.pl

Streszczenie: Aminy biogenne należą do grupy aktywnych biologicznie zasad organicznych o małych masach cząsteczkowych, powszechnie występujących w roślinach, grzybach, organizmach zwierzęcych oraz mikroorganizmach. Aminy biogenne są to związki uważane za neurotransmitery (neuroprzekazniki) mobilizujące organizm do zwiększonej aktywności biologicznej. U roślin zaliczane są do hormonów pochodzenia zwierzęcego i pełnią funkcje regulatorów wzrostu. Można wśród nich wyróżnić, między innymi: acetylocholinę, adrenalinę, noradrenalinę, dopaminę, histaminę i serotoninę. Występują one u roślin w postaci wolnej lub w połączeniu ze związkami fenolowymi. Modyfikują one procesy fizjologiczne i morfologiczne zachodzące w roślinach. Związki te uczestniczą w prawidłowym przebiegu procesów komórkowych oraz są niezbędne w utrzymaniu żywotności komórek. W komórkach wpływają, między innymi, na replikację DNA i przepuszczalność błon komórkowych. Ponadto wykazują funkcje obronne przed patogenami grzybowymi, wirusowymi oraz zahamowują procesy nowotworowe. Pod wpływem czynników stresowych w tkankach roślinnych, wzrasta ich stężenie. Związki te uczestniczą, między innymi w kiełkowaniu, ukorzenianiu, kwitnieniu oraz regulacji morfogenezy u roślin. Ponadto regulują gospodarkę wodną i wymianę jonów sodu, potasu i wapnia oraz mogą wchodzić w interakcje z innymi fitohormonami. Ich działanie zależy przede wszystkim od stężenia, powinowactwa do odpowiednich receptorów komórkowych, gatunku rośliny, jej stanu fizjologicznego oraz od warunków otaczającego środowiska. Prawdopodobnie regulacja odpowiedzi fizjologicznej komórki roślinnej pod wpływem tych związków jest podobna do mechanizmu przekazywania impulsów w układzie autonomicznym zwierząt.

Słowa kluczowe: aktywność, aminy heterocykliczne (imidazolowe i indolowe), aminy katecholowe, biosynteza

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się zwiększone zainteresowanie wszystkimi substancjami wykazującymi aktywność regulatorów wzrostu i rozwoju. Jest to związane z intensyfikacją badań w tej dziedzinie, a w konsekwencji – z odkryciem nieznanych dotąd związków. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin są substancjami organicznymi, których niewielkie ilości modyfikują funkcje fizjologiczne zachodzące w roślinie. Oprócz fitohormonów, u roślin wyizolowano typowe hormony zwierzęce oraz ich analogi chemiczne, które nieznacznie różnią się strukturą chemiczną (Matysiak, Adamczewski 2009). Stwierdzono ich występowanie we wszystkich grupach taksonomicznych roślin. Dotychczas u roślin wyodrębniono hormony pochodzenia zwierzęcego, takie jak: acetylocholina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina i histamina, związki steroidowe, zwłaszcza z grupy androgenów, estrogenów i kortykoidów oraz ekdysteroidy, prostaglandyny i ich związki pokrewne (Czerpak 1993; Bajguz i in. 2015).

Aminy biogenne to grupa aktywnych biologicznie zasad organicznych, o małych masach cząsteczkowych, powszechnie występujących w roślinach, grzybach, organizmach zwierzęcych oraz w mikroorganizmach. Uczestniczą one w syntezie białek, hormonów, alkaloidów i kwasów nukleinowych, wpływają na replikację DNA i przepuszczalność błon komórkowych. Ponadto biorą udział w regulacji temperatury ciała, ciśnienia tętniczego krwi i aktywności mózgu. Z jednej strony są niezbędne do wzrostu i utrzymania żywotności komórek oraz prawidłowego przebiegu wielu procesów metabolicznych, z drugiej zaś mogą wykazywać działanie toksyczne, a niektóre z nich nawet rakotwórcze, jako prekursorzy kancerogennych *N*-nitrozwiązków (Karošičová, Kohajdová 2005).

Aminokwasy są głównym źródłem azotu dla organizmów żywych oraz służą jako substancje wyjściowe dla innych składników azotowych, do których należą, między innymi, aminy biogenne, do których zaliczamy: aminy katecholowe (dopamina, noradrenalina i adrenalina) jako pochodne aminokwasu tyrozyny, aminy heterocykliczne – imidazolowe, do których należy histamina powstająca w wyniku dekarboksylacji histydyny oraz indolowe, do których należy serotonina syntezowana z tryptofanu. Są to związki uważane za neuroprzekaźniki (neurotransmitery) mobilizujące organizm człowieka i zwierzęcia do zwiększonej aktywności fizycznej i psychicznej. Okazało się, że związki te występują nie tylko u zwierząt, ale również rośliny są w nie zasobne (Roshchina 2001). Odkrycie tych receptorów u roślin sugeruje, że takie metabolity wtórne nie tylko pełnią rolę czysto obronną, ale rośliny mogą być w stanie odbierać także powszechne sygnały wysyłane przez zwierzęta i na nie odpowiadać. Teoretycznie rośliny i zwierzęta mogłyby wzajemnie manipu-

lować mechanizmami wykrywania sygnałów i odpowiedzi na nie. Chociaż odległość filogenetyczna między roślinami i zwierzętami roślinożernymi jest ogromna, organizmy te mają wspólny zestaw kodów, co wyjaśnia, jak rośliny mogą rozpoznawać owady, a także w jaki sposób rośliny i zwierzęta mogą nawzajem blokować swoje sygnały (Schulz 2002).

2. Występowanie katecholamin, serotoniny i histaminy

Aminy katecholowe (katecholoaminy) to pochodne aminokwasu tyrozyny, jako typowe hormony i neurotransmitery zwierzęce spotykane są także u roślin niższych i wyższych, należących, między innymi, do następujących rodzin: amarylkowate (*Amaryllidaceae*), bananowate (*Musaceae*), cyprysowate (*Cyperaceae*), gązownikowate (*Loranthaceae*), jaskrowate (*Ranunculaceae*), krzyżowe (*Cruciferae*), liliowate (*Liliaceae*). Katecholaminy występują w przeszło 30 gatunkach roślin przeznaczonych do konsumpcji człowieka, między innymi, w owocach awokado, bananów i pomarańczy. Do amin katecholowych należą: adrenalina, noradrenalina i dopamina oraz ich metylowe pochodne. Największe stężenie dopaminy stwierdzono w skórce owocu banana żółtego (*Musa sapientum* L. var. *baracoa*), które wynosi 700 µg/g świeżej masy; adrenaliny poniżej 1 µg/g, noradrenaliny – 3,5 µg/g. Katecholaminy wyizolowano z miększu i skórki owoców, pąków kwiatowych, liści, łodyg i korzeni. Dotychczas wewnątrzkomórkową lokalizację katecholamin stwierdzono wyłącznie w wakuolach chloroplastów, np. dopaminy w maku lekarskim (*Papaver somniferum* L.) czy adrenaliny i noradrenaliny w wielu gatunkach roślin z rodzin: motylkowate i pokrzywowate (Roshchina 2001). W 1985 roku dokonano identyfikacji melatoniny – aminy indolowej. Jej występowanie stwierdzono u 108 gatunków roślin stosowanych w medycynie chińskiej (Chen i in. 2003). Manchester i in. (2000) odnotowali występowanie melatoniny u wiśni. Natomiast Reiter (2005) dokonał oznaczenia melatoniny w orzechach włoskich. Zachowana w dużym stopniu natura indoloamin oraz różnorodność gatunków zawierających melatoninę może wskazywać na ważną rolę tego związku we wzroście lub przetrwaniu roślin wyższych. Pod wpływem czynników stresowych, w tkankach roślinnych wzrasta stężenie amin katecholowych (Swiedrych i in. 2004).

Serotonina jest przedstawicielem amin biogennych, heterocyklicznych, indolowych. Występuje w niektórych gatunkach roślin wyższych. Największe ilości serotoniny spotykane są w roślinach z rodzin: orzechowate (*Juglandaceae*), motylkowate (*Fabaceae*), pokrzywowate (*Urticaceae*) oraz psiankowate (*Solanaceae*).

Zawartość serotoniny w organizmach roślinnych jest porównywalna lub nieco mniejsza w stosunku do zwierząt. Największą ilość serotoniny – 200 µg/g świeżej masy stwierdzono w nasionach *Griffonia simplicifolia* (D.C.) Baill. z rodziny motylkowate. Najbardziej zasobne w serotoninę okazały się owoce i nasiona, w których jest jej ponad 100-krotnie więcej niż w organach wegetatywnych: liściach, łodygach czy korzeniach. Wewnątrzkomórkową lokalizację serotoniny stwierdzono jedynie w wakuolach pokrzyw (Roshchina 2001).

Histamina to przedstawiciel amin biogennych, heterocyklicznych, imidazolowych. Obecnie znanych jest ponad 50 gatunków roślin u których stwierdzono obecność histaminy. Najbardziej zasobnymi roślinami w ten związek są gatunki należące do rodzin: komosowate (*Chenopodiaceae*) i pokrzywowate (*Urticaceae*). Histamina występuje we wszystkich częściach roślin naczyniowych: korzenie, łodygi, pylniki, kwiaty, owoce i nasiona. Zawartość jej w poszczególnych organach roślin może zmieniać się w zależności od okresu wegetacji, fazy rozwoju czy zmian środowiska (Gawarska i in. 2012). Najbardziej zasobne w histaminę są włoski parzące pokrzyw (25-50 µg/1000 włosków), liście (1-100 µg/g świeżej masy), owoce (20 µg/g świeżej masy) oraz kwiaty (1-10 µg/g świeżej masy). Dotychczas największą zawartość histaminy oznaczono we włoskach parzących *Jatropha urens* L. (wilczomleczone, *Euphorbiaceae*), które zawierają 1250 µg histaminy w przeliczeniu na 1000 włosków. Ponadto histaminę wyizolowano z pyłku kwiatowego roślin wiatropylnych, np. mietlicy olbrzymiej (*Agrostis alba* L.), kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.), życicy trwałej (*Lolium perenne* L.), żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.) czy kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.) oraz roślin owadopylnych, np. lilaka pospolitego (*Syringa vulgaris* L.), lipy szerokolistnej (*Tilia platyphyllos* L.) czy lipy drobnolistnej (*Tilia cordata* Mill.). Pod wpływem czynników stresowych, takich jak susza, wzrasta zawartość histaminy w tkankach roślinnych. Histamina występująca we włoskach parzących pokrzyw i pyłku kwiatowym może być czynnikiem wywołującym reakcje alergiczne u ludzi (Roshchina 2001).

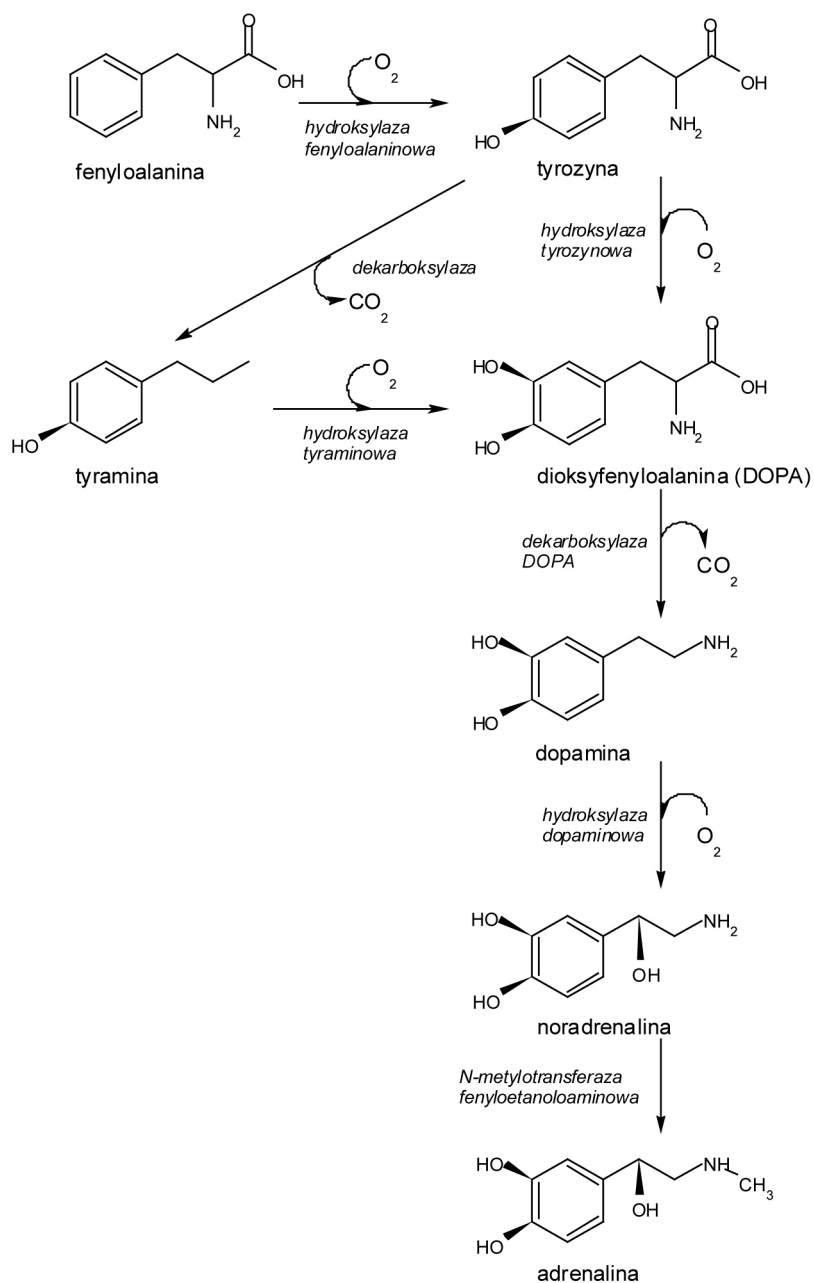
3. Biosynteza katecholamin, serotoniny i histaminy

Związki fenyloetyloaminowe, do których należą katecholaminy powstają pośrednio z fenyloalaniny (ryc. 1). Aminy katecholowe są produktami metabolizmu odpowiednich aminokwasów. Fenyloalanina podlega hydroksylacji do tyrozyny, która może przekształcać się dalej dwoma szlakami. Pierwszy, to bezpośrednia hydroksylacja tyrozyny do dioksyfenyloalaniny (DOPA). Drugim jest dekarboksy-

lacja tyrozyny – najpierw do tyraminy, a następnie poprzez jej hydroksylację do DOPA. Dopamina jest bezpośrednim prekursorem noradrenaliny i adrenaliny, powstającym w wyniku dekarboksylacji DOPA z udziałem dekarboksylazy dioksyfenyloalaninowej bądź hydroksylazy tyraminowej. Dopamina może być utleniona do noradrenaliny, która z udziałem transmetylazy fenyloalaninowej przekształca się w adrenalinę (Roshchina 2001, Kulma i Szopa 2007). Miejsce biosyntezy katecholamin w komórkach roślinnych pozostaje niewyjaśnione. Zakładając analogię do zwierząt, ich biosynteza powinna mieć miejsce w cysternach aparatu Golgiego. Biosynteza katecholamin zależy od czynników zewnętrznych. W kalusie portulaka wielkokwiatowego (*Portulaca grandiflora* Hook.), zawierającego dopaminę, adrenalinę, noradrenalinę i epinę, biosynteza DOPA i dopaminy zachodzi szybciej w ciemności niż na świetle. Pozostałe katecholaminy (adrenalina i noradrenalina) są syntezowane jedynie w ciemności.

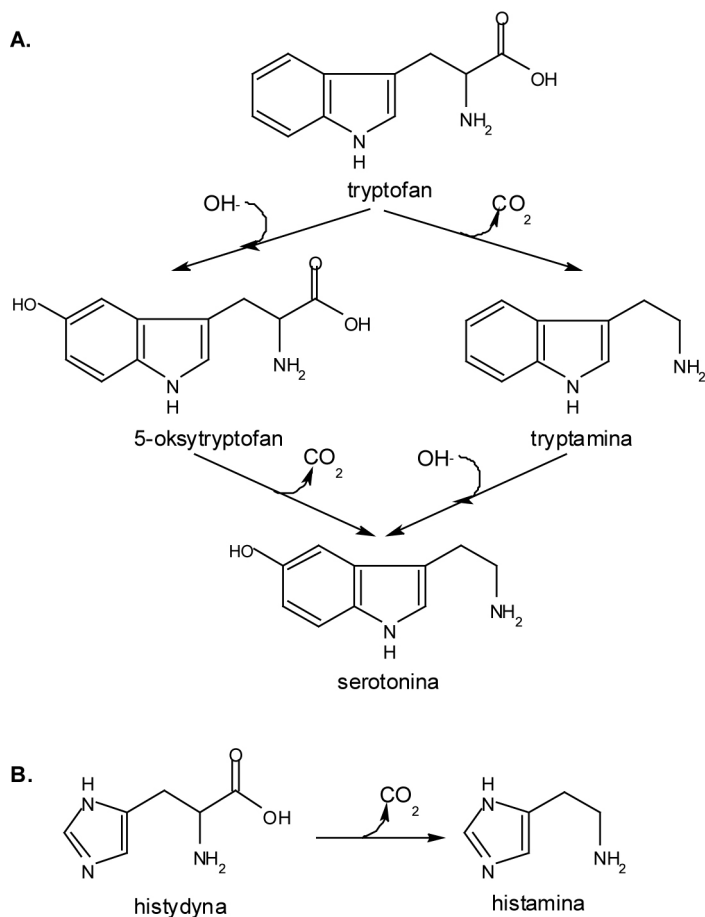
Serotonina jest syntezowana z tryptofanu, którego szlak zlokalizowany jest w plastydach (ryc. 2). Biosynteza serotoniny przebiega dwiema drogami, zarówno poprzez 5-oksytryptofan czy tryptaminę. Pierwszym etapem biosyntezy serotoniny jest dekarboksylacja tryptofanu do tryptaminy, katalizowana przez enzym dekarboksylazę tryptofanową lub dekarboksylazę aminokwasów aromatycznych. Następnie tryptamina, w wyniku reakcji hydroksylacji, jest przekształcana w serotoninę w obecności tlenu oraz z udziałem 5-hydroksylazy tryptaminowej lub 5-hydroksylazy L-tryptofanowej. Hydroksylacja tryptofanu prowadzi do powstania 5-oksytryptofanu w obecności 5-hydroksylazy tryptofanowej. Następnym etapem jest dekarboksylacja 5-oksytryptofanu do serotoniny (Roshchina 2001).

Biosynteza histaminy u roślin przebiega podobnie jak u zwierząt, gdzie związkiem wyjściowym jest aminokwas histydyna, który ulega dekarboksylacji (ryc. 3). Przekształcenie to jest bardzo prostą jednostopniową reakcją, w przeciwieństwie do biosyntezy katecholamin czy serotoniny. Brak jest jakichkolwiek informacji odnośnie do miejsca biosyntezy w komórkach roślinnych. U zwierząt, dekarboksylaza histydynowa została znaleziona we frakcjach mitochondrialnych i mikrosomalnych. Przemiany histaminy u roślin powstają w drodze eliminacji grupy aminowej, utleniania czy metylacji. Histamina jest prekursorem wielu alkaloidów zawierających pierścień imidazolowy, takich jak: dolichotelina (pochodna izowalerianowa histaminy z kaktusa *Dolichothele sphaerica* (A. Dietr.) Britton & Rose), glochidon, glochidycyna, dimedon (występują w liściach roślin z rodzaju *Glochidion*) czy zapotydyna pochodząca z kazimiry jadalnej (*Casimiroa edulis* La Llave) (Roshchina 2001).



Rycina 1. Szlak biosyntezy katecholamin (dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny) u roślin

Źródło: Roshchina 2001, zmodyfikowane.



Rycina 2. Szlak biosyntezy serotoniny (A) i histaminy (B)

Źródło: Roshchina 2001, zmodyfikowane.

4. Aktywność biologiczna katecholamin, serotoniny, histaminy i melatoniny

Katecholaminy służą jako substraty do biosyntezy innych związków aktywnych w komórkach roślin. W szczególności dopamina jest formą pośrednią w biosyntezie alkaloidów, zwłaszcza benzyloizochinolin, takich jak: papaweryna czy morfina, halucynogennego alkaloidu meskaliny występującego w wielu gatunkach kaktusa, oraz alkaloidów tetrahydrobenzyloizochinolinowych. Wyniki uzyskane dla wyizolowanych chloroplastów szpinaku pokazują, że adrenalina i dopamina mogą

mediować fotosyntetyczną redukcję tlenu. Związki te mogą funkcjonować jako chemiczne analogi proponowanego naturalnego mediatora, czynnika redukującego, który umożliwia redukcję tlenu w ramach transdukcji energii w fotosyntezie. Całkowicie utleniona forma adrenaliny, adrenochrom, także działa jako mediator fotosyntetycznego poboru tlenu, ale tylko poprzez redukcję tlenu do ponadtlenku (Allen 2003).

Pozostaje jeszcze do zbadania, czy któreś z pochodnych katecholamin rzeczywiście mogą działać w ten sposób *in vivo*. Po drugie, katecholaminy umożliwiają organizmom dostosowanie odpowiedzi do warunków stresowych. Prawdopodobnie po części wynika to z antyoksydacyjnych właściwości tych związków i ich pochodnych (utlenianie dopaminy prowadzi do produkcji melaniny, silnego pożeracza wolnych rodników) i odkładania się pochodnych w ścianie komórkowej. Na przykład synteza katecholaminy u portulaki (*Portulacca* L. sp.) jest znacznie wyższa w ciemności. W przeciwieństwie do tego, u subantarktycznej kapusty kergueleńskiej (*Pringlea antiscorbutica* R.Br. ex. Hook f.) poziom dopaminy (oraz kilku innych amin) obniża się w sytuacji stresu termicznego (Hennion i in. 2000).

Niewiele jest badań dotyczących wpływu katecholamin (adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy) na wzrost roślin. W stężeniach rzędu 10^{-7} - 10^{-5} M nieznacznie stymulują wzrost i rozwój glonu *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Zwiększają zawartość chlorofili, karotenoidów, białek i monosacharydów oraz aktywność aminotransferaz: ALAT i AspAT. W stężeniach przekraczających 10^{-4} M działają początkowo hamująco, a następnie toksycznie na wzrost glonu. Katecholaminy stymulują również wzrost kultur tkankowych ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.). Dopamina, w stężeniach przekraczających 5 mg/l ($3,2 \times 10^{-5}$ M), opóźnia wzrost kalusa banana (*Musa acuminata* Colla), a w stężeniu 50 mg/l ($3,2 \times 10^{-4}$ M) całkowicie go blokuje. Z kolei noradrenalina i adrenalina podwyższają działanie synergistyczne z giberelinami w stymulacji wydłużania siewek sałaty siewnej (*Lactuca sativa* L.). Poza tym katecholaminy i serotonina biorą udział w morfogenezie roślin. Dopamina jest stymulatorem wzrostu, zwłaszcza części nadziemnych: liści i łodyg (przeciętnie w 20%), podczas gdy wzrost korzeni był nieznaczny, a niekiedy dopamina wykazywała wpływ toksyczny. Stwierdzono również, że endogenne poziomy dopaminy jest wyższy w częściach nadziemnych rośliny (Roshchina 2001).

Serotonina jest najbardziej aktywnym regulatorem wzrostu roślin spośród amin biogennych. Wykazuje auksyno-podobne działanie, tzn. przyspiesza wzrost korzeni, masy korzeniowej i liścieni siewek jęczmienia. Działanie histaminy na wzrost wydłużeniowy roślin nie zostało jeszcze zbadane. Pod wpływem dopaminy, histaminy i adrenaliny stwierdzono słaby wpływ lub brak oddziaływania na kiełkowanie sadzonek rzodkwi zwyczajnej (*Raphanus sativus* L.), podczas gdy noradrena-

lina i serotonina stymulują kiełkowanie w około 40-50%. Noradrenalina, w stężeniach rzędu 10^{-6} - 10^{-4} M, zahamowuje kiełkowanie pyłku zwartnicy (*Hippeastrum hybridum* Herb.), z kolei dopamina i serotonina wykazują działanie stymulujące. Histamina jest regulatorem, który w zależności od zastosowanego stężenia, posiada działanie stymulujące lub hamujące kiełkowanie nasion (Roshchina 2001).

Melatonina odgrywa ważną rolę we wzroście i przetrwaniu roślin wyższych. Sprzyja ona wzrostowi etiolowanych hipokotyli roślin strączkowych w teście biologicznym, określającym aktywność auksyn, co sugeruje, że u roślin wyższych, melatonina może działać jako auksynowy regulator wzrostu (Hernandez-Ruiz i in. 2004). W badaniach nad mózgiem kanaryjską, pszenicą, jęczmieniem i owsem, egzogenne podanie melatoniny hamuje rozwój korzenia w podobny sposób, jak nadmierna ekspozycja na auksyny (Hernandez-Ruiz i in. 2005). Związki między endogenną melatoniną, serotoniną i auksyną badano także w okresie rozwoju korzeni i pędów dziurawca zwyczajnego (Murch i in. 2001; Murch, Saxena 2004). W badaniach tych organogeneza korzenia, indukowana auksynami, hamowana była przez inhibitory syntezy i transportu melatoniny.

Akumulacja podobnego związku – serotoniny w tkankach z niedoborem melatoniny powodowała proliferację odrośli (Murch i in. 2001). Wyniki te sugerują, że względny stosunek serotoniny do melatoniny może mediować morfogenezę roślin w sposób analogiczny do modyfikacji wzrostu roślin powodowanej zmianami w stosunku stężenia auksyn do innych fitohormonów, takich jak cytokiny. Melatonina jest silnym antyoksydantem u ssaków i roślin wyższych (Reiter, Tan 2002). W złożonych układach fizjologicznych, melatonina może naprawić uszkodzone biomolekuły poprzez transfer elektronów, jak niedawno wykazano w przypadku przekształcenia rodnika guazynowego w guanozynę (Hardeland 2005). W odróżnieniu od klasycznych antyoksydantów, melatonina nie wykazuje działania prooksydacyjnego, a wszystkie znane formy pośrednie, generowane przez interakcję melatoniny z reaktywnymi formami tlenu, są także pozeraczami wolnych rodników (Tan, Reiter 2002). Na podstawie badań Reiter i in. (2001) wiadomo, że akumulacja melatoniny w tkankach rozrodczych, nasionach i owocach może wskazywać na mechanizm ochrony tych tkanek przed uszkodzeniem oksydacyjnym wynikającym z suszy, zbyt niskich lub zbyt wysokich temperatur, promieniowania ultrafioletowego lub toksyn obecnych w środowisku.

Dotychczasowe badania pozwoliły na ustalenie następujących funkcji monoamin biogennych u roślin:

- katecholaminy inicjują fotofosforylację w chloroplastach;
- katecholaminy są prekursorami w biosyntezie alkaloidów;

- biorą udział w reakcjach energetycznych roślin jako donory lub akceptory transportu elektronów pomiędzy fotosystemem II a fotosystemem I;
- regulują aktywność enzymów, np. histamina hamuje aktywność lizozymu, noradrenalina obniża aktywność karboksylazy rybulozobisfosforanowej czy acetylocholinoesterazy;
- biorą udział w autofosforylacji białek;
- stymulują biosyntezy etylenu;
- współdziałają z auksynami i giberelinami w regulacji wzrostu roślin;
- występują jako oksydanty i antyoksydanty;
- występują jako substancje stabilizujące i chroniące struktury komórkowe przed szkodliwym działaniem: suszy (histamina), grzybów *Cercospora beticola* (dopamina), promieniowania UV powodującego guzy nowotworowe roślin (serotonina), wirusami czy mechanicznymi skaleczeniami tkanek roślinnych przez wiatr, ptaki lub skały (dopamina);
- regulują gospodarkę wodną i wymianę jonów sodu, potasu i wapnia;
- indukują syntezę wtórnych przekazników sygnałów cAMP i cGMP, trifosfoinozytolu (IP₃), jonów wapnia, jak również enzymu cyklicznej adenylowej;
- występują jako cząsteczki sygnałowe w kontaktach międzykomórkowych i wewnątrzkomórkowych;
- biorą udział w ruchach roślin;
- biorą udział w allelopatii pyłku kwiatowego.

5. Podsumowanie

Pod wpływem katecholamin: serotoniny, histaminy i melatoniny – zwierzęcych neurotransmiterów, dochodzi do zmian we wzroście i metabolizmie roślin. Przypuszcza się, że regulacja odpowiedzi fizjologicznej komórki roślinnej pod wpływem amin biogennych jest podobna do mechanizmu przekazywania impulsów w układzie autonomicznym zwierząt. Reakcje tych związków na przepuszczalność jonów oraz indukcja syntezy cyklicznych nukleotydów, trifosfoinozytolu prowadzą do wywołania właściwej odpowiedzi fizjologicznej roślin. Jednak dotychczasowe badania nad charakterem działania amin biogennych, ich interakcji z fitohormonami czy wtórnymi przekaznikami transdukcji sygnałów nie w pełni wyjaśniają ten mechanizm. Zastosowanie metod immunologicznych, chromatograficznych czy biochemicznych umożliwi ustalenie lokalizacji strukturalnej biosyntezy tych związków w komórce oraz ich aktywności biologicznej jako regulatorów wzrostu roślin.

Literatura

- Allen J., 2003. Superoxide as an obligatory, catalytic intermediate in photosynthetic reduction of oxygen by adrenaline and dopamine. *Antioxid. Redox. Signal.*, 5: 7-14.
- Bajguz A., Bąkała I., Talarek M., 2015. Ecdysteroids in plant and their pharmacological effects in vertebrates and humans. [W:] Atta-ur-Rahman (red.), *Studies in Natural Products Chemistry* Vol. 45. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 121-145.
- Chen G.F., Huo Y.S., Tan D.X., 2003. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci.*, 73: 19-26.
- Czerpak R., 1993. Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin. *Kosmos*, 42: 613-636.
- Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D., Ścieżyńska H., Minorczyk M., Postupolski J., 2012. Występowanie wolnych amin biogennych: histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny w owocach i warzywach oraz ich produktach. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2: 105-110.
- Hardeland R., 2005. Antioxidative protection by melatonin. Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27: 119-130.
- Hennion F., Martin-Tanguy J., 2000. Amines of the subantarctic crucifer *Pringlea antiscorbutica* are responsive to temperature conditions. *Physiol. Plant.*, 109: 232-243.
- Hernandez-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B., 2004. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220: 140-144.
- Hernandez-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B., 2005. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J. Pineal Res.*, 39: 137-142.
- Karovičová J., Kohajdová Z., 2005. Biogenic amines in food. *Chem. Pap.*, 59: 70-79.
- Kulma A., Szopa J., 2007. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci.*, 172: 433-440.
- Manchester L.C., Tan D.X., Reither R.J., Park W., Monis K., Qi, W.B., 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants – possible function in germ tissue protection. *Life Sci.*, 67: 3023-3029.
- Matysiak K., Adamczewski K., 2009. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin – kierunki badań w Polsce i na świecie. *Prog. Plant Prot.*, 49: 1800-1816.
- Murch S.J., Campbell S.S. B., Saxena P.K., 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: Regulation of auxin-induced root organogenesis in *in vitro* cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 37: 786-793.
- Murch S.J., Saxena P.K., 2002. Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Naturwissenschaften*, 89: 555-560.

- Reiter R.J., Tan D.-X., Burkhardt S., Manchester, L.C., 2001. Melatonin in plants. *Nutr. Rev.*, 59: 286-290.
- Reiter R.J., Tan D.-X., 2002. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann. NY Acad. Sci.*, 957: 341-344.
- Reiter R.J., 2005. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutr.*, 21: 920-924.
- Roshchina V.V., 2001. Neurotransmitters in plant life. Science Publishers, Enfield.
- Schultz, J., 2002. How plants fight dirty. *Nature*, 416: 267.
- Swiedrych A., Lorenc-Kukula K., Skirycz A., Szopa J., 2004. The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 42: 593-600.
- Tan D.X., Reiter R.J., 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2: 181-197.

4 Zdziwiający świat roślin. Hormony owadzie – ekdysteroidy w roślinach

Barbara Bokina* / Andrzej Bajguz**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii

ul. K. Ciołkowskiego 1 J, 15-245 Białystok
e-mail: * cartier11@wp.pl, ** abajguz@uwb.edu.pl

Streszczenie: Ekdysteroidy, hormony linienia owadów i innych bezkręgowców, są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym: występują zarówno u roślin okrytonasiennych i nagonasiennych. Spotykane są także u glonów i paprotników. Fitoekdysteroidy kumulują się w tkankach istotnych dla procesów rozwojowych roślin, w większych ilościach występują w liściach i kwiatach, natomiast w mniejszych – w łodygach, korzeniach i nasionach. Stwierdzono, że rośliny są nie tylko bardziej zasobne w ekdysteroidy niż zwierzęta, ale aktywność biologiczna ekdysteroidów jest większa w roślinach niż u owadów. Ekdysteroidy są to związki o zróżnicowanej budowie chemicznej, występujące jako: 1) pochodne różnych steroli z ogólną liczbą węgli C₂₇, C₂₈, C₂₉; 2) związki C₂₄, C₂₁, C₁₉, powstałe w wyniku rozerwania łańcucha bocznego. Bezpośrednim prekursorem w biosyntezie fitoekdysteroidów jest latosterol, który poprzez niezidentyfikowane związki pośrednie, przechodzi w ekdyson. Przemianę ekdysonu w 20-hydroksyekdyson, poprzez pochodną fosforanową, katalizuje enzym 20-monooksygenaza ekdysonowa. Egzogennie podany roślinom ekdyson, włącza się w szlak biosyntezy ekdysteroidów, w którym jest metabolizowany, poprzez fosforan-3-ekdysonu – do 20-hydroksyekdysonu. Rola ekdysteroidów w roślinach jest wciąż nie do końca poznana. Testy biologiczne wykazały, że ponasteron A, 20-hydroksyekdyson oraz inokosteron posiadają aktywność giberelinopodobną. W glonie *Chlorella vulgaris* stwierdzono stymulujący wpływ ekdysteroidów na liczbę komórek, zawartość DNA i RNA, białek, barwników fotosyntetycznych oraz cukrów. 20-hydroksyekdyson nieznacznie stymuluje kwitnienie rzepnia pensylwańskiego, zaś hamuje formowanie się kwiatów żeńskich dyni zwyczajnej. W roślinach, ekdysteroidy pełnią funkcję obronną przed zgryzaniem przez owady, ponieważ po przedostaniu się do organizmu zwierzęcia, wywołują zaburzenia w procesach rozwojowych. Ponadto posiadają znaczenie farmakologiczne wskutek działania antydepresyjnego, spermatotwórczego, przeciwwgrzybicznego, przeciwbakteryjnego oraz przypuszczalnie wykazują działanie przeciwnowotworowe.

Słowa kluczowe: biosynteza, hormony steroidowe, bioróżnorodność, występowanie, aktywność

1. Wstęp

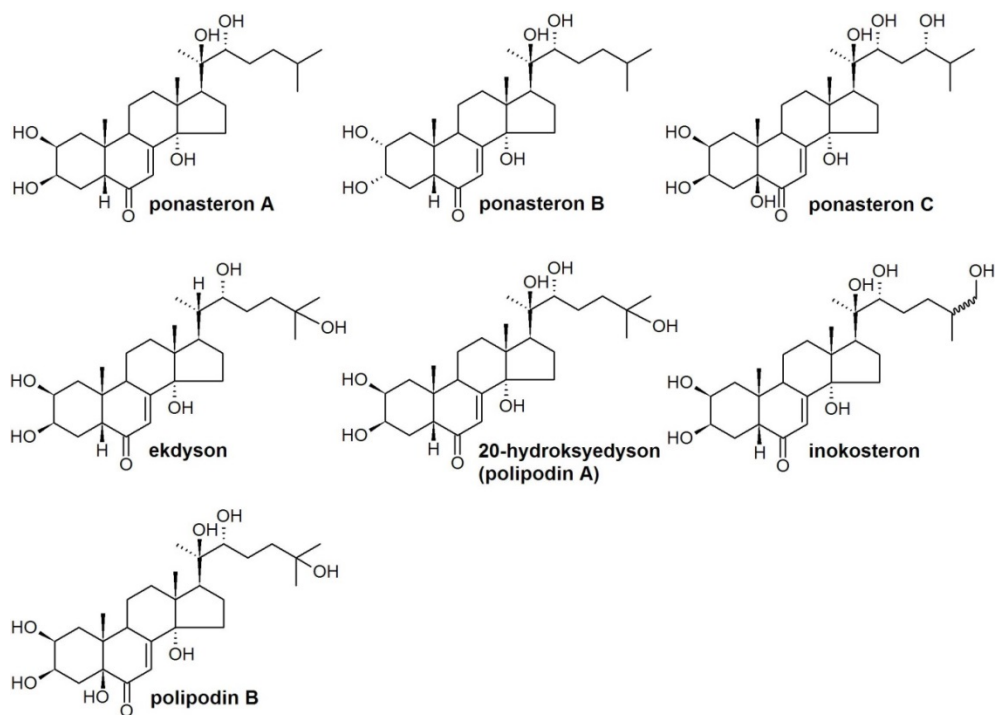
Ekdysteroidy należą do hormonów regulujących linienie i metamorfozę owadów. Są one najpowszechniej występującymi hormonami steroidowymi. Ich obecność wykazano zarówno u owadów, jak i u innych stawonogów (Arthropoda) oraz u niższych zwierząt, takich jak: pierścienice (Annelida), nicienie (Nematoda) czy mięczaki (Molusca). Obecnie wiadomo, że steroidy te uczestniczą we wszystkich etapach rozwoju owadów oraz w regulowaniu wielu procesów biochemicznych i fizjologicznych: niezbędne są przy składaniu jaj, podczas rozwoju embrionalnego i postembrionalnego, a u dorosłych osobników regulują rozwój, metamorfozę, reprodukcję i diapauzę (Smagge 2009).

Występowanie, struktura chemiczna, biosynteza i przemiany metaboliczne oraz aktywność ekdysteroidów u roślin, jest przedmiotem niniejszego rozdziału.

2. Występowanie ekdysteroidów w roślinach

Ze względu na obecność ekdysteroidów zarówno u roślin, jak i zwierząt, dokonano umownego podziału na fito- i zooekdysteroidy. U roślin obecność ekdysteroidów po raz pierwszy stwierdzono w 1966 roku, kiedy z liści zatrzałinu (*Podocarpus nakaii* Hayata) wyizolowano ponasterony: A, B, C (ryc. 1). Ponasteron A jest analogiem ekdysonu (ryc. 1) i wykazuje podobną aktywność biologiczną. W latach 1966-1967 wyizolowano: 20-hydroksyekdyson z kory *Podocarpus elatus* R.Br., 20-hydroksyekdyson i inokosteron (ryc. 1) z korzeni *Achyranthes fauriei* H. Lév. & Vaniot, a także polipodin A (20-hydroksyekdyson) i polipodin B (ryc. 1) z kłącza paprotki zwyczajnej (*Polypodium vulgare* L.) (Galbraith, Horn 1966; Jizba i in. 1967; Takemoto i in. 1967).

Fitoekdysteroidy zostały wyizolowane z ponad 150 gatunków roślin wyższych, glonów i paprotników. Występują we wszystkich częściach rośliny, takich jak: kłącza, korzenie, kora, łodygi, pylniki, kwiaty, owoce i nasiona (Moreau i in. 2002). W samej roślinie zawartość zmienia się w okresie wegetacji, fazy rozwoju czy zmian sezonowych. Ponadto ich ilość i profil może także zależeć od lokalizacji geograficznej, środowiska naturalnego oraz odmiany roślin, na którą wpływają regulacje genetyczne.



Rycina 1. Przykłady ekdysteroidów wyizolowanych z roślin

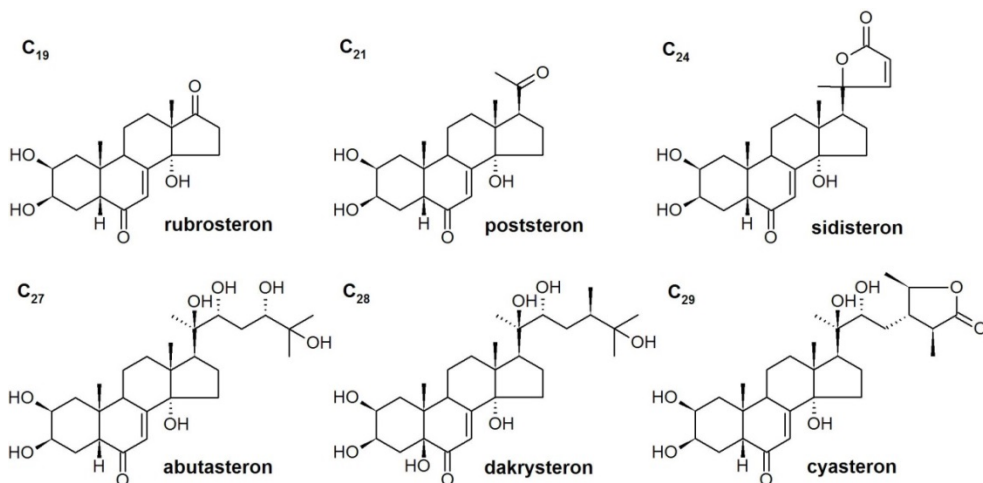
Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smagghe 2009; Bajguz i in. 2015.

Okazało się, że rośliny są bardziej zasobne w ekdysteroidy niż zwierzęta, np. z 15 kg świeżych szpilek cisa pospolitego (*Taxus baccata* L.) wyizolowano 300 mg ekdysonu, co stanowi 500 razy większą ilość niż można otrzymać z tej samej liczby poczwarek jedwabnika morowego (*Bombyx mori*) (Hoffmeister i in. 1967). U roślin zawartość ekdysonu wynosi przeciętnie 0,01-1% suchej masy (Golovatskaya 2004, Bakrim i in. 2008). Jednakże najwyższe stężenie ekdysonu może sięgać nawet 3,2% suchej masy łodygi *Diplocisia glaucescens* (Bl.) Diels. Nieco mniejsze stężenie ekdysonu stwierdzono w kwiatostanie sierpika barwierskiego (*Serratula tinctoria* L. = *Serratula inermis* Gilib.) – 2%. Jedynie kilkanaście z wyizolowanych fitoekdysteroidów, posiada znaczną aktywność biologiczną; pozostałe stanowią metabolity ekdysonu lub 20-hydroksyekdysonu, który jest formą najbardziej aktywną i funkcjonalną, zarówno u roślin, jak i zwierząt (Horn 1989; Lafont 1997, 1998; Baltaev 2000; Dinan 2001).

2. Budowa chemiczna ekdysteroidów

Strukturę chemiczną ekdysteroidów stanowi szkielet 5 α -cholestanu z 6-ketowym pierścieniem B oraz grupą hydroksylową w pozycji C-14 α . Fitoekdysteroidy posiadają bardzo zróżnicowaną strukturę chemiczną, która charakteryzuje się następującymi cechami:

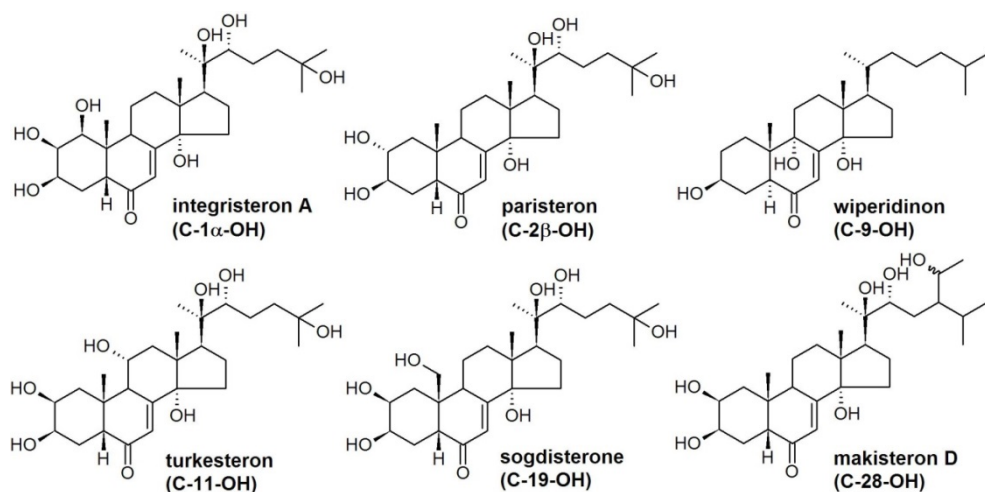
- 1) ogólną liczbą atomów węgla wynoszącą:
 - a) 27, 28 lub 29 (ryc. 2), ponieważ fitoekdysteroidy są pochodnymi różnych fitosteroli;
 - b) 24, 21 lub 19 (ryc. 2), co jest wynikiem rozerwania łańcucha bocznego pomiędzy C-24/C-25 lub C-20/C-22;



Rycina 2. Przykłady C₁₉, C₂₁, C₂₄, C₂₇, C₂₈, C₂₉-ekdysteroidów

Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smaghe 2009; Bajguz i in. 2015.

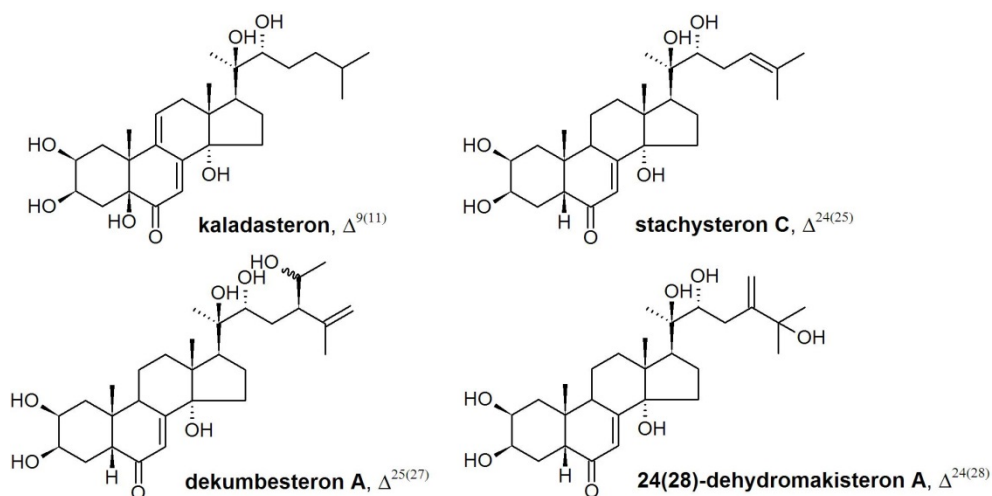
- 2) występowaniem grup hydroksylowych w szkielecie steroidowym w pozycjach: C-1, C-2, C-3, C-5, C-9, C-11, C-12 i C-19 (ryc. 3);
- 3) występowaniem grup hydroksylowych w łańcuchu bocznym w pozycjach: C-20, C-21, C-22, C-24, C-25, C-26, C-28 lub C-29 (ryc. 3);
- 4) przyłączaniem do C-2, C-3, C-20, C-22 lub C-25 następujących kwasów: nieorganicznych (kwasu fosforowego i siarkowego), organicznych (kwasu octowego, benzoowego, cynamonowego i *p*-kumarynowego), cukrów (galaktozy, glukozy i ksylozy) lub acetonidu;



Rycina 3. Przykłady ekdysteroidów z grupą hydroksylową w pierścieniu A/B lub łańcuchu bocznym

Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smagghe 2009; Bajguz i in. 2015.

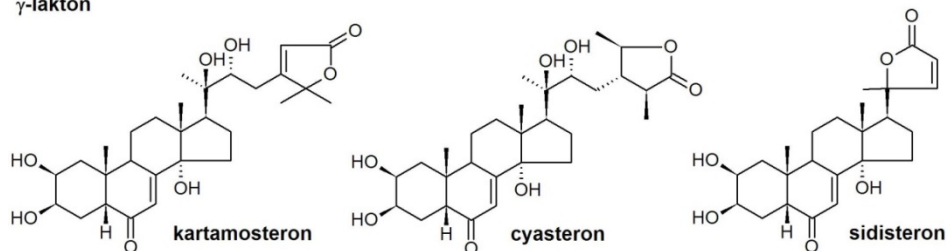
- 5) występowaniem dodatkowego wiązania nienasyconego przy $\Delta^{9(11)}$, $\Delta^{24(25)}$, $\Delta^{25(27)}$ lub $\Delta^{24(28)}$ (ryc. 4);
- 6) wbudowaniem w łańcuch boczny dodatkowego pierścienia γ - lub δ -laktonowego (ryc. 5) (Bajguz i in. 2015).



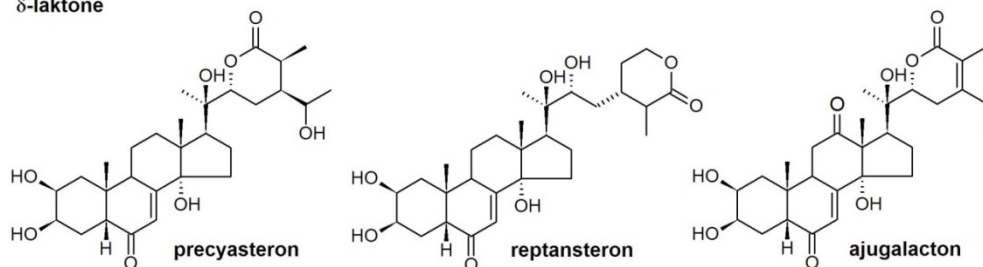
Rycina 4. Przykłady nienasyconych ekdysteroidów

Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smagghe 2009; Bajguz i in. 2015.

γ -lakton

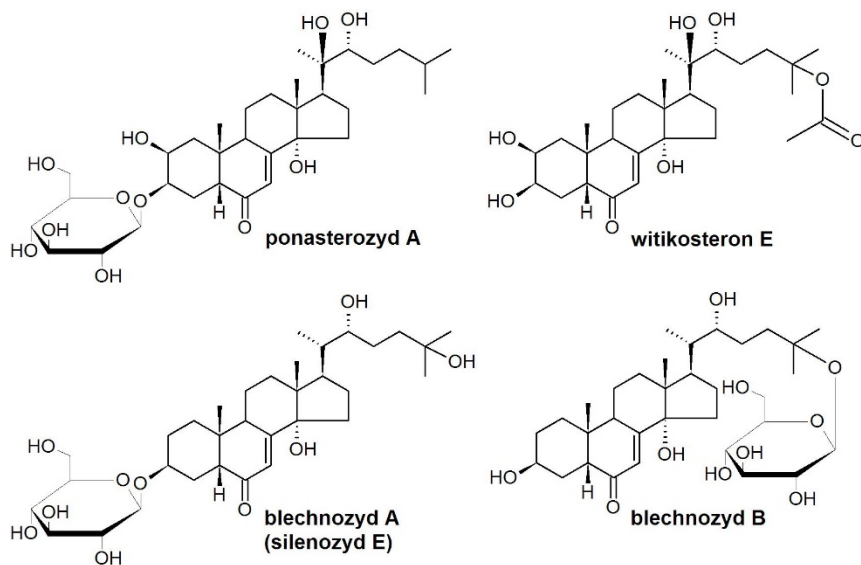


δ -laktone



Rycina 5. Przykłady ekdysteroidów z dodatkowym γ - lub δ -laktonem

Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smagghe 2009; Bajguz i in. 2015.



Rycina 6. Przykłady koniugatów fitoekdysteroidowych

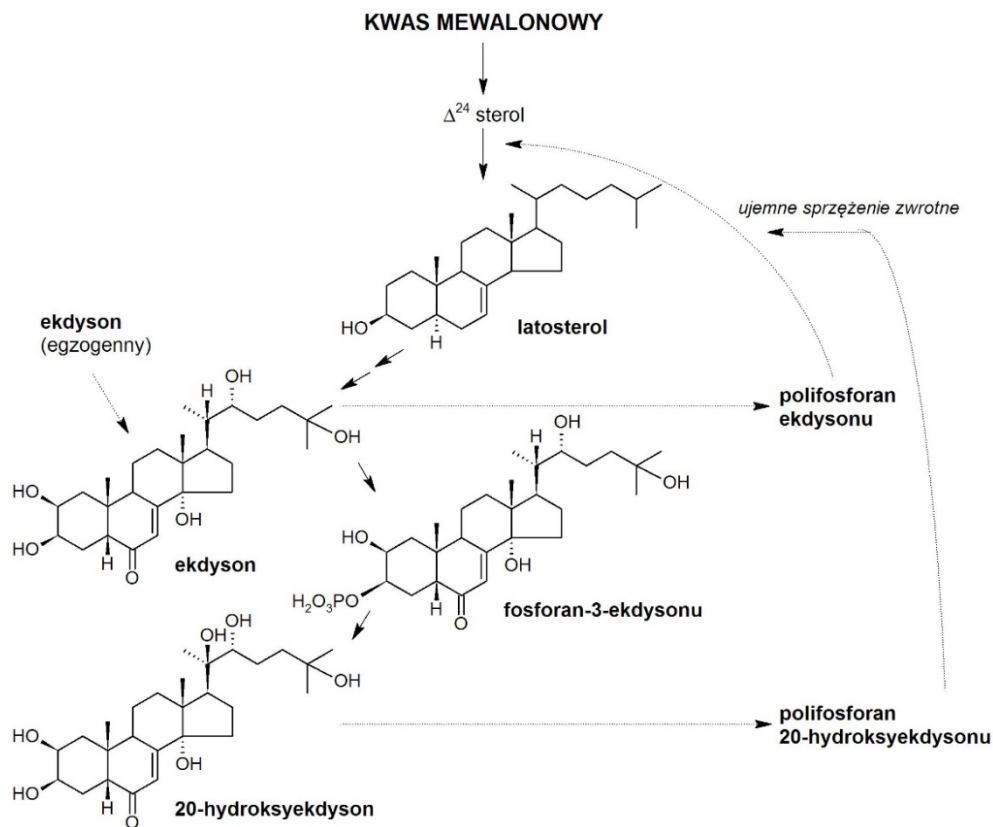
Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Smagghe 2009; Bajguz i in. 2015.

U roślin, w większości przypadków, ekdysteroidy występują w stanie wolnym, jednak znane są przykłady występowania ich w postaci związanej z innymi związkami. Należą do nich, wyizolowany z orlicy pospolitej (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) ponasterozyd A (3-D-glukozyd ponasteronu A), witikosteron E (octan ekdysteronu) z *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, oraz blechonozyd A i B (glukozyd 2-deoksyekdysonu) z podrzenia (*Blechnum minus* (R.Br.) Ettingsh.) (Bajguz i in. 2015) (ryc. 6).

3. Biosynteza ekdysteroidów u roślin

Ekdysteroidy, w zależności od ilości atomów węgla, określone są jako: C_{27} , C_{28} , C_{29} -steroidy. W reakcjach rozszczepienia łańcucha bocznego wyróżniono również szlaki dla: C_{19} , C_{21} , C_{24} . Przykładowo, prekursorem ekdysteroidów C_{27} jest cholesterol, C_{28} – 24-metylocholesterol, C_{29} – 24-etylocholesterol (Baltaev 2000).

Szpinak warzywny (*Spinacia oleracea* L.) jest rośliną modelową w badaniach nad biosyntezą ekdysteroidów (ryc. 7), ich transportu i regulacji. Stwierdzono, że latosterol jest bezpośrednim prekursorem w szlaku biosyntezy ekdysteroidów, który prowadzi do 20-hydroksyekdysonu. Cholesterol ulega przekształceniu w latosterol, który poprzez nieznane związki pośrednie, daje ekdyson. Dalsze jego przekształcenie do 20-hydroksyekdysonu katalizuje 20-monooksygenaza ekdysonowa. Reakcja jest zależna od cytochromu P450 i koenzymu NADPH. Regulacja biosyntezy odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego pochodnych fosforanowych powstałych w wyniku przemian metabolicznych ekdysonu. Stwierdzono również, że ekdyson podany egzogennie, włącza się w szlak biosyntezy, w którym jest przekształcany poprzez fosforan-3-ekdysonu w 20-hydroksyekdyson. Na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, 20-hydroksyekdyson w procesie estryfikacji z fosforanami, jest metabolizowany do cholesterolu (Moreau i in. 2002; Bakrim i in. 2008).



Rycina 7. Szlak biosyntezy ekdysteroidów

Źródło: Lafont 1998; Baltaev 2000; Bakrim i in. 2008; Smaghe 2009.

4. Metabolizm ekdysteroidów u roślin

Cząsteczka 20-hidroksyekdysonu podlega w roślinach wielu reakcjom metabolicznym, które przedstawia tabela 1. Reakcje hydroksylacji ekdysonu w pozycji C-20, tworzą najbardziej aktywną biologicznie formę, występującą u owadów i roślin, jaką jest 20-hidroksyekdyson. Proces utleniania ekdysonu ma miejsce w pozycji C-3, w wyniku czego tworzy się 3-oksoekdyson. Może on redukować się z powrotem do ekdysonu lub do jego 3 α -epimeru.

Tabela 1. Reakcje metaboliczne 20-hydroksyekdysonu

Typ reakcji	Miejsce reakcji (numer atomu węgla)
Przyłączenie grup hydroksylowych	1, 5, 11, 19, 23, 24, 26
Odlączenie grup hydroksylowych	2, 20, 22, 25
Utlenianie	3, 22
Epimeryzacja	3 α / β , 5 α / β
Podstawienie grupy alkilowej	24
Dehydratacja	$\Delta^{9(11)}$, $\Delta^{24(25)}$, $\Delta^{25(26)}$
Rozerwanie łańcucha bocznego	C-24/C-25, C-20/C-22, C-17/C-20
Estryfikacja octanem	2, 3, 22, 25
Estryfikacja benzoesanem	20, 22, 25
Estryfikacja cynamonianem	2
Estryfikacja kumarynianem	3
Estryfikacja siarczanem	22
Eteryfikacja międzycząsteczkowa	C-22/C-25
Eteryfikacja metoksyeterem	25
Eteryfikacja galaktozydem	3, 22
Eteryfikacja glukozydem	3, 25
Eteryfikacja acetonidem	C-2/C-3, C-20/C-22

Źródło: Lafont 1998; Smagghe 2009.

W procesach 3-epimeryzacji ekdysteroidów biorą udział dwa różne enzymy. Pierwszym z nich jest oksydaza ekdysonowa, która katalizuje przemianę ekdysonu lub 20-hydroksyekdysonu do 3-oksoekdysteroidów. Drugim enzymem jest 3 α -reduktaza 3-oksoekdysteroidowa, odpowiedzialna za przemianę 3-oksoekdysteroidów do 3 α -epimerów. Natomiast 3 β -reduktaza katalizuje przemianę 3-oksoekdysteroidów z powrotem do ekdysteroidu wyjściowego (ekdysonu lub 20-hydroksyekdysonu). Ponadto oba enzymy wymagają obecności w komórkach NADH i NADPH. Konjugaty ekdysonu powstają w wyniku reakcji estryfikacji najczęściej w pozycjach: C-2, C-3, C-20, C-22 lub C-25. Natomiast wynikiem rozerwania łańcucha bocznego ekdysonu w pozycjach: C-20/C-22, C-24/C-25 lub C-17/C-20 są związki, takie jak: poststeron, rubrosteron (Lafont 1997, 1998; Baltaev 2000; Dinan 2001; Alexeeva 2004).

5. Aktywność biologiczna ekdysteroidów u roślin

Ekdysteroidy, podobnie jak inne hormony, mają zdolność do przemieszczania się w organizmie roślinnym. Transport ten odbywa się rurkami sitowymi i plazmodesmami komórkowymi. Można wyróżnić dwa sposoby wędrówki ekdysteroidów w roślinie: w postaci wolnej, czyli aktywnej biologicznie, i nieaktywnej, związanej najczęściej z białkami, rzadziej z kwasami tłuszczowymi. Do wnętrza komórki fitoekdysteroidy mogą przenikać na zasadzie transportu aktywnego z udziałem specyficznych receptorów białkowych lub drogą dyfuzji. Akumulacja ekdysteroidów w szpinaku zwyczajnym (*Spinacia oleracea* L.) jest uwarunkowana mechanicznymi uszkodzeniami korzenia lub uszkodzeniami spowodowanymi przez owady. Również okazało się, że ekdysteroidy są stabilne metabolicznie u tych gatunków roślin, u których bardziej pełnią funkcję obronną niż hormonalną (Dinan 2001).

Rola ekdysteroidów w cyklach życiowych roślin nie jest do końca wyjaśniona. Aktywność biologiczna fitoekdysteroidów jest niewielka, a ich działanie stymulujące kiełkowanie nasion i zarodników oraz wzrost elongacyjny roślin znajduje się w granicach 10-15%. 20-Hydroksyekdyson w stężeniu 10^{-8} M zwiększa 2-krotnie intensywność tworzenia heterocyst, 6-krotnie wielkość komórek wegetatywnych oraz zawartość białek i chlorofilu w kulturach cyjanobakterii *Nostoc* (Maršálek i in. 1992). W glonie *Chlorella vulgaris* Beijer. ekdysteroidy (20-hydroksyekdyson, 2-deoksy-20-hydroksyekdyson, 22-octan 20-hydroksyekdysonu, ekdyson) wykazują aktywność w bardzo niskich stężeniach 10^{-15} - 10^{-6} M. Zaobserwowano 2-3-krotny wzrost liczby komórek glonu oraz zwiększenie zawartości kwasów nukleinowych, białek, fosforu, chlorofilu, karotenoidów i cukrów. W stężeniach wyższych od 10^{-6} M ekdysteroidy cechują się toksycznym oddziaływaniem. Mechanizm działania tych związków na poziomie molekularnym jest praktycznie nieznany. Istnieją pewne hipotezy, które mówią o hormonalnej roli ekdysteroidów, ale ich aktywność zależy od struktury chemicznej i stężenia w docelowym miejscu w roślinie. Do czynników strukturalnych, warunkujących wzrost aktywności biologicznej, należą:

1. połączenie *cis* pierścieni A/B;
2. podwójne wiązanie przy Δ^7 oraz grupa ketonowa przy C-6;
3. kompletny łańcuch sterolowy z grupą C-22R-OH oraz dodatkowe grupy alkilowe w pozycji C-24 α ;
4. grupa hydroksylowa w pozycji C-3 β ;
5. dodatkowe grupy hydroksylowe przy C-2 β i C-14 α , a także przy C-20 i C-25 (Bajguz, Koronka 2001; Bajguz, Dinan 2004).

Wysokie stężenia metali ciężkich prowadzą do tworzenia reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak: nadtlenek wodoru, rodniki ponadtlenkowe, rodniki hydroksylowe, rodniki nadtlenkowe, tlen singletowy, itd. Dochodzi wówczas do zniszczenia błony, wskutek uszkodzeń oksydacyjnych, a to z kolei wpływa na poziom antyoksydantów i metaloenzymów lub enzymów antyoksydacyjnych. Duże stężenie metali ciężkich w środowisku powoduje wzrost akumulacji RFT, co utrudnia ich detoksyfikację. Równowaga między produkcją i detoksykacją RFT możliwa jest dzięki enzymom antyoksydacyjnym usuwającym RFT, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa, reduktaza glutationowa, reduktaza dehydroaskorbinanowa, reduktaza monodehydroaskorbinianowa i peroksydaza gwajakolu (Gupta, Sandalio 2012; Ahmad 2016). Zastosowanie ekdysteroidów zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach *Chlorella vulgaris*, w siewkach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) narażonych na działanie ołowiu. Ekdysteroidy utrzymują zmieniony stan redoks komórek, regulując aktywność wyżej wymienionych enzymów antyoksydacyjnych (Bajguz, Godlewska-Zylkiewicz 2004; Lamhamdi i in. 2016). Ponadto, w odpowiedzi na działanie ołowiu w *Chlorella vulgaris*, ekdysteroidy przyspieszają syntezę fitochelatyn, które ułatwiają chelatację jonów metalu w cytozolu lub ich kompartmentację w wakuolach. Stwierdzono, że wzmożona synteza fitochelatyn przyczyniła się do zmniejszenia zawartości ołowiu, równocześnie zwiększyło się tempo wzrostu i rozwoju glonu. Fitochelatyny syntezowane były w ciągu pierwszych kilkunastu godzin od kontaktu z ołowiem (Bajguz, Godlewska-Zylkiewicz 2004).

Aktywność biologiczna fitoekdysteroidów, ponasteronu A, 20-hydroksyekdysonu i inokosteronu, wykazuje pewne podobieństwo do giberelin. W sadzonkach ryżu siewnego (*Oryza sativa* L.) ekdysteroidy te stymulowały wzrost drugiego międzywęźla liścia oraz korzeni. Z kolei 20-hydroksyekdyson nie wykazywał żadnej aktywności biologicznej w testach na aktywność auksyn (test wydłużenia liścienia pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), giberelin (test karłowatości kukurydzy (*Zea mays* L.) i ryżu) oraz cytokinin (test wydłużenia kalusa tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) (Macháčková i in. 1995). Jednocześnie związek ten nie posiadał aktywności synergistycznej czy antagonistycznej. Stwierdzono natomiast, że ekdysteroidy wykazują pewną analogię działania w stosunku do brassinosteroidów – hormonów roślinnych. W teście wydłużeniowym hypokotylu ogórka (*Cucumis sativus* L.), 20-hydroksyekdyson posiadał aktywność podobną do 24-epibrassinolidu (Golovatskaya 2004). 20-Hydroksyekdyson w niewielkim stopniu stymuluje kwitnienie rzepnia pensylwańskiego (*Xanthium pennsylvanicum* Gand.) (Jacobs, Suthers 1971), podczas gdy hamuje procesy formowania się kwiatów żeńskich dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.) (Felippe 1980). Stymulujący wpływ fitoekdysteroidów na po-

działy mitotyczne wykazano w komórkach merystematycznych paprotki zwyczajnej (*Polypodium vulgare* L.) (Grzybek 1983).

Ekdysteroidy posiadają znaczenie farmakologiczne. Większość środków wzmacniających oraz preparatów o działaniu adaptacyjnym i antydepresyjnym bazuje na szczodraku krokoszowanym (*Leuzea carthamoides* (Willd.) DC.), który zawiera wysokie stężenie ekdysteroidów. Ponadto 20-hydroksyekdyson posiada działanie spermatotwórcze oraz wykazuje wpływ na aktywność seksualną u samców wielu gryzoni. Z kwiatów dąbrowki (*Ajuga decumbens* L.) wyizolowano cyjasteron i polipodin B. Obydwa fitoekdysteroidy hamują indukcję wczesnego antygeny wirusa Epsteina-Barr, powodującego powstanie u ludzi nowotworu, np. chłonnika Burkitta oraz powodującego rozwój komórek nowotworowych skóry u myszy. Egzogennie podany cyjasteron do nowotworowych komórek naskórka myszy ma zdolność zahamowania procesu karcenogenezy, zainicjowanego przez 7,12-dimetylobenzantracen i 13-octan 12-O-tetradekanoiloforbolu. Stwierdzono brak aktywności cytotoksycznej ekdysteroidów na rozwój eksperymentalnych nowotworów KB (*nasopharynx carcinoma*) i HeLa (*carcinoma cervicis uteri*) w hodowli *in vitro*. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że ekdysteroidy posiadają właściwości przeciwczyrnicze i przeciwbakteryjne. Hamują rozwój *Candida guilliermondi*, *Candida albicans*, *Candida crusei*, *Candida pseudotropicalis* i *Candida tropicalis*, oraz wzrost *Staphylococcus aureus* spp. i szczepów bakterii Gram-ujemnych (Bajguz i in. 2015).

Fitoekdysteroidy wykazują znacznie większą aktywność biologiczną niż zoоекdysteroidy syntetyzowane przez owady i niektóre skorupiaki. Ekdysteroidy roślinne stanowią grupę związków pełniących funkcję obronną, gdyż po przedostaniu się do organizmu owada, powodują zaburzenia w procesach rozwojowych. Jest to spowodowane tym, że fitoekdysteroidy, po przeniknięciu z pokarmu do organizmu stawonogów, nie ulegają inaktywacji bądź degradacji, a wprowadzone w nadmiarze, w odpowiednim momencie cyklu metamorfozy, wywołują śmiertelne zaburzenia w tym procesie. Roślina produkuje te związki jako substancje obronne przeciwko owadom, gdyż po ich spożyciu, stężenie hormonu w organizmie owada wzrasta i powoduje przedwczesne linienie. Traktowanie fitoekdysteroidami form larwalnych powoduje powstanie gigantycznych osobników niezdolnych do życia. Niekiedy gąsienice przepoczwarzają się, nie wytwarzając kokonów. Do najbardziej podatnych owadów na działanie ekdysteroidów należą: gąsienice jedwabnika morwowego, bielinka kapustnika (*Pieris brassicae*) oraz larwy muchy tse-tse (*Glossina morsitans*). Oprócz hamującego oddziaływania fitoekdysteroidów na procesy metamorfozy, wykazano także toksyczny wpływ tych związków na dorosłe formy owadów; ekdyson hamuje na przykład rozwój jajników muchy domowej (*Musca domestica*),

zmniejszając jej rozrodczość. Fitoekdysteroidy mogą więc stanowić chemiczną obronę przeciwko niektórym owadom (Smagge 2009).

6. Podsumowanie

Procesy fizjologiczne i metaboliczne zachodzące nieustannie w organizmach żywych są bardzo złożone, uwarunkowane genetycznie, ale zależą także od wielu czynników środowiskowych. Procesy te są regulowane przez hormony roślinne, substancje sygnałowe oraz inne czynniki o działaniu regulatorowym (Davies 2004). Oprócz fitohormonów, coraz częściej stwierdza się występowanie typowych hormonów zwierzęcych, związków pokrewnych lub ich analogów chemicznych. Należą do nich ekdysteroidy – hormony linienia owadów i innych bezkręgowców. Stwierdzono, że ekdyson wydzielany przez owady do środowiska wodnego, odgrywa istotną rolę w kształtowaniu stosunków ekologicznych i interakcji pomiędzy organizmami w ekosystemach wodnych. Ponadto istnieją liczne dowody doświadczalne, które wskazują, że hormony te stanowią główny mechanizm obronny uruchamiany przez rośliny do walki z owadami (Zabza 1989; Harborne 1992).

Literatura

- Ahmad P. (red.), 2016. Plant metal interaction. Emerging remediation techniques. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Alexeeva L.I., 2004. Ecdysone 20-monooxygenase activity of cytochrome P450 in *Ajuga reptans* plants and cell culture. Appl. Biochem. Microbiol., 40: 135-139.
- Bajguz A., Bąkała I., Talarek M., 2015. Ecdysteroids in plant and their pharmacological effects in vertebrates and humans. [W:] Atta-ur-Rahman (red.) Studies in Natural Products Chemistry Vol. 45. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 121-145.
- Bajguz A., Dinan L., 2004. Effects of ecdysteroids on *Chlorella vulgaris*. Physiol. Plant., 121: 349-357.
- Bajguz A., Godlewska-Zylkiewicz B., 2004. Protective role of 20-hydroxyecdysone against lead stress in *Chlorella vulgaris* cultures. Phytochemistry, 65: 711-720.
- Bajguz A., Koronka A., 2001. Effect of ecdysone application on the growth and biochemical changes in *Chlorella vulgaris* cells. Plant Physiol. Biochem., 39: 707-715.
- Bakrim A., Maria A., Sayah F., Lafont R., Takvorian N., 2008. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): biosynthesis, transport and regulation of levels. Plant Physiol. Biochem., 46: 844-854.

- Baltaev U.E., 2000. Phytoecdysteroids: structure, sources and biosynthesis in plants. Russ. J. Plant Physiol., 26: 799-831.
- Davies P.J. (red.), 2004. Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action! Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Dinan L., 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. Phytochemistry, 57: 325-339.
- Felippe G.M., 1980. Insect growth hormones and their effects on some plants. Ciencia Cultura, 32: 1384-1390.
- Galbraith M.N., Horn D.H.S., 1966. An insect-moulting hormone from a plant. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 905-906.
- Golovatskaya I.F., 2004. Effect of ecdysterone on morphological and physiological processes in plants. Russ. J. Plant Physiol., 51: 407-413.
- Grzybek J., 1983. Fitochemiczne i biologiczne badania krajowego gatunku *Polypodium vulgare* L. Acta Polon. Pharm., 40: 259-263.
- Gupta D.K., Sandalio L.M. (red.), 2012. Metal toxicity in plants: perception, signaling and remediation. Springer-Verlag, Berlin.
- Harborne J.B., 1992. Introduction to ecological biochemistry. Acad. Press, London.
- Hoffmeister H., Heinrich G., Staal G.B., Van der Burg W.J., 1967. Über das vorkommen von ecdysterone in eiben. Naturwissenschaften, 54: 471.
- Horn D.H.S., 1989. Historical introduction. [W:] Koolman J. (red.), Ecdysone: from chemistry to mode of action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 8-19.
- Jacobs W.P., Suthers H.B., 1971. The culture of apical buds of *Xanthium* and their use as a bioassays for flowering activity of ecdysterone. Amer. J. Bot., 58: 836-843.
- Jizba J., Herout V., Sorm F., 1967. Isolation of ecdysterone (crustecdysone) from *Polypodium vulgare* L. rhizomes. Tetrahedron Lett., 1689-1691.
- Lafont R., 1997. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. Arch. Insect Biochem. Physiol., 35: 3-20.
- Lafont R., 1998. Phytoecdysteroids in world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. Russ. J. Plant Physiol., 45: 276-295.
- Lamhamdi M., Lafont R., Rharrabe K., Sayah F., Aarab A., Bakrim A., 2016. 20-Hydroxyecdysone protects wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) against lead stress. Plant Physiol. Biochem., 98: 64-71.
- Macháčková I., Vagner M., Sláma K., 1995. Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants. Eur. J. Entomol., 92: 309-316.
- Maršálek B., Šimek M., Smith R.J., 1992. The effect of ecdysterone on the cyanobacterium *Nostoc 6720*. Z. Naturforsch., 47c: 726-730.

- Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols and they conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, 41: 457-500.
- Smagghe G. (red.), 2009. Ecdysone: structures and functions. Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht.
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., 1967. Isolation of the moulting hormones of insects from *Achyranthes radix*. *Yakugaku Zasshi*, 87: 325-327.
- Zabza A., 1989. Chemiczne podstawy oddziaływania roślin-owad. *Kosmos*, 38: 155-177.

5 Modyfikacja endogennego stężenia tlenu azotu w regulacji spoczynku nasion

Katarzyna **Ciąćka*** / Urszula **Krasuska** / Agnieszka **Gniazdowska**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Rolnictwa i Biologii,
Katedra Fizjologii Roślin

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

* e-mail: katarzyna_ciaccka@sggw.pl

Streszczenie: Spoczynek i kiełkowanie nasion pozostają pod kontrolą warunków środowiska, takich jak: dostępność wody, temperatura, światło. Dodatkowo, procesy te regulowane są przez hormony roślinne, a także cząsteczki sygnałowe, do których należą reaktywne formy tlenu i reaktywne formy azotu. Tlenek azotu (NO) uznawany jest za jeden z głównych czynników decydujących o stanie spoczynku i/lub zdolności kiełkowania nasion. Stężenie NO, mieszczące się w zakresie określanym przez tzw. drzwi nitrozacyjne, warunkujące prawidłowy przebieg procesu kiełkowania nasion i wykształcenie siewki, utrzymywane jest przez komórkowy system biosyntezy i zmiatania tej cząsteczki. Jedną z dróg przemian NO jest tworzenie *S*-nitrozotoli (SNO). Do naturalnie występujących, niskocząsteczkowych SNO, należą: *S*-nitrozoglutation (GSNO), *S*-nitrozocysteina oraz *S*-nitrozohomocysteina. Endogennie powstające SNO, stanowią magazyn i formę transportową NO, są także substratami dla reduktazy GSNO (GSNOR). GSNO z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe, zatem stanowi łatwo dostępne źródło NO. Szlakiem sygnałnym, poprzez który GSNO wykazuje aktywność biologiczną, jest potranslacyjna modyfikacja białek w wyniku *S*-nitrozylacji grup sulfhydrylowych aminokwasów. Utrzymanie dynamicznej komórkowej równowagi SNO zapewnia aktywność GSNOR. Enzym ten katalizuje zależną od NADH redukcję GSNO – do GSSG i NH₃. W pracy przedstawiono drogi biosyntezy NO w kiełkujących nasionach, znaczenie NO w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni oraz rolę GSNOR w modulacji komórkowego stężenia NO.

Słowa kluczowe: syntaza tlenu azotu, reduktaza *S*-nitrozoglutationu, *S*-nitrozoglutation, kiełkowanie nasion

1. Drogi biosyntezy NO w kiełkujących nasionach

Tlenek azotu (NO) jest aktywnym oksydoredukcyjnie, niskocząsteczkowym związkiem chemicznym, należącym do reaktywnych form azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*). Jako wolny rodnik, posiada niesparowany elektron na atomie azotu i łatwo wchodzi w reakcje chemiczne z innymi związkami. Synteza RNS w komórkach odbywa się na terenie błony komórkowej, cytoplazmy, mitochondriów, chloroplastów, peroksysomów i w apoplacie. Homeostaza NO utrzymywana jest dzięki zbilansowaniu biosyntezy i zmiatania tej cząsteczki (ryc. 1 i 2). Synteza NO w roślinach obejmuje zarówno drogi redukcyjne, jak i oksydacyjne, enzymatyczne i nieenzymatyczne (Gupta i Igamberdiev 2015).

Badania ostatnich lat wskazują, że istotną rolę jako miejsce syntezy NO odgrywają mitochondria. Ta droga może być szczególnie ważna w pierwszych etapach kiełkowania nasion, w czasie imbibicji, gdy w komórkach zarodka panują warunki hipoksji. W mitochondriach tworzenie NO zachodzi w wyniku redukcji NO_2^- – w kompleksie IV i kompleksie III (Igamberdiev i in. 2010).

Nieenzymatyczna biosynteza NO, bazująca na dostępności NO_2^- , które w kwaśnym pH i przy udziale reduktantów (np. askorbinianu) są przekształcane do NO, jest charakterystyczna dla apoplastu i wykazano ją np. w warstwie aleuronowej kiełkujących ziarniaków jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) (Bethke i in. 2004).

Reduktaza azotanowa uznawana jest za podstawowy enzym odpowiadający za syntezę NO w cytoplazmie, katalizuje redukcję NO_2^- do NO w obecności NAD(P)H. Warunki sprzyjające tej reakcji to przede wszystkim obniżona dostępność tlenu oraz podwyższone stężenie NO_2^- (Gupta i Igamberdiev 2015). Udział tej drogi, jako zapewniającej powstawanie NO w nasionach, sugerują wyniki badań uzyskane na kiełkujących ziarniakach sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Simontacchi i in. 2004).

Podczas imbibicji i fazy katabolicznej, oksydacyjne drogi biosyntezy NO wydają się odgrywać mniej istotną rolę, z uwagi na niskie stężenie tlenu w tkankach zarodka, jednak w fazie anabolicznej i okresie kiedy dochodzi do przebicia okryw nasiennych przez rosnący korzeń zarodkowy, a także w czasie wzrostu młodej siewki, mogą być dominujące. Enzymem wzbudzającym mnóstwo kontrowersji jest syntaza NO (NOS), występująca powszechnie w organizmach zwierzęcych, w tym w organizmie człowieka (Frohlich i Durner 2011). NOS katalizuje reakcję przekształcenia Arg do NO i cytruliny (Mur i in. 2013) i wymaga obecności wielu ko-faktorów. Obecność białka NOS w tkankach organizmów fotosyntetyzujących wykazano, jak dotąd, jedynie u zielenicy *Ostreococcus tauri* (Foresi i in. 2010). Wyizolowano enzym i wykazano 45% zgodność tego białka z ludzką NOS (Foresi

i in. 2010). Nie udało się jednak wyizolować NOS z innych roślin wyższych. Z drugiej strony, w ekstraktach roślinnych wykazano aktywność charakterystyczną dla ssaczych NOS, zlokalizowaną głównie w peroksysomach (Corpas i in. 2006; Mur i in. 2013). Stąd, w badaniach dotyczących tkanek, roślin mówi się o reakcji NOS-podobnej i enzymach o aktywności NOS-podobnej. Podwyższoną aktywność NOS-podobną oznaczono w osiach kielkujących zarodków jabłoni (*Malus domestica* Borkh.), których spoczynek przerywano w wyniku imbibicji w roztworze Arg lub krótkotrwałym traktowaniem donorami NO (Krasuska i in. 2016).

Przedział komórkowy	Potencjalne drogi syntezy NO	
	Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (kompleks III, IV)	✓?
	Aktywność NOS–podobna (utlenianie argininy)	?
	Reakcja nieenzymatyczna (w kwaśnym pH redukcja NO ₂ ⁻)	✓
	Związana z błoną reduktaza azotanowa (NI-NOR; redukcja NO ₂ ⁻)	?
	Reakcja hydroksyloamin z O ₂ ⁻	?
	Aktywność oksydazy poliaminowej lub innego enzymu zależnego od poliamin	✓?
	Reduktaza azotanowa (redukcja NO ₂ ⁻)	✓
	Aktywność NOS–podobna (utlenianie argininy)	✓
	Oksydoreduktaza ksantynowa (redukcja NO ₂ ⁻)	?

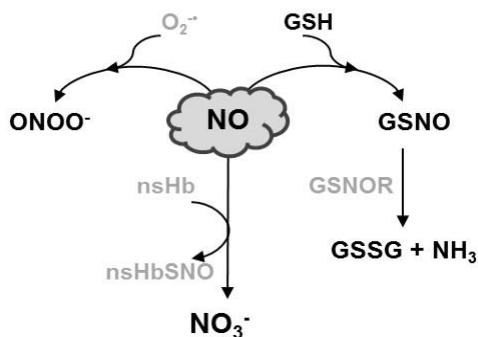
Rycina 1. Wewnątrzkomórkowe źródła biosyntezy NO w komórce roślinnej

Legenda: szarym znaczkiem zaznaczono drogi biosyntezy NO, których aktywność zaobserwowano w nasionach oraz reakcje syntezy NO potencjalnie możliwe w nasionach

Źródło: opracowanie własne na podstawie Bethke i in. (2004), Simontacchi i in. (2004), Igamberdiev i in. (2010), Krasuska i in. (2016) oraz Yu i in. (2014).

U roślin sugeruje się występowanie także innych, zależnych od Arg dróg syntezy NO, w które mogą być zaangażowane poliaminy. Związki te mogłyby ulegać przekształceniom do NO na drodze nieenzymatycznej (bezpośrednio), lub w wyniku aktywności jakiegoś hipotetycznego enzymu (Gupta i in. 2011). Z kolei, reakcja hydroksyloamin z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$), w wyniku której powstaje NO, została potwierdzona u bakterii *Nitrosomonas* (Gupta i in. 2011). Do innych enzymów zaangażowanych w syntezę NO, należą również: reduktaza azotyn: NO (ang. *nitrite-NO reductase*, Ni-NOR) – zidentyfikowana u tytoniu (*Nicotiana tabaccum* L.) i związana z błonami komórkowymi korzeni (Stöhr i in. 2001); oksydoreduktaza ksantynowa (XOR) – wykryta w peroksosomach liści grochu (*Pisum sativum* L.) (Yu i in. 2014).

W celu utrzymania równowagi stężenia NO w komórkach, istnieją związki zdolne do usuwania NO. Do podstawowych zmiataczy NO należą niesymbiotyczne hemoglobiny (nsHb) oraz glutation (GSH) (ryc. 2). Ważną rolę w regulacji zawartości NO odgrywają także reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) (ryc. 2). Produkcja NO w nasionach, podobnie jak w przypadku innych organów rośliny podlegających okresowym niedoborom tlenu, jest skorelowana ze wzmożoną ekspresją nsHb klasy 1, które pojawiają się po około 2 godzinach imbibicji (Nie i Hill 1997). Sugeruje to, że mogą one odgrywać istotną rolę w modulacji wewnątrzkomórkowego stężenia NO w kiełkujących nasionach.



Rycina 2. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy usuwania/zmiatania NO w komórce roślinnej

Źródło: opracowanie własne.

2. NO jako regulator ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni

Spora część badań nad funkcją NO w organizmach roślinnych dotyczy regulacji kiełkowania nasion (Gniazdowska i Bogatek 2007; Sirova i in. 2011; Arc i in. 2013). Wykazano, że traktowanie nasion wielu gatunków roślin różnorodnymi donorami NO znosi spoczynek i stymuluje kiełkowanie, nawet w niekorzystnych warunkach środowiska. W regulacji kiełkowania nasion, sygnałowe działanie NO opiera się na współdziałaniu z fitohormonami (gibereliną, etylenem i kwasem abscysynowym) oraz innymi związkami drobnocząsteczkowymi biorącymi udział w przekazywaniu informacji, takimi jak: H_2O_2 i cyjanowodór (HCN) (Gniazdowska i Bogatek 2007; Gniazdowska i in. 2010).

W Katedrze Fizjologii Roślin SGGW w Warszawie od lat prowadzone są badania dotyczące znaczenia NO w regulacji kiełkowania nasion jabłoni, obarczonych głębokim spoczynkiem zarodkowym. Wykazano, że krótkotrwałe (3-godzinne) traktowanie spoczynkowych zarodków jabłoni donorami NO, prowadzi do ustąpienia spoczynku i prawidłowego kiełkowania, co następuje w wyniku zmiany bilansu hormonalnego kwasu abscysynowego i etylenu oraz przejściowej, wzmożonej produkcji ROS (Gniazdowska i in. 2010). Można zatem uznać, że krótkotrwałe traktowanie zarodków NO zastępuje działanie niskiej temperatury, stosowanej w czasie stratyfikacji, koniecznej do ustąpienia wszystkich symptomów spoczynku. Podczas pierwszej fazy chłodnej stratyfikacji oraz po zakończeniu stratyfikacji nasion jabłoni, dochodzi zarówno do wzrostu emisji endogennego NO, jak i produkcji ROS (Dębska i in. 2013). Korzystne oddziaływanie poliamin (putrescyny i spermidyny) oraz Arg na kiełkowanie spoczynkowych zarodków jabłoni wiąże się ze stymulacją emisji NO (Krasuska i in. 2014). Fakt ten potwierdza doniesienia o funkcjonowaniu zależnej od poliamin lub indukowanej przez poliaminy drogi biosyntezy tej cząsteczki u roślin (Tun i in. 2006). Z drugiej strony, utrzymanie spoczynku poprzez podanie inhibitorów biosyntezy NO, np. niebiałkowego kwasu – kanawaniny, będącej antymetabolitem Arg, jest skorelowane z obniżeniem emisji NO (Krasuska i in. 2016). Podobny efekt obserwowany jest po imbibicji zarodków w roztworze estru metylowego ω -nitro-L-argininy (L-NAME). Jednocześnie dla zarodków jabłoni wykazano zależność pomiędzy głębokością spoczynku a aktywnością NOS-podobną, która jest znacznie wyższa w kiełkujących niż w zarodkach o pogłębionym lub utrzymanym spoczynku (Krasuska i in. 2016). Oddziaływanie NO podczas usuwania spoczynku zarodków jabłoni powiązane jest także ze zmianą zawartości potranslacyjnie modyfikowanych białek (karbonylowa-

nych i nitrowanych) (Krasuska i in. 2014, 2016). Zaproponowany model „drzwi nitrozacyjnych” zakłada, że NO pełni rolę „klucza” do „drzwi” reprezentowanych przez potencjalne cele NO (głównie białka i lipidy), których modyfikacja „otwiera drzwi”, to znaczy uruchamia kaskadę sygnałową pozwalającą na wyjście nasion ze stanu spoczynku i uzyskanie stanu gotowości do kiełkowania (Krasuska i in. 2015).

3. Znaczenie reduktazy nitrozoglutationu w regulacji komórkowego stężenia NO

Homeostaza NO w komórkach utrzymywana jest poprzez zbilansowanie produkcji i wiązania tej cząsteczki. Jedną z dróg zmiatania NO w komórkach jest tworzenie S-nitrozotioili (SNO) (ryc. 2). SNO powstają w reakcji kationu nitrozowego (NO^+) i innych RNS z anionami tiolanowymi (RS^-). Do naturalnie występujących w komórkach niskocząsteczkowych SNO, należą: S-nitrozoglutation (GSNO), S-nitrozocysteina oraz S-nitrozohomocysteina. SNO, biorą udział w magazynowaniu i transporcie NO, i stanowią dominującą postać redoksową NO. SNO są także substratami dla reduktazy GSNO (GSNOR), reduktazy tioredoksyny, oksydazy ksantynowej. Powstający endogennie NO może być zatem magazynowany w postaci GSNO, a następnie – z udziałem reduktazy tioredoksyny – ulegać homolitycznemu rozszczepieniu do NO i GSH. Uwalnianie NO z SNO może następować również z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD) (Lindermayr i Durner 2009.). GSNO, w przeciwieństwie do GSH, z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe. W związku z tym może być dla komórki zarówno źródłem GSH, jak i NO. GSNO jest postrzegany też jako cząsteczka sygnałowa, gdyż związek ten należy na przykład do aktywatorów cyklazy guanylanowej. Innym szlakiem sygnałowym, poprzez który GSNO wykazuje swoją aktywność biologiczną, jest kowalencyjna modyfikacja białek, w wyniku S-nitrozylacji grup sulfhydrylowych aminokwasów.

Utrzymanie dynamicznej komórkowej równowagi SNO zapewnia aktywność GSNOR (Petrivsky i in. 2015). Jest to alkoholowa dehydrogenaza 3 (ADH3), występująca u wszystkich organizmów pro- i eukariotycznych. Odpowiada ona za detoksykację formaldehydu, katalizując reakcję: formaldehyd + GSH + NAD^+ → S-formylglutation + NADH + H^+ . Enzym ten katalizuje też zależną od NADH redukcję GSNO do utlenionej formy glutationu (GSSG) i NH_3 , która może być uznawana za reakcję denitrozylacji. Zatem aktywność tego enzymu kontroluje wewnątrzkomórkowe stężenie GSNO, a tym samym wpływa na zawartość i homeo-

stazę NO, a także pośrednio oddziałuje na utrzymanie komórkowego stanu redoks (Leterrier i in. 2011). Jest to enzym konserwatywny ewolucyjnie, występujący u roślin jednoliściennych oraz dwuliściennych. U rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) białko to jest kodowane przez jeden gen (AtGSNOR1), który podlega zróżnicowanej ekspresji w różnych organach rośliny (Leterrier i in. 2011). Zaburzenia ekspresji genu kodującego GSNOR (nadekspresja lub jej obniżenie) powodują poważne zmiany fenotypowe siewek, głównie skrócenie korzenia, zmiany kształtu liści, zaburzenia dominacji wierzchołkowej (Kwon i in. 2012).

GSNOR to cytozolowy, homodimeryczny enzym zawierający cynk, którego obie podjednostki mają masę cząsteczkową około 40 kDa (Kubienova i in. 2013). Każdy monomer enzymu składa się z domeny katalitycznej i z domeny koenzymowej, oraz zawiera dwa atomy cynku. Jony cynkowe koordynują grupy hydroksylowe i karbonylowe substratu (Sanghani i in. 2002). GSNOR występuje głównie w cytozolu, jednakże zlokalizowano ten enzym również w jądrze komórkowym i peroksosomach (Fernández i in. 2003; Reumann i in. 2007).

Rolę GSNOR badano, jak dotąd, przede wszystkim u roślin poddanych działaniu stresów biotycznych i abiotycznych (Feechan i in. 2005; Corpas i in. 2011; Malik i in. 2011). Transgeniczne rośliny rzodkiewnika o obniżonej zawartości białka GSNOR były bardziej odporne na *Peronospora parasitica* (Rusterucci i in. 2007). Obecność metali ciężkich wpływała na aktywność GSNOR np. u grochu 50 μ M kadm powodował redukcję aktywności białka i transkrypcji genu (Barroso i in. 2006). Istnieją także przesłanki do wiązania aktywności GSNOR z termotolerancją (Lee i in. 2008). W hipokotylach siewek słonecznika (*Helianthus annuus* L.), poddanych działaniu wysokiej temperatury (38°C), obserwowano obniżoną aktywność GSNOR, a także niższą zawartość tego białka i ekspresję genu, czemu towarzyszyła akumulacja SNO (Leterrier i in. 2011). Zmiany aktywności GSNOR obserwowano także w warunkach chłodu. U siewek grochu i pieprzu (*Capsicum annuum* L.) temperatura 8°C powodowała wzrost aktywności enzymu (Corpas i in. 2007; Airaki i in. 2012). Wykazano także, że podanie donorów NO powodowało wzrost aktywności GSNOR np. u bakterii brodawkowych *Bradyrhizobium* sp. i *S. meliloti* (Maiti i in. 2012). Bardzo nieliczne są dane na temat aktywności GSNOR i zawartości SNO w nasionach. Wysoką aktywność GSNOR wykazano we wczesnych etapach kiełkowania nasion grochu, zwłaszcza po 24 godzinach imbibicji (Shafqat i in. 1996). Obecność trzech izoform tego enzymu potwierdzono w nasionach buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) (Catusse i in. 2008). Mutanty rzodkiewnika o zmienionej ekspresji genu kodującego GSNOR charakteryzowały zaburzenia formowania nasion i obniżenie ilości powstających nasion (Kwon i in. 2012). Dodatkowo, mutanty *atgsnor1-3* o obniżonej ekspresji AtGSNOR1 kiełkowały

wolniej niż nasiona roślin dzikich i były bardzo wrażliwe na auksynę. Wyciszenie genu kodującego GSNOR i tym samym obniżenie aktywności GSNOR u rzodkiewnika było skorelowane z ograniczeniem biosyntezy etylenu (Wünsche i in. 2011). Mutanty pozbawione genów kodujących GSNOR są wrażliwe na stres nitrozacyjny, co potwierdza, że enzym ten jest kluczowy dla obrony organizmu przed skutkami stresu spowodowanymi nadmiarem NO.

Aktywność i zawartość GSNOR zbadano w ekstrakcie białkowym, uzyskanym z osi zarodkowych spoczynkowych i stratyfikowanych zarodków jabłoni (ryc. 3). Różnią się one głębokością spoczynku. Zarodki spoczynkowe nie kiełkują, natomiast zarodki poddane 90-dniowej chłodnej stratyfikacji kiełkują szybko (100% po około 48 godzinach imbibicji). Jako materiał badawczy, użyto osi zarodków wyizolowanych z nasion stratyfikowanych przez 90 dni, które były wysuszone, a następnie poddane 24-godzinnej imbibicji; kontrolę stanowiły osie zarodków izolowanych ze spoczynkowych nasion, także po 24-godzinnej imbibicji. Nie zaobserwowano różnicy w zawartości białka GSNOR, natomiast aktywność enzymu była nieznacznie niższa w osiach kiełkujących zarodków stratyfikowanych (ryc. 3).

Zarodki jabłoni izolowane z nasion	Zawartość GSNOR	Aktywność GSNOR (nmol NADH min ⁻¹ mg ⁻¹ białka)
spoczynkowych 	 (128,9 ± 0,3)	1,1 ± 0,24
stratyfikowanych 	 (131,2 ± 0,4)	0,77 ± 0,21

Rycina 3. Aktywność i zawartość GSNOR w ekstraktach z osi zarodków spoczynkowych i stratyfikowanych wyizolowanych z nasion po 24-godzinnej imbibicji

Uwagi: Zarodki izolowane z nasion stratyfikowanych charakteryzuje obecność wyraźnie wydłużonych osi zarodkowych (fotografie typowych zarodków). Zawartość białka oszacowano metodą dot blot, stosując przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko GSNOR (AS09647, Agrisera) oraz przeciwciała drugorzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą (AS101458, Agrisera), na membranę nitrocelulozową nanoszono ekstrakt zawierający 7 µg białka. W nawiasach podano wynik analizy densytometrycznej. Aktywność GSNOR zmierzono metodą spektrofotometryczną (Sakamoto i in. 2002). Podano wartości średnie z trzech powtórzeń biologicznych.

Źródło: badania własne.

Wyniki te potwierdzają, że GSNOR jest białkiem konstytutywnym, stanowi niezbędny element komórkowego systemu regulującego stężenie NO, lecz jego aktywność raczej nie powinna być stosowana jako marker zdolności kiełkowania nasion. Ciekawe natomiast byłoby zbadanie zmian aktywności białka w czasie stratyfikacji chłodnej nasion, szczególnie biorąc pod uwagę obserwowane w czasie stratyfikacji fluktuacje emisji NO (Dębska i in. 2014) i wzmiankowane wcześniej doniesienia o stymulacji aktywności enzymu w warunkach chłodu.

4. Podsumowanie

Każdy z etapów ontogenezy roślin wymaga utrzymania określonego, wewnątrzkomórkowego stężenia NO. Ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion to procesy, które pozostają pod wpływem NO pochodzącego z otaczającego środowiska (np. zanieczyszczenia antropogeniczne) oraz źródeł endogennych. Pomimo zidentyfikowania w komórkach roślin wielu dróg biosyntezy NO, jedynie część z nich udało się potwierdzić jako potencjalne źródła tej cząsteczki w nasionach, co jest prawdopodobnie związane z ograniczonym dostępem tlenu we wczesnych etapach kiełkowania. Możliwe jest także, że część ze szlaków biosyntezy NO podlega aktywacji przez niektóre z regulatorów wzrostu i rozwoju, szczególnie te odpowiadające za ustępowanie spoczynku nasion. Natomiast wydaje się, że wszystkie z poznanych mechanizmów zmiatania NO w komórkach mogą funkcjonować w nasionach, niezależnie od stanu zdolności do kiełkowania.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu NCN, Preludium UMO-2013/09/N/NZ9/01619.

Literatura

- Airaki M., Leterrier M., Mateos R.M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J.B., del Río L.A., Palma J.M., Corpas F.J., 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ.*, 35: 281-295.
- Arc E., Galland M., Godin B., Cueff G., Rajjou L., 2013. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Front. Plant Sci.*, 4: 346.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., 2006. Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.*, 57: 1785-1793.

- Bethke P.C., Badger M.R., Jones R., 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.
- Catusse J., Strub J.-M., Job C., Van Dorsselaer A., Job D., 2008. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105: 10262-10267.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.M., Sandalio L.M., Del Río L.A., 2006. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224: 246-254.
- Corpas F.J., del Río L.A., Barroso J.B., 2007. Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends Plant Sci.*, 12: 436-438.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B., 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci.*, 181: 604-611.
- Dębska K., Krasuska U., Budnicka K., Bogatek R., Gniazdowska A., 2013. Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H_2O_2 , NO production and protein carbonylation level. *J. Plant Physiol.*, 170: 480-488.
- Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X., 2003. S-nitrosogluthathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 1013-1018.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L., 2010. Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell*, 22: 3816-3830.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.-W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J., 2005. A central role of S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102: 8054-8059.
- Fröhlich A., Durner J., 2011 The hunt for plant oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Sci.*, 181: 401-404.
- Gniazdowska A., Bogatek R., 2007. Regulacyjna rola NO w kiełkowaniu nasion. *Post. Biol. Kom.*, 34: 431-443.
- Gniazdowska A., Krasuska U., Bogatek R., 2010. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232: 1397-1407.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., Dongen J.T., 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.*, 16: 160-168.
- Gupta K.J., Igamberdiev A.U., 2015. Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview. [W:] Gupta K.J., Igamberdiev A.U. (red.), *Reactive oxygen and nitrogen species signalling and communication in plants*. Wyd. Springer International Publishing, Seria Signaling and Communication in Plants, Szwajcaria, 1-14.

- Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Shah J.K., Hill R.D., 2010. Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiol. Plant.*, 138: 393-404.
- Krasuska U., Ciacka K., Orzechowski S., Fettke J., Bogatek R., Gniazdowska A., 2016. Modification of the endogenous NO level influences apple embryos dormancy by alterations of nitrated and biotinylated protein patterns. *Planta*, doi: 10.1007/s00425-016-2553-z.
- Krasuska U., Ciacka K., Andryka P., Bogatek R., Gniazdowska A., 2015. „Nitrosative door” in seed dormancy alleviation and germination. [W:] Gupta K.J., Igamberdiev A.U. (red.), *Reactive oxygen and nitrogen species signalling and communication in plants*. Wyd. Springer International Publishing, Seria Signaling and Communication in Plants, Szewcowa, 215-237.
- Krasuska U., Budnicka K., Bogatek R., Gniazdowska A., 2014. Polyamines and nitric oxide link in regulation of dormancy removal and germination of apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos. *J. Plant Growth Reg.*, 33: 590-601.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Táche R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M., 2013. Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie*, 95: 889-902.
- Kwon E., Freechan A., Yun B-W., Hwang B-H., Pallas J.A., Kang J-G., Loake G.J., 2012. At GSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta*, 236: 887-900.
- Lee U., Wie C., Fernandez B.O., Feelish M., Vierling E., 2008. Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for termotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 786-802.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J., 2011. Function of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal. Behav.*, 6: 789-793.
- Lindermayr C., Durner J., 2009. S-Nitrosylation in plants: Pattern and function. *J. Proteomics*. 2:1-9.
- Maiti D., Sarkar T.S., Ghosh S., 2012. Detection of S-nitrosothiols and S-nitrosylated protein in *Arachis hypogaea* functional nodule: response of the nitrogen fixing symbiont. *PLoS ONE*, 7: e45526.
- Malik S.I., Hussain A., Yun B-W., Spoel SH., Loake G.J., 2011. GSNOR-mediated denitrosylation in the plant defence response. *Plant Sci.*, 181: 540-544.
- Mur L.A.J., Hebelstrup K.H., Gupta K.J., 2013. Striking a balance: does nitrite uptake and metabolism regulate both NO generation and scavenging? *Front. Plant Sci.* 4: 1-3.
- Nie X., Hill R.D., 1997. Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol.*, 114: 835-840.

- Petrivalsky M., Kubienova L., Ticha T., Luhova L., 2015. S-Nitrosogluthathione reductase: A key regulator of S-nitrosylation in plant development and stress responses. [W:] Gupta K.J., Igamberdiev A.U. (red.), Reactive oxygen and nitrogen species signalling and communication in plants. Wyd. Springer International Publishing, Seria Signaling and Communication in Plants, Szwajcaria, 283-300.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G.E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O., 2007. Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell*, 19: 3170-3193.
- Rusterucci C., Espunya M.C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M.C., 2007. S-Nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.*, 143: 1282-1292.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H., 2002. *Arabidopsis* glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosogluthathione reductase. *FEBS Lett.*, 515: 20-24.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bosron W.F., Hurley T.D., 2002. Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry*, 41: 10778-10786.
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martínez M.C., Persson B., Parés X., Jörnvall H., 1996. Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93: 5595-5599.
- Simontacchi M., Jasid S., Puntarulo S., 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci.*, 167: 839-847.
- Sirova J., Sedlarova M., Piterkova J., Luhova L., Petrivalsky M., 2011. The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci.*, 181: 560-572.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P., 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F.E., 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 47: 346-354.
- Wünsche H., Baldwin I.T., Wu J., 2011. S-Nitrosogluthathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.*, 62: 4605-4616.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J., 2014. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Physiol.*, 202: 1142-1156.

6 Proteomika nasion – w poszukiwaniu markerów spoczynku i kiełkowania

Aleksandra Maria **Staszak*** / Tomasz Andrzej **Pawłowski**

Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk

ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

* email: staszak.a@gmail.com

Streszczenie: Spoczynek jest mechanizmem adaptacyjnym pozwalającym nasionom przetrwać niekorzystne warunki zewnętrzne i skiełkować w momencie odpowiednim dla wzrostu i przetrwania siewek. Spoczynek jest cechą charakteryzującą wiele gatunków drzew klimatu umiarkowanego, o dużym znaczeniu ekologicznym i ekonomicznym, np. buka zwyczajnego czy klonu zwyczajnego. Przełamywanie spoczynku trwa kilka miesięcy. Proces ten, nazywany stratyfikacją, polega na inkubacji uwodnionych nasion w niskich dodatnich temperaturach. Umożliwienie kontrolowania głębokości spoczynku nasion i efektywności stratyfikacji stało się punktem wyjścia dla badań nad określeniem białek będących markerami procesu przełamywania spoczynku i kiełkowania. Markery mogą być też pomocne w określaniu jakości, zdrowotności i energii kiełkowania materiału reprodukcyjnego oraz wschodów siewek.

Badania zmierzające do analizy zmian w proteomie nasion opierają się w dużej mierze na rozdziale białek z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej wraz ze spektrometrią mas. Główny nurt badań nad spoczynkiem i kiełkowaniem dotyczy roślin modelowych oraz użytkowych: rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i ryżu (*Oryza sativa*). W odniesieniu do drzew, badania koncentrują się nad nasionami klonu zwyczajnego (*Acer platanoides*), klonu jawora (*Acer pseudoplatanus*) oraz buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica*). Wyznaczenie markerów procesów fizjologicznych zachodzących w nasionach pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiadających za sukces reprodukcyjny roślin. W przyszłości stanie się to podstawą do badań nad praktycznym zastosowaniem wyników eksperymentów proteomicznych.

Słowa kluczowe: spoczynek, nasiona, proteomika

1. Wstęp

Rozwój wyspecjalizowanych metod badawczych, jakie daje na przykład proteomika, pozwala na wykonywanie coraz bardziej precyzyjnych analiz i w związku z tym coraz bardziej istotne staje się porządkowanie i przetwarzanie informacji uzyskanych podczas prowadzonych eksperymentów, a także ich ostateczna interpretacja. Proteomika umożliwiła całościową analizę białek występujących w badanej próbce. W perspektywie, pozwala to na analizę mechanizmów działania poszczególnych procesów, np. spoczynku i kiełkowania nasion. Intrygującym aspektem badań stało się poszukiwanie białek znacznikowych – markerów, których zmiana profilu akumulacji charakteryzowałaby dany proces.

2. Proteomika nasion

2.1. Nasiona jako obiekt badań

Nasiona przystosowane są do przetrwania w różnorodnych warunkach środowiska i kiełkowania w warunkach odpowiednich dla dalszego wzrostu i rozwoju siewek (Black i in. 2008). Podczas rozwoju, nasiono przechodzi fazę formowania się zarodka oraz dojrzewania, kiedy to między innymi, gromadzone są rezerwy materiałów zapasowych. Dojrzewanie jest okresem, w którym nasiona nabierają tolerancji na podsuszanie oraz wchodzi w stan spoczynku (Bewley i in. 2013; Manfre i in. 2009). Procesy rozwojowe nasion podlegają regulacji na poziomie genetycznym (Radoeva, Weijers 2014) i wiążą się ze zmianami w cyklu komórkowym, ekspresji genów (Raz i in. 2001) oraz akumulacji białek (Staszak, Pawłowski 2014).

W literaturze (w odniesieniu do danych z Web of Science – Thompson Reuters), spośród 2024 prac wyszukanych przy użyciu słów kluczowych „proteom” i „nasiona”, 110 publikacji związanych było ze spoczynkiem, a 436 z kiełkowaniem nasion. Co warto zauważyć, proces regulacji kiełkowania przebiega inaczej w nasionach charakteryzujących się występowaniem płytkiego spoczynku fizjologicznego (np. rzodkiewnik, ryż), a inaczej w nasionach, w których występuje głęboki (np. klon zwyczajny i buk zwyczajny) lub płytki spoczynek fizjologiczny (np. klon jawor). Omawiając wyniki poszukiwania markerów, nawiązano do wyżej wymienionych gatunków uznanych za modelowe dla roślin jednoliściennych – do ryżu, dwuliściennych – do rzodkiewnika oraz drzew leśnych – do klonu i buka. W odniesieniu do nasion, dotychczas prowadzone badania proteomu dotyczyły ich rozwoju (Staszak, Pawłowski 2014), nabywania i ustępowania spoczynku (Lee i in. 2006,

Gallardo i in. 2007, Pawłowski 2007, 2009, Pawłowski, Staszak 2016), podsuszania (Pukacka, Ratajczak 2010), przechowywania (Pukacka, Ratajczak 2013, Ratajczak i in. 2015) oraz kiełkowania (Balbuena i in. 2011, He i in. 2015). Ponadto prowadzono badania nad poznaniem białek zapasowych (Schuler i in. 1982) i antyodżywczych (Natarajan i in. 2007), analizowano proteom podczas stresu suszy oraz niskiej temperatury (Zhang i in. 2015), a także cech użytkowych (Liu i in. 2011) czy alergenów (Binita i in. 2014).

2.2. Metody wykorzystywane w badaniu proteomu nasion

Proteomika zajmuje się badaniem białek, ich struktury, pełnionych funkcji, jak i oddziaływania między sobą. Pierwszy raz termin „proteom” użył Wilkins w 1994 roku. Wyraz ten powstał jako akronim od angielskich słów: „protein” i „genom”. Proteomem określa się całkowitą ilość białek danego organizmu. Współczesne badania skupiają się na analizie subproteomów (np. nasion, liści) czy procesów związanych z określonym procesem fizjologicznym (np. kiełkowaniem). Poznanie proteomów i subproteomów zmierza do określenia białek, których zmienny profil akumulacji będzie charakteryzował dany proces. Jeden genom związany jest z wieloma subproteomami, co jest rezultatem różnicowania się tkanek, a także zmiennych warunków środowiska. Dodatkowo ważną rolę w przypadku białek odgrywają modyfikacje potranslacyjne, takie jak choćby ubikwitynacja, fosforylacja, nitrozyłacja, karbonylacja. Za marker – białko znacznikowe może zostać uznana więcej niż jedna cząsteczka; może być to na przykład cały profil, pod warunkiem jednak, że będzie on powtarzalny (Silberring, Drabik 2010). W badaniach nad nasionami, przedmiotem zainteresowania są dwa kluczowe aspekty: spoczynek i kiełkowanie nasion.

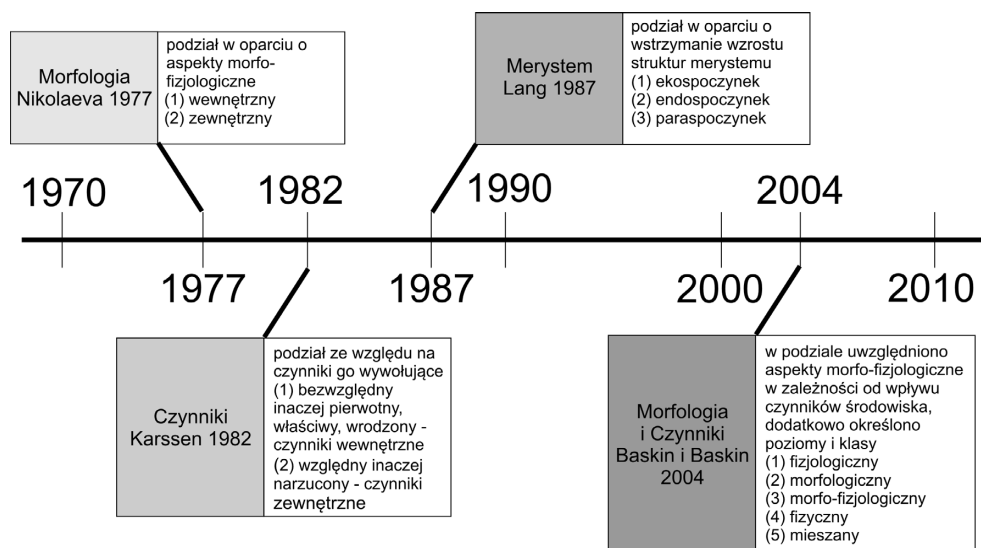
Punktem wyjścia do badań nad proteomem, niezależnie od wykorzystywanej metody rozdzielania białek, jest ich izolacja. Po wyizolowaniu, mieszanina białek poddawana jest rozdzielaniu. Najczęściej wykorzystywany jest rozdział dwuwymiarowy w żelu poliakrylamidowym. W pierwszym etapie białka rozdzielane są zgodnie z punktem izoelektrycznym. W drugim, ze względu na masę – z użyciem SDS, tzw. SDS-PAGE (Jorriin-Novo i in. 2009). Uzyskiwane elektroforegramy barwione są metodą srebrną lub roztworem koloidalnym błękitu komasyny. W dalszym etapie uzyskane profile białkowe porównane są pomiędzy sobą. Wyniki zmian w profilu akumulacji białek interpretowane są z zastosowaniem metod statystycznych. Wybrane białka poddawane są identyfikacji w spektroskopii mas. Odmianą elektroforezy dwuwymiarowej jest różnicowa elektroforeza żelowa (DIGE) z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych (Tonge i in. 2001). W jednym rozdziale

pozwała analizować wiele różnie znakowanych prób. Oszczędza to czas poświęcony na rozdział, jednak wymaga specjalistycznego sprzętu. Rozwijaną współcześnie techniką tzw. drugiej generacji jest na przykład elektroforeza w kapilarach (Cañas i in. 2007). Po izolacji, mieszanina białek podlega trawieniu i rozdziałowi bezpośrednio w kapilarach sprzężonych ze spektrometrem mas. W ostatnim etapie białka są identyfikowane przy wykorzystaniu programów komputerowych (np. Mascot) i baz sekwencji (np. NCBI).

3. Spoczynek i kiełkowanie nasion a zmiany w proteomie

3.1. Definicje spoczynku i jego klasyfikacje

Stan spoczynku związany jest z zahamowaniem aktywności metabolicznej i wzrostowej, może dotyczyć on całej rośliny lub jej części (Lewak, 2007). Badania nad spoczynkiem prowadzone są od wielu lat. W literaturze pojawiły się różne jego definicje i sposoby klasyfikacji, które przedstawiono na ryc. 1.



Rycina 1. Klasyfikacja spoczynku z uwzględnieniem różnych kryteriów podziału

Źródło: na podstawie: Nikolaeva 1977; Karssen 1982; Lang 1987; Baskin, Baskin 2004.

W badaniach fizjologii nasion wykorzystywana jest klasyfikacja przedstawiona przez Baskin i Baskin (2004), nawiązująca do podziału Nikolaevy (1977), według której nasiona w stanie spoczynku nie mają zdolności do kiełkowania w określonym czasie pod wpływem różnorodnych czynników środowiska, które w innym czasie mogłyby sprzyjać kiełkowaniu, na przykład po tym, jak w nasionach ustąpi spoczynek. Nasiona niespoczynkowe mają za to zdolność do kiełkowania w szerokim zakresie czynników środowiska dla danego genotypu.

Baskin i Baskin (2004) wyznaczyli pięć klas spoczynku, dzieląc ów proces dalej na poziomy i typy. Spoczynek fizjologiczny (PD, ang. *physiological dormancy*), to najpowszechniej występujący typ spoczynku (zarówno u roślin nagozalążkowych, jak i okrytozalążkowych). Jego podział na podtypy przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Podział głębokiego spoczynku fizjologicznego na podtypy

Poziom	Głęboki (ang. <i>deep</i>)	(II) Pośredni (ang. <i>intermediate</i>)	(III) Płytki (ang. <i>nondeep</i>)
Zabieg przełamujący spoczynek	ciepła lub chłodna stratyfikacja	przechłodzenie	skaryfikacja, dojrzewanie posprzętne, ciepła lub chłodna stratyfikacja
Czynniki wpływające na spoczynek	ulożone w zarodku i/lub tkankach go otaczających	ulożone w zarodku i/lub tkankach go otaczających	ulożone w tkankach go otaczających
Zarodek po izolacji	nie kiełkuje lub powstaje nieprawidłowa siewka	zdolny do kiełkowania, powstająca siewka ma normalną budowę	kiełkuje i powstaje prawidłowo wykształcona siewka
Zewnętrznie podana GA	nie prowadzi do przełamania spoczynku	pozytywnie wpływa na kiełkowanie nasion	przełamuje spoczynek
przykłady	klon zwyczajny, wiśnia ptasia, buk zwyczajny	klon jawor	rzodkiewnik, klon ścietolistny

Źródło: na podstawie: Hilhorst 1995; Tweddle i in. 2003; Baskin, Baskin 2004; Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006; Black i in. 2008; Li i in. 2009.

3.2. Płytki spoczynek fizjologiczny

Nasiona ryżu i rzodkiewnika składają się z zarodka otoczonego tkanką odżywczą, którą stanowi bielmo. U ryżu (jednoliścienne) zarodek jest niewielki i bielmo stanowi ponad 50% masy nasion, natomiast u rzodkiewnika (dwuliścienne) dysproporcja ta nie jest taka silna. Zarodki obu gatunków charakteryzują się występowaniem płytkiego spoczynku fizjologicznego (Baskin Baskin 2004). Nasiona tracą

spoczynek podczas ich przechowywania. Proces kiełkowania jest trójfazowy. Podczas pierwszej fazy wzrasta świeża masa nasion, co ma związek z intensywnym ich uwodnieniem, w drugiej fazie proces ten zwalnia i nasiona kiełkują – wówczas mówi się o kiełkowaniu *sensu stricte* (Bewley 1997, Nonogaki i in. 2010). Natomiast w trzeciej fazie proces uwodnienia zostaje zakończony, dochodzi do wzrostu korzenia zarodkowego u rzodkiewnika oraz dodatkowo koleoptylu u ryżu – ta faza związana jest z powstawaniem siewek (Nonogaki i in. 2010). Podczas kiełkowania bielmo jest stopniowo rozkładane, w czym uczestniczą białka, których synteza indukowana jest po uwodnieniu nasion. Aktywowane zostają geny związane z syntezą giberelin (GA) (Han i in. 2014). GA są transportowane do warstwy aleuronowej, zwiększa się ekspresja genu alfa amylazy oraz innych enzymów hydrolitycznych, które degradują materiały zapasowe (Bethke i in. 1997, Yang i in. 2007). Badania nad funkcją bielma wykazały, że bielmo może wydzielać sygnały kontrolujące wzrost zarodków (Lee i in. 2010). Analizując globalne zmiany w akumulacji białek podczas spoczynku nasion stwierdzono, że białka zapasowe, odpowiedzi na stres i biorące udział w detoksyfikacji podlegały silniejszej akumulacji (Arc i in. 2012). Nasiona, po ustąpieniu spoczynku, charakteryzowały się silniejszą akumulacją białek związanych z procesami energetycznymi, metabolizmem aminokwasów, fałdowaniem i stabilnością białek, proteolizą, metabolizmem mRNA oraz syntezą białek (Arc i in. 2012).

Do białek bezpośrednio zaangażowanych w kiełkowanie ryżu Liu i in. (2016) zaliczyli 9S-lipoksygenazę linolenianową 2 (LOX) i łańcuch tubuliny α -1 (Liu i in. 2016). Podczas kiełkowania dochodzi do mobilizacji triacyloglycerolu zmagazynowanego w ciałach olejowych. LOX katalizują utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wytwarzając wodoronadtlenki nienasyconych kwasów tłuszczowych (Feussner, Wasternack 2002). Obecność białka LOX2 stwierdzono w skiełkowanych nasionach (Liu i in. 2016), natomiast Huang i in. (2014) opisali, że ekspresja genu *OsLOX2* była indukowana podczas inicjacji kiełkowania i jest ona niezbędna dla zakończenia tego procesu. Białkiem wykazującym potencjał białka wskaźnikowego okazała się tubulina, składnik mikrotubul, cytoszkieletu, związana z rearanżacją chromosomów podczas podziału komórek. Zwiększenie się poziomu akumulacji białka obserwowano podczas kiełkowania nasion (pomiędzy 24 a 48 godzinami uwodnienia) (Han i in. 2014, Liu i in. 2016). Yang i in. (2007) zaobserwowali wzrost poziomu akumulacji białek obronnych podczas kiełkowania, np. lipokaliny indukowanej stresem temperatury, białek związanych ze stresem, czy produktu genu *salT*. Białka te związane są z tolerancją na podsuszanie, ich obecność podczas kiełkowania wskazuje, że mogą pełnić funkcje ochronne podczas tego procesu. U kiełkujących nasion ryżu ważną rolę odgrywały enzymy związane ze

szlakiem metioniny, wykorzystywanej do budowy białek i jako prekursor S-adenozylometioniny, prekursora poliamin, etylenu i biotyny (Liu i in. 2015). Liu i in. (2015) obserwowali wzrost poziomu N-karbamilooksydazy putrescyny katalizującej hydrolizę N-karbamiloputrescyny do putrescyny, oraz syntetazy spermidyny. Ponadto uwodnienie nasion wpływa na zmniejszenie akumulacji białek wiążących RNA, białek bogatych w glicynę wiążących RNA (Masaki i in. 2007).

Badania proteomiczne nasion rzodkiewnika pozwoliły, podobnie jak u ryżu, wytypować białka – potencjalne markery. Stwierdzono, że w proces kiełkowania zaangażowane są białka odporności przeciw patogenom, takie jak: myrosina, białka związane ze szlakiem metioniny, oraz białka LEA (Gallardo i in. 2001). Analiza wpływu nowo syntetyzowanych białek na podstawie mRNA zgromadzonego w dojrzałym zarodku, wykazała znaczący udział białek związanych ze szlakiem metioniny, szczególnie syntetazy metioniny odpowiedzialnej za żywotność nasion i odgrywającej rolę w wytworzeniu siewek. Syntetaza S-adenozylometioniny odbywa się tuż przed kiełkowaniem nasion (Galland i in. 2014). Ponadto enzym ten uczestniczy w biosyntezie etylenu, spermidyny, sperminy i biotyny. Także hydrolaza S-adenozylhomocysteiny wzrastała podczas kiełkowania nasion. Hydrolaza S-adenozylhomocysteiny rozkłada S-adenozylhomocysteinę – inhibitor metylotransferaz zależnych od S-adenozylometioniny (Galland i in. 2014). Białkami, których poziom akumulacji wzrastał podczas kiełkowania były także białko dojrzewania nasion (SMP, ang. *Seed Maturation Protein* – pełniące rolę magazynu biotyny). Profil akumulacji SMP i chloroplastowego czynnika elongacyjnego EF-Tu zmniejszył się podczas kiełkowania (Gallardo i in. 2001). Wskazuje to, że elementy niezbędne do budowy układu fotosyntetycznego syntetyzowane są na wczesnych etapach rozwoju nasion (Gallardo i in. 2001).

Proces uwodnienia nasion rzodkiewnika powiązany jest ze zmianami w akumulacji α - i β -tubuliny, aktyny 7, a także krucyferyny (białka zapasowego), enzymów związanych z cyklem Krebasa – akonitazy, glikolizą – karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), i detoksyfikacją – katalazy 2. Białko WD-40, jako białko związane z przekazywaniem sygnału zależnego od hormonów, pośredniczy w rozwoju komórek; jego akumulacja była ściśle związana z uwodnieniem tkanek zarodka (Gallardo i in. 2001).

3.3. Głęboki spoczynek fizjologiczny

Indukcja spoczynku w nasionach następuje podczas ich dojrzewania na roślinie macierzystej i rozpoczyna się w osiach zarodkowych (Staszak i Pawłowski 2014). Dojrzewanie poprzedza faza morfogenezy zarodka, związana ze zmianami

w akumulacji tubulin i aktyn – białek związanych ze wzrostem i rozwojem zarodka (Staszak, Pawłowski 2014). Dojrzewające liścienie odpowiadają za akumulację materiałów zapasowych, odnotowano także zmiany akumulacji białek związanych z metabolizmem (Staszak 2016). Jednym z hormonów zaangażowanych w proces spoczynku jest kwas abscysynowy (ABA), który reguluje spoczynek poprzez zmiany swego poziomu (Finch-Savage i Leubner-Metzger 2006). Na tym etapie dochodzi do akumulacji białek późnej embriogenezy (LEA, ang. *Late Embryogenesis Abundant*), w szczególności dehydryn (grupa 2 białek LEA) oraz małych białek szoku cieplnego (sHSP, ang. *small Heat Shock Proteins*), które uczestniczą w nabywaniu tolerancji na podsuszenie (Kalemba, Pukacka 2012). Białko LEA D-34 gromadzone jest w późnym stadium rozwoju nasion, w odpowiedzi na suszę. Białko stabilizuje inne białka i błony, zapobiegając uszkodzeniom podczas podsuszania (Battaglia i in. 2008); nie można wykluczyć jego roli w procesie nabywania spoczynku. Kalemba i in. (2008) zaobserwowała zbieżność pomiędzy maksymalną koncentracją kwasu abscysynowego a pojawieniem się białka podobnego do dehydryn o masie 44 kDa DHN44 w osiach zarodkowych. Jego akumulacja odbywała się w końcowej fazie nabywania spoczynku i trwała do osiągnięcia dojrzałości. Poza białkami LEA, w proces nabywania spoczynku zaangażowane są białka biorące udział w przetwarzaniu informacji genetycznej, metabolizmu węgla i energii, oraz w procesach komórkowych i antyoksydacyjnych. Białko bogate w glicynę, wiążące RNA i białka proteasomu, scharakteryzowano jako bezpośrednio zaangażowane w kontrolę nabywania spoczynku (Staszak, Pawłowski 2014). Białko bogate w glicynę wiążące się z RNA (GRRBP), odpowiada za potranskrypcyjną regulację ekspresji genów. Związek białka GRRBP ze spoczynkiem, poprzez syntezę białek bogatych w glicynę czułych na kwas abscysynowy (ang. *ABA-responsive*), zaobserwował Nicolás i in. (1997). U dojrzewających osi klonu zaobserwowano wzrost poziomu akumulacji białek proteasomalnych (Staszak 2016). W roślinach system ubikwityna–proteasom jest zaangażowany w regulację procesów rozwoju zarodków, między innymi, w namnażanie komórek i rozwój tkanek poprzez kontrolowanie poziomu jądrowych białek regulacyjnych (czynników transkrypcyjnych) (Auld, Silver 2006). Proteasomy mogą być zaangażowane w nabywanie spoczynku w nasionach poprzez udział w proteolizie regulatorów transkrypcji, które wpływają na różne szlaki metaboliczne, w tym na przekazywanie sygnału ABA (Staszak, Pawłowski 2014).

Za najistotniejszy element procesu ustępowania spoczynku uważa się wpływ hormonów regulujących ekspresję genów. Nasiona drzew leśnych klimatu umiarkowanego cechują się występowaniem głębokiego spoczynku fizjologicznego w pełni uformowanym zarodku (Hong, Ellis 1990). Ustępowanie spoczynku jest procesem dynamicznym, następuje w trakcie ok. 15-tygodniowej stratyfikacji

uwodnionych nasion w temperaturze 3°C; proces ten wiąże się z aktywnością wielu szlaków metabolicznych, a blokada któregośkolwiek, skutkuje pozostaniem nasion w stanie spoczynku (Ross 1996). Zwiększenie poziomu białek zaangażowanych w przełamywanie spoczynku obserwowano w ósmym i dziesiątym tygodniu chłodnej stratyfikacji. Pawłowski (2009) zaobserwował, że zmiany poziomu ABA i GA wpływają na zmiany w proteomie nasion, zgodnie z teorią hormonalnej równowagi Luckwilla (1952).

W przełamywanie spoczynku zaangażowane są różnorodne białka. Do grupy białek potencjalnych markerów procesu ustępowania spoczynku i kiełkowania, zaliczono: białka proteasomalne, białka szlaku metabolizmu metioniny (syntetaza metioniny, syntaza S-adenozynometioniny, adenozylohomocysteinaza), białka bogate w glicynę wiążące RNA (Pawłowski 2009; Pawłowski, Staszak 2016), czynnik elongacyjny EF-2, białko 1 oddziałujące z ABI3 (ang. *ABI3-interacting protein 1*) (Pawłowski 2009). Ponadto dehydryna (LEA) o masie 26 kDa w osiach zarodkowych wykazywała najsilniejszą korelację ze zdolnością do kiełkowania nasion. Białko to może uczestniczyć w zeszkleniu wody w komórkach (ang. *glassy state*). Nie było ono obecne podczas dojrzewania i kiełkowania nasion (Kalemba i in. 2008). Kalretikulina związana z siateczką śródplazmatyczną odpowiada za regulację poziomu jonów wapnia poprzez ich wiązanie; poziom jej akumulacji również był związany z wychodzeniem ze spoczynku (Pawłowski 2009).

4. Podsumowanie

Wyniki badań proteomicznych w znaczący sposób poszerzają wiedzę na temat fizjologii nasion, a szczególnie procesów spoczynku i kiełkowania. Umożliwiają poszukiwanie białek mogących służyć za markery procesów fizjologicznych, a w przyszłości wyniki prowadzonych badań mogą być wykorzystane do przygotowania testów biochemicznych, np. typu ELISA. Zanim to nastąpi, niezbędne są analizy wpływu modyfikacji potranslacyjnych białek. Rozwój badań proteomicznych jest nierozdzielnie uzależniony od rozwoju specjalistycznej aparatury badawczej o dużej czułości. Pełne zrozumienie procesów zachodzących w nasionach nie powinno być jednak rozpatrywane punktowo, a systemowo. Poszczególne procesy (np. spoczynek czy kiełkowanie nasion) są niezbędnymi elementami w życiu roślin i nie mogą być rozpatrywane w izolacji od siebie lub od innych procesów. Biologia systemowa jest podejściem, które w sposób wszechstronny traktuje o interpretacji wyników badań pochodzących z różnorodnych dyscyplin. Wykorzystanie tego

podejścia umożliwia pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za spoczynek i kiełkowanie nasion.

Podziękowania

Praca była współfinansowana w ramach realizacji grantu dla „Młodych Naukowców” MNiSW.

Literatura

- Auld K.L., Silver P.A., 2006. Transcriptional regulation by the proteasome as a mechanism for cellular protein homeostasis. *Cell Cycle*, 5: 1503-1505.
- Balbuena T., Jo L., Pieruzzi F., Dias L., Silveira V., Santa-Catarina C., Junqueira M., Thelen J., Shevchenko A., Floh E., 2011. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 72: 302-311.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A., 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, 148: 6-24.
- Bethke P.C., Schuurink R., Jones R.L., 1997. Hormonal signalling in cereal aleurone. *J. Exp. Bot.*, 48: 1337-1356.
- Bewley J., 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bewley J., Bradford K., Nonogaki H., 2013. Seeds – physiology of development, germination and dormancy, 3 edition. Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht, London.
- Binita K., Kumar S., Sharma V.K., Sharma V., Yadav S., 2014. Proteomic identification of *Syzygium cumini* seed extracts by MALDI-TOF/MS. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172: 2091-2105.
- Black M., Bewley J.D., Halmer P., 2008. The encyclopedia of seeds. Science, technology and uses. CABI, Wallingford.
- Cañas B., Piñeiro C., Calvo E., López-Ferrer D., Gallardo J.M., 2007. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J. Chromatogr. A*, 1153: 235-258.
- Feussner I., Wasternack C., 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 275-297.
- Galland M., Huguet R., Arc E., Cuff G., Job D., Rajjou L., 2014. Dynamic Proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 252-268.
- Gallardo K., Job C., Groot S., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job, D., 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.*, 126: 835-848.
- Han C., He D., Li M., Yang P., 2014. In-depth proteomic analysis of rice embryo reveals its important roles in seed germination. *Plant Cell Physiol.*, 55: 1826-1847.

- He M., Zhu C., Dong K., Zhang T., Cheng Z., Li J., Yan Y., 2015. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *BMC Plant Biol.*, 15: 97.
- Hong T.D., Ellis R.H., 1990. A comparison of maturation drying, germination, and desiccation tolerance between developing seeds of *Acer pseudoplatanus* L. and *Acer platanoides* L. *New Phytol.*, 116: 589-596.
- Kalembe E.M., Pukacka S., 2008. Changes in late embryogenesis abundant proteins and a small heat shock protein during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Environ. Exp. Bot.*, 63: 274-280.
- Karssen C., 1982. Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. [W:] Khan A. (red.), *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Biomedical Press, 243-270.
- Lang G., Early J., Martin G., Darnell R., 1987. Endo-, para-, and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hort. Sci.*, 22: 371-377.
- Le Page-Degivry M.T.L., Garelo G., Barthe P., 1997. Changes in abscisic acid biosynthesis and catabolism during dormancy breaking in *Fagus sylvatica* embryo. *J. Plant Growth Regul.*, 16: 57-61.
- Lee C., Chien C., Lin C., Chiu Y., Yang Y., 2006. Protein changes between dormant and dormancy-broken seeds of *Prunus campanulata* Maxim. *Proteomics*, 6: 4147-4154.
- Lee K., Piskurewicz U., Tureckova V., Strnad M., Lopez-Molina L., 2010. A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 19108-19113.
- Lewak S., 2007. *Spoczynek roślin*. [W:] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 557-567.
- Liu H., Yang Z., Yang M., Shen S., 2011. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.*, 181: 660-666.
- Liu S.-J., Xu H.-H., Wang W.-Q., Li N., Wang W.-P., Lu Z., Møller I.M., Song S.-Q., 2016. Identification of embryo proteins associated with seed germination and seedling establishment in germinating rice seeds. *J. Plant Physiol.*, 196-197, 79-92.
- Liu S.-J., Xu H.-H., Wang W.-Q., Li N., Wang W.-P., Møller I.M., Song S.-Q., 2015. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. *Physiol. Plant.*, 154: 142-161.
- Luckwill L., 1952. Growth-inhibiting and growth-promoting substances in relation to the dormancy and after-ripening of apple seeds. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 27: 53-277.
- Manfre A.J., LaHatte G.A., Climer C.R., Marcotte W.R., 2009. Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol.*, 50: 243-253.

- Natarajan S., Xu C., Bae H., Bailey B.A., 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *J. Plant Physiol.*, 164: 756-763.
- Nicolás C., Rodríguez D., Poulsen F., Eriksen E.N., Nicolás G., 1997. The expression of an abscisic acid-responsive glycine-rich protein coincides with the level of seed dormancy in *Fagus sylvatica*. *Plant Cell Physiol.*, 38: 1303-1310.
- Nikolaeva M.G., 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. [W]: Khan A.A., (red.), *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam: North-Holland, 51-74
- Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D., 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Sci.*, 179: 574-581.
- Pawłowski T.A., 2009. Proteome analysis of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancy breaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. *BMC Plant Biol.*, 9: 48.
- Pawłowski T.A., 2007. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: Influence of abscisic and gibberellic acids. *Proteomics*, 7: 2246-2257.
- Pawłowski T.A., Staszak A.M., 2016. Analysis of the embryo proteome of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds reveals a distinct class of proteins regulating dormancy release. *J. Plant Physiol.*, 195: 9-22.
- Pinfield N.J., Stutchbury P.A., Bazaid S.A., Gwarazimba V.E., 1990. Abscisic acid and the regulation of embryo dormancy in the genus *Acer*. *Tree Physiol.*, 6: 79-85.
- Pukacka S., Ratajczak E., 2013. Factors influencing the storability of *Fagus sylvatica* L. seeds after release from dormancy. *Plant Growth Regul.*, 72: 17-27.
- Pukacka S., Ratajczak E., 2010. Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Plant Growth Regul.*, 62: 77-83.
- Radoeva T., Weijers D., 2014. A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci.*, 19: 709-716.
- Ratajczak E., Kalembe E.M., Pukacka S., 2015. Age-related changes in protein metabolism of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during alleviation of dormancy and in the early stage of germination. *Plant Physiol. Biochem.*, 94: 114-121.
- Raz V., Bergervoet J.H., Koornneef M., 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Dev. Camb. Engl.*, 128: 243-252.
- Ross J., 1996. Dormancy breaking by chilling: phytochrome, calcium and calmodulin. [W:] Lang G. (red.), *Plant Dormancy: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. CAB International, Wellingford 157-170.
- Schuler M.A., Schmitt E.S., Beachy R.N., 1982. Closely related families of genes code for the alpha and alpha' subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucleic Acids Res.*, 10: 8225-8244.

- Staszak A.M., 2016. Rola wybranych białek w nabywaniu i ustępowaniu spoczynku fizjologicznego *Acer platanoides* L. i *Fagus sylvatica* L. Rozprawa doktorska
- Staszak A.M., Pawłowski T.A., 2014. Proteomic analysis of embryogenesis and the acquisition of seed dormancy in Norway maple (*Acer platanoides* L.). *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 10868-10891.
- Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, 1: 377-396.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I., 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16: 1090-1094.
- Yang P., Li X., Wang X., Chen H., Chen F., Shen S., 2007. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics*, 7: 3358-3368.
- Zhang P., Liu D., Shen H., Li Y., Nie Y., 2015. Proteome analysis of dormancy-released seeds of *Fraxinus mandshurica* Rupr. in response to re-dehydration under different conditions. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 4713-4730.

Paweł Rogowski / Wioleta Wasilewska / Elżbieta Romanowska*

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii, Instytut Botaniki
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

* e-mail: romanela@biol.uw.edu.pl

Streszczenie: Uważa się, że temperatura na Ziemi może wzrosnąć w ciągu najbliższych 100 lat o 1,1 do 6,4°C, obniżając wzrost roślin i wydajność plonów. Rośliny, podczas wzrostu, wykazują możliwość dostosowania parametrów fotosyntetycznych do temperatury. Plastyczne dostosowanie do nowych temperatur umożliwia efektywniejszy przebieg procesów metabolicznych. Możliwości aklimatyzacyjne roślin do zmian temperatury są różne pomiędzy gatunkami należącymi do dróg fotosyntetycznych C3, C4 i CAM. Rośliny C3 mają największe możliwości przystosowawcze do zmian temperatury w szerokim zakresie, podczas gdy u roślin CAM zachodzące procesy zależą od temperatury w dzień i w nocy, a rośliny C4 są przystosowane raczej do wysokich temperatur środowiska. Ponadto, wśród roślin C3 zimozielonych i wieloletnich, obserwuje się większą homeostazę temperaturową fotosyntezy, niż w roślinach jednorocznych, a aklimatyzacja jest szczególnie ważna dla bylin, które doświadczają znacznych zmian temperatury podczas swojego życia.

Niektóre gatunki roślin mogą osiągnąć wysoką aktywność fotosyntetyczną poprzez zmianę optimum temperatury dla fotosyntezy w warunkach wzrostu. Zmiany te dotyczą głównie intensywności tych etapów fotosyntezy, które decydują o natężeniu procesu. Globalne zmiany klimatu powodująienne, sezonowe i roczne zmiany temperatury, a temperatura podczas wzrostu jest głównym czynnikiem determinującym różną dystrybucję gatunków w danym środowisku. Fotosynteza jest procesem najbardziej wrażliwym na zmiany temperatury, zatem znajomość aklimatyzacji tego procesu jest ważna dla rolnictwa i środowiska. Istnieje szereg rozbieżności w wynikach prac dotyczących aklimatyzacji różnych grup roślin do zmian temperatury, a tymczasem poznanie tych mechanizmów jest ważne dla kontroli procesów odpowiedzialnych za wzrost roślin. Znajomość różnic w temperaturach wzrostu jest bowiem istotna dla transformacji roślin w celu zwiększenia intensywności fotosyntezy u gatunków uprawianych przez człowieka.

Słowa kluczowe: fotosynteza, rośliny C3, C4 i CAM, zmiany temperatury.

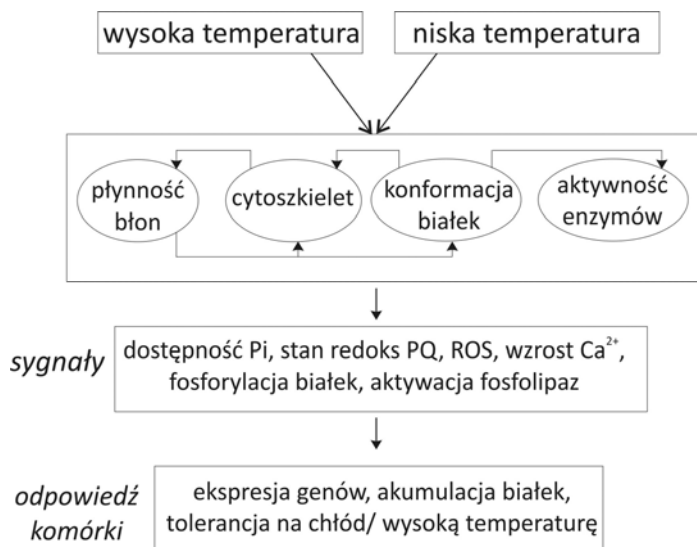
1. Wstęp

Rośliny żyjąc w środowisku naturalnym narażone są na działanie zmiennych czynników abiotycznych, w tym zmiennej temperatury. Zmiany te zachodzą w czasie kolejnych sezonów, jak również w ciągu cyklu dnia i nocy. Bardzo drastyczne obniżenie lub wzrost temperatury mogą zaindukować apoptozę i w konsekwencji śmierć rośliny. Jednocześnie zmiany temperatury są niezbędne do normalnego rozwoju osobniczego. Wahania temperatury regulują otwieranie i zamykanie kwiatów w ciągu doby (Ruelland, Zachowski 2010). Wiele roślin uprawnych zakwita dopiero po okresie chłodu, bez którego nie są zdolne do osiągnięcia fazy generatywnej. Kiełkowanie nasion również zależy od temperatury. Fakty te świadczą o tym, że zmiany temperatury stanowią sygnał, którego natężenie indukuje określoną odpowiedź komórek. Nie udało się natomiast zidentyfikować w komórce roślinnej wewnętrznego „termometru”, który wyzwalałby odpowiednią reakcję organizmu. Takie elementy składowe komórki, jak błony biologiczne, enzymy, czynniki transkrypcyjne oraz cytoszkielet zmieniają znacznie swoje właściwości i strukturę pod wpływem temperatury, i właśnie owe zmiany bezpośrednio wywołują odpowiedź komórki na zmieniające się warunki.

1.1. Mechanizmy percepcji i odpowiedzi na zmiany temperatury przez rośliny

W skład błon biologicznych wchodzi lipidy, które są niezwykle czułe na zmiany temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury, zwiększa się stopień upłynnienia błon biologicznych, podczas gdy chłód powoduje ich usztywnienie. Obecnie istnieje wiele dowodów na to, że stopień płynności błon jest sygnałem dla komórki, mówiącym o zmianach temperatury (Vigh i in. 2007). Potwierdzają to eksperymenty nad wpływem związków zmieniających płynność błon w stałej temperaturze. DMSO (dimetylosulfotlenek) zwiększa „sztywność” błony, podczas gdy benzylalkohol (BA) odwraca działanie DMSO. Stwierdzono, że działanie DMSO na błony biologiczne, wywołuje odpowiedź komórki roślinnej taką samą, jak działanie chłodu, natomiast podanie BA znosi ten efekt (Orvar i in. 2000). W roślinach poddanych działaniu wysokiej temperatury, DMSO obniża również aktywność białek szoku cieplnego HSP70, podczas gdy BA aktywuje te białka, nawet w temperaturze nie stanowiącej stresu dla rośliny. Stwierdzono też, że niektóre gatunki mchów mogą nabyć termotolerancję nie przez poddawanie ich zmianom temperatury, lecz tylko przez podawanie BA. Badano również reakcję na chłód mutantów *fad3/7/8* *A. thaliana* pozbawionych desaturaz kwasów tłuszczowych (FAD), enzymów kon-

trolujących zawartość nienasyconych fosfolipidów w błonach, a więc wpływających bezpośrednio na ich płynność. Błony mutantów *fad* wykazywały zwiększoną sztywność, w porównaniu do typu dzikiego (Ruelland, Zachowski 2010). Co więcej, wykazywały one zależną od temperatury aktywację fosfolipazy C, szlaku indukowanego w reakcji na chłód. Mutanty *fad* charakteryzowały się także zwiększoną proteolizą związanych z błoną czynników transkrypcyjnych NAC, które pełnią, między innymi, funkcję związaną z odpowiedzią roślin na chłód. Powyższe dane wskazują, że płynność błon stanowi dla komórki roślinnej sensor odpowiedzialny za percepcję temperatury.



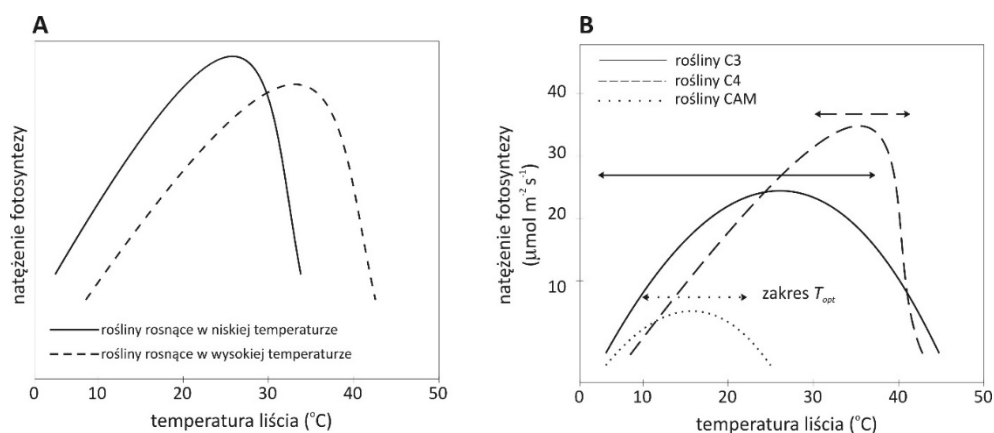
Rycina 1. Schemat ukazujący sekwencję zmian indukowanych w komórce roślinnej przez niską i wysoką temperaturę

Źródło: opracowanie własne

W komórce roślinnej, poddanej działaniu wysokiej lub niskiej temperatury, wiele białek może ulegać zmianom strukturalnym. Niektóre wyniki sugerują, że denaturacja termiczna aktywuje czynniki transkrypcyjne Hsfs (Yamada i in. 2007). Czynniki *AtHsfA1d*, *AtHsfA4c*, *AtHsfA3* i *AtHsfB1* występują konstytutywnie (nawet przy braku stresu termicznego) w komórkach *Arabidopsis thaliana* i są związane z białkami chaperonowymi HSP90. Podczas działania wysokiej temperatury, białka HSP90 odłączają się od Hsfs, a uwolnione Hsfs indukują ekspresję genów aktywowanych wysoką temperaturą. Również w warunkach chłodu, występujący w komórkach roślin wyższych czynnik transkrypcyjny CBF2, jest odpowie-

działny za odpowiedź rośliny, tworząc odwracalną, zależną od temperatury, formę aktywną. Zatem zmiany strukturalne białek stanowią sensor zmian temperatury w komórkach. Znane jest też, że zarówno niska, jak i wysoka temperatura powodują depolimeryzację mikrotubul i mikrofilamentów, zmieniając tym samym oddziaływanie z białkami, które pełnią rolę cząsteczek sygnałowych. Kinazy MAP (MAPKs) uznawane są za cząsteczki uczestniczące w dynamice cytoszkieletu (Samaj i in. 2004). Schemat przedstawiający mechanizmy działania temperatury w roślinach przedstawiono na ryc. 1.

Zmiany globalne klimatu odpowiadają za anomalie temperatury środowiska, zarówno w odniesieniu do ich intensywności, jak i czasu trwania (Christensen i in. 2007). Temperatura może ograniczać wzrost roślin, jak i mieć wpływ na rozprzestrzenienie gatunków. Ponieważ rośliny nie są zdolne do przemieszczania się, istotnym jest wytworzenie mechanizmów umożliwiających aklimatyzację do nowych warunków, w których żyją. Proces fotosyntezy jest najbardziej wrażliwy na zmiany temperatury, stąd zrozumienie mechanizmów przystosowawczych tego procesu jest ważne, zarówno z praktycznego, jak i środowiskowego punktu widzenia. Natężenie fotosyntezy jest hamowane zarówno w niskich, jak i wysokich temperaturach (ryc. 2A).



Rycina 2. Wpływ temperatury na natężenie fotosyntezy (A) u roślin rosnących w niskiej i wysokiej temperaturze oraz (B) dla roślin C3, C4 i CAM, z przedstawieniem zakresu temperatury optymalnej (T_{opt})

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Yamori i in. 2014.

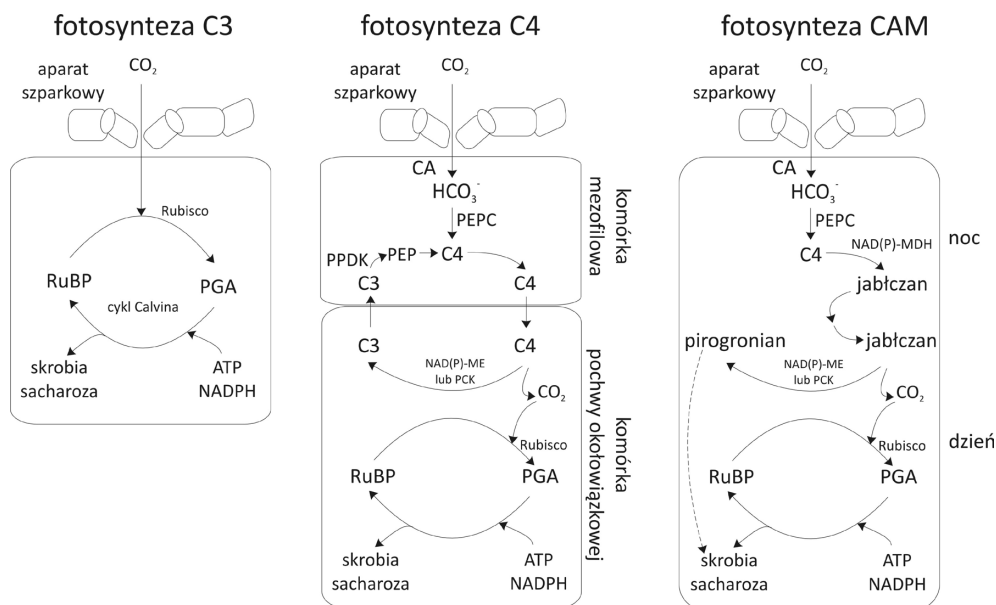
Interesujące jest, że w warunkach sezonowych zmian temperatury, zmienia się również optimum temperaturowe fotosyntezy, co umożliwia lepszy wzrost rośliny w nowych warunkach termicznych (Berry, Björkman 1980; Yamori i in. 2012).

Rośliny, zarówno arktyczne, jak i pustynne, wykazują szereg przystosowań do panujących w danym środowisku temperatur. Wydaje się, że odmienne przystosowania występują też u roślin o różnych typach metabolicznych. Rośliny C4 występują w rejonach o wysokim nasłonecznieniu i temperaturze, zatem są lepiej przystosowane do tych warunków niż rośliny C3. Jednak w obrębie roślin C3 również występują znaczące różnice zależne, na przykład od ekotypu tego samego gatunku, czy też różnej tolerancji na temperaturę. Stosunkowo niewiele jest informacji dotyczących roślin CAM, zasiedlających tereny pustynne, gdzie temperatura w ciągu dnia i nocy bardzo się różni. Interesujące jest, że nie znaleziono różnic w działaniu temperatury na aklimatyzację fotosyntezy u traw, drobnych krzewinek i roślin zdrewniałych (Campbell i in. 2007). Rośliny C3, C4 i CAM stanowią odpowiednio ok. 85, 5 i 10% wszystkich gatunków roślin wyższych. Rośliny C4 występują w strefie tropikalnej, subtropikalnej oraz strefach o podwyższonej temperaturze. Wśród roślin C4 występują też gatunki przystosowane do życia w obniżonej temperaturze; spotykane są one zarówno w tundrze, jak i w lasach borealnych, wymagają jednak podczas dnia wyższych temperatur, co bezpośrednio wynika z właściwości katalitycznych enzymu Rubisco. Rośliny CAM przystosowane są do suszy i występują w regionach, gdzie obserwuje się drastyczne wahania temperatury w okresie dzień/noc. Ze względu na różnorodne przystosowania do wiązania CO₂ roślin reprezentujących trzy typy metaboliczne, uważa się, że zmiany adaptacyjne do temperatury związane są zarówno z lokalizacją komórkową, jak i przebiegiem procesu fotosyntezy. Schemat reakcji fotosyntetycznych u roślin C3, C4 i CAM przedstawiono na rycinie 3. Szczegóły dotyczące metabolizmu tych roślin opisano w pracach Drożak i in. (2012), a także Lüttge (2004).

1.2. Szybkie przystosowania fotosyntezy do niskich i wysokich temperatur

Obserwuje się, że rośliny zwiększają aktywność fotosyntetyczną w warunkach wzrostu w taki sposób, że organizmy rosnące w niskich temperaturach, wykazują większe możliwości fotosyntetyczne w niskich temperaturach, podczas gdy rośliny z terenów gorących – w wyższych. Aklimatyzacja fotosyntezy do niskich temperatur najczęściej wiąże się ze wzrostem zawartości enzymów, natomiast w wyższych temperaturach konieczne jest utrzymanie stabilności aparatu fotosyntetycznego (Sage, Kubien 2007). W niskich temperaturach stwierdzono wzrost zawartości wielu enzymów, w tym np. cyklu Calvina (włączając Rubisco) oraz syntazy fosfocharozowej (SPS) (Hurry i in. 1994), która kompensuje obniżenie aktywności tych enzymów. Jednocześnie stwierdzono zwiększenie ekspresji niektórych izoform

enzymów (np. Rubisco), a zmieniona ich kinetyka, warunkuje lepsze przystosowania do obniżonej temperatury (Yamori i in. 2006). Wykazano też, że zmiany mogą dotyczyć powinowactwa enzymu do substratu, jak obserwowano np. dla SPS (Reimholz i in. 1997). W procesie aklimatyzacji do niskich temperatur, ważne są również zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych w błonach. Struktura i funkcjonowanie błon komórkowych zależą od stosunku kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych. Kwasy tłuszczowe nasycone tworzą proste, sztywne łańcuchy w warstwie lipidowej, natomiast kwasy nienasycone powodują rozluźnienie struktur błon, zwiększając tym samym ich płynność i przepuszczalność. Wzrost stosunku kwasów nienasyconych do nasyconych obserwuje się w niskich temperaturach, natomiast w wysokich temperaturach – ulega on obniżeniu (Murata, Los 1997). Zwiększenie płynności błon w niskiej temperaturze poprzez zmiany konformacyjne białek, zwiększa transport elektronów w reakcjach świetlnych fotosyntezy.



Rycina 3. Reakcje fotosyntezy u roślin C3, C4 i CAM

CA, anhidraza węglanowa; NAD(P)-MDH, dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NAD(P); NAD(P)-ME-enzym jabłczanowy zależny od NAD(P); PCK, karboksykinaza PEP; PEPC, karboksylaza fosfoenolopirogronianu; PGA, kwas fosfoglicerynowy; PPDK, dikinaza fosfopirogronianowa; Rubisco, karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu; RuBP, rybulozo-1,5-bisfosforan.

Źródło: opracowanie własne

Rośliny rozwijające się w wysokich temperaturach są natomiast narażone na obniżenie stabilności błon tylakoidowych i ucieczkę protonów, co może powodować zaburzenia transportu elektronów i syntezy ATP (Bukhov i in. 1999). W tych warunkach wzrost intensywności cyklicznego transportu elektronów wokół PSI może kompensować braki ATP. Krótkotrwałe działanie wysokiej temperatury (do 45°C) nie powoduje uszkodzenia PSII, ale ma wpływ na integralność błon. U wielu gatunków stwierdzono, że w wysokich temperaturach obniża się stan aktywacji Rubisco na skutek niestabilności jego aktywazy (Yamori, von Caemmerer 2009). Wydaje się, że najważniejszym procesem w aklimatyzacji do wysokiej temperatury jest: (1) obecność odpornej na temperaturę aktywazy Rubisco lub wzrost jej zawartości, (2) zwiększenie ekspresji białek szoku cieplnego (HSPs) biorących udział na przykład w procesie formowania odpowiedniej konformacji nowo syntetyzowanych białek uczestniczących w renaturacji uszkodzonych białek, czy też chroniących istniejące białka przed działaniem czynników degradujących oraz biorących udział w stabilizacji błon i utrzymaniu homeostazy w komórkach w warunkach wysokiej temperatury.

Zmiany temperatury mają wpływ na intensywność wielu procesów w komórkach. Zmiany natężenia oddychania roślin indukowane temperaturą mają istotny wpływ na natężenie fotosyntezy, choć bezpośrednio nie wpływają na ten proces. Optimum temperatury dla fotosyntezy mieści się najczęściej w zakresie 20-30°C, natomiast dla oddychania jest wyższe i wynosi nieco poniżej 45°C. Zatem kiedy natężenie fotosyntezy obniża się, natężenie oddychania rośnie. Rośliny rosnące w wyższych temperaturach, często mają obniżone natężenie oddychania w warunkach normalnych, nawet niższe niż u roślin rosnących w warunkach chłodu (Atkin i in. 2005). Rośliny wykazujące znaczną plastyczność w niektórych parametrach, również wykazują ją w innych, co określane jest jako „syndrom aklimatyzacji do temperatury”. Zatem zmiany jednego z parametrów, niezależnie regulowanego, mogą odgrywać główną rolę w procesie aklimatyzacji do temperatury.

1.3. Ograniczenia natężenia fotosyntezy roślin

U roślin C₃ natężenie fotosyntezy może być ograniczone przez obniżenie aktywności Rubisco lub regenerację RuBP i Pi (Farquhar i in. 1980). W niskich stężeniach CO₂ proces dyfuzji CO₂ i karboksylacja RuBP są czynnikami ograniczającymi fotosyntezę. Natomiast w wysokich stężeniach CO₂, regeneracja RuBP i Pi obniżają asymilację CO₂. W niskich temperaturach synteza sacharozy może być hamowana, gdyż regeneracja Pi jest czynnikiem limitującym ten proces, zależy on od gatunku rośliny i temperatury wzrostu (Yamori i in. 2010). Również regeneracja

RuBP jest wówczas obniżona, co pociąga za sobą ograniczenia karboksylacji Rubisco. Rośliny o niskiej możliwości aklimatyzacyjnej do niskich temperatur, ograniczają regenerację RuBP niezależnie od temperatury podczas wzrostu. W wysokich temperaturach obserwuje się obniżenie transportu elektronów, spada stosunek ATP/ADP i obniża się stan redoks stromy (co w konsekwencji powoduje obniżenie aktywności aktywazy Rubisco). Uważa się, że w wysokich temperaturach, obniżenie transportu elektronów jest głównym czynnikiem ograniczającym fotosyntezę, natomiast stopień hamowania zależy od aktualnej temperatury i gatunku rośliny oraz od stopnia jej wrażliwości na ten czynnik (wrażliwa/odporna). Jest interesujące, jak optimum temperaturowe fotosyntezy zmienia się wraz z temperaturą wzrostu. Przy aktualnym stężeniu CO₂ w atmosferze, natężenie fotosyntezy zależy od karboksylacji RuBP i natężenia światła, a optimum temperatury zależy od warunków wzrostu.

Zależność natężenia fotosyntezy roślin C₄ od temperatury jest bardziej złożona niż roślin C₃ (von Caemmerer 2000). W niskim stężeniu CO₂, natężenie procesu zależy od szybkości dyfuzji CO₂, aktywności anhidrazy węglanowej i PEPC. Natomiast w wysokich stężeniach CO₂ – od aktywności Rubisco, regeneracji PEP i RuBP (istotny transport elektronów i aktywność enzymów cyklu Calvina). Uważa się, że w wysokich natężeniach światła, czynnikiem kontrolującym fotosyntezę jest aktywność Rubisco i PPDK (Furbank i in. 1997). Czynnikiem ograniczającym fotosyntezę w wysokiej temperaturze mogą być prawdopodobnie transport elektronów i/lub regeneracja PEP. Powszechnie wiadomo, że fotosynteza C₄ jest wrażliwa na niską temperaturę ze względu na niską stabilność enzymów PEPC, PPDK i Rubisco w tych warunkach. Wydaje się, że wrażliwość PPDK na niską temperaturę jest główną przyczyną braku gatunków C₄ w chłodnych środowiskach (Long 1983). Wykazano, że rośliny transgeniczne kukurydzy o nadekspresji genu PPDK wykazywały wyższą aktywność fotosyntetyczną w niskich temperaturach, niż osobniki dzikie. Otrzymanie roślin transgenicznych C₄ o wybranych cechach może przyczynić się do wyjaśnienia ich wrażliwości na niską temperaturę (Ohta i in. 2006).

Nauka posiada niewiele informacji o aktywności fotosyntetycznej roślin CAM w odpowiedzi na zmiany temperatury w czasie dnia i nocy (z uwzględnieniem faz fotosyntezy). Wśród badań są wyniki dotyczące wiązania CO₂ w okresie nocy dla roślin w niskiej i wysokiej temperaturze, które pokazują, że transport elektronów w okresie dnia, jak i wiązanie CO₂ podczas nocy zmieniają się wraz ze zmianą temperatury podczas wzrostu. Jednocześnie stwierdzono, że czynnikiem ograniczającym wiązanie CO₂ u tych roślin nie jest przewodność szparkowa, czy też stężenie CO₂, ale inny proces fizjologiczny. Wykazano także, że wzrost zawartości azotu w roślinach w niskich temperaturach może rekompensować obniżenie aktywności

enzymów (Hikosaka 2004; Yamori i in. 2010). Jednocześnie różnice w aktywności fotosyntetycznej roślin CAM w okresie dzień/noc można tłumaczyć różnym optimum temperatury enzymów odpowiedniej fazy fotosyntezy. Enzymy PEPC i NAD(P)-MDH są lepiej przystosowane do niskich temperatur panujących w nocy (choć optimum wynosi 35°C), natomiast optimum temperaturowe dla NAD(P)-ME, działającego w dzień może być znacznie wyższe i wynosić ok. 53°C. Wykorzystanie roślin transgenicznych CAM może pomóc w wyjaśnieniu etapów, które ograniczają fotosyntezę w szerokim zakresie temperatur.

1.4. Aklimatyzacja do temperatury różnych typów fotosyntetycznych roślin

Porównując temperatury optymalne dla zachodzenia fotosyntezy roślin C₃, C₄ i CAM stwierdzono, że dla roślin C₃ zakres ten jest szeroki i waha się od 10 do 35°C (ryc. 2B). Natomiast dla roślin CAM, które wykazują niskie natężenia wiązania CO₂, skorelowane z bardzo wolnym wzrostem tych roślin, optimum jest również niższe niż dla roślin C₃ i C₄. Rośliny C₄ wykazują najwyższe optimum temperaturowe i wyższą aktywność fotosyntetyczną niż rośliny C₃ i CAM, chociaż natężenie fotosyntezy drastycznie obniża się w niższych temperaturach. Możliwości aklimatyzacyjne różnych gatunków do zmian temperatury są ograniczone na różnych poziomach, ale u roślin C₃ występuje znaczny zakres przystosowań do temperatury, co jest w dużej mierze związane z ich ewolucyjnymi zmianami. U wszystkich typów fotosyntetycznych, temperatura optymalna dla fotosyntezy znacząco różni się i zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury wzrostowej. Stosunek natężenia fotosyntezy w wysokich temperaturach podczas wzrostu do natężenia w temperaturach niskich, określany jest jako temperaturowa homeostaza fotosyntezy (Yamori i in. 2014). Dla roślin C₃ wartość ta jest bliska 1 wskazując, że natężenie fotosyntezy jest takie, jak w warunkach wzrostu. U roślin C₄ wartość ta wynosi ok. 2,39, czyli natężenie fotosyntezy jest wyższe w wyższej temperaturze wzrostu. Przeciwny proces występuje dla roślin CAM, gdzie wartość ta wynosi ok. 0,47 wskazując, że mają one niższe natężenie fotosyntezy w wyższej temperaturze. Można stwierdzić, że gatunki roślin reprezentujące poszczególne podtypy metaboliczne, wykazują adaptację do określonego zakresu temperatur: rośliny C₃ – do szerokiego zakresu zmian temperatury, rośliny CAM pustynne – do niskich temperatur panujących w nocy, zaś rośliny C₄ generalnie do wysokich temperatur środowiska. U roślin C₄ optimum temperaturowe enzymów jest wysokie; dla przykładu, dla PEPC wynosi ok. 40-45°C; również transport elektronów wzrasta wraz z temperaturą. Natomiast w niskich temperaturach nie tylko obniża się aktywność enzymów,

ale znacznie spada też wydajność kwantowa fotosyntezy i zachodzi fotoinhibicja. Sprawia to, że fotosynteza C4 uważana jest za mniej plastyczną niż C3, ze względu na ograniczenia w regulacji cykli w obu typach komórek oraz stałe ułożenie chloroplastów w komórkach pochew okołowiązkowych. Stwierdzono również, że niezależnie od typu metabolicznego, byliny i drzewa wiecznie zielone są lepiej adaptowane do niskich temperatur niż rośliny roczne i liściaste rośliny drzewiaste (Yamori i in. 2014). Również zmiany optimum temperaturowego fotosyntezy ze zmianą temperatury wzrostu były podobne dla roślin zielnych rocznych, bylin i roślin drzewiastych liściastych, natomiast były niższe dla wiecznie zielonych roślin drzewiastych. Wydaje się, że reakcja fotosyntezy na zmiany temperatury, bez wpływu na temperaturę optymalną fotosyntezy, pozwala również na wydajniejszą fotosyntezę w warunkach wzrostu. Rośliny wykazują liczne strategie pozwalające na bardziej wydajną fotosyntezę w nowych warunkach wzrostu, bez zmiany optimum temperatury. Wyższa homeostaza fotosyntezy u bylin i wiecznie zielonych drzew wskazuje, że aklimatyzacja fotosyntezy jest szczególnie ważna u roślin długo żyjących, narażonych na zmiany sezonowe temperatury. Również rośliny tego samego gatunku, w zależności od środowiska życia (np. pustynia czy nabrzeże), wykazują różnice w natężeniu fotosyntezy związane ze zmianami temperatury podczas dnia lub w sezonie. Specjalizacja roślin do warunków ekstremalnych może ograniczać potencjał aklimatyzacyjny do zmian temperatury.

2. Podsumowanie

Zwiększenie temperatury na Ziemi będzie prowadziło do ograniczenia wzrostu roślin i obniżenia plonów. Zwiększenie natężenia fotosyntezy jest zatem koniecznym narzędziem w celu zwiększenia produkcji roślinnej. Nowe techniki badawcze, takie jak technologie transformacji, pozwalają na zmiany ekspresji wybranych genów, ingerując w te etapy fotosyntezy, które są ograniczające w danych warunkach. Zrozumienie mechanizmów aklimatyzacji fotosyntezy do temperatury u różnych gatunków i typów metabolicznych roślin, zarówno jednorocznych, jak i wieloletnich, jest ważne dla znalezienia „miejsca” ograniczającego natężenie fotosyntezy w danych warunkach wzrostu. Może to umożliwić kontrolę i regulację wiązania CO₂.

Podziękowania

Badania finansowane są z grantu NCN Opus 2012/07/B/NZ3/02917.

Literatura

- Atkin O.K., Bruhn D., Hurry V.M., Tjoelker M.G., 2005. The hot and the cold: unravelling the variable response of plant respiration to temperature. *Funct. Plant Biol.*, 32: 87-105.
- Berry J.A., Björkman O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 491-543.
- Bukhov N.G., Samson G., Carpentier R., 1999. Nonphotosynthetic reduction of the inter-system electron transport chain of chloroplasts following heat stress: steady-state rate. *Photochem. Photobiol.*, 72: 351-357.
- Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O.K., Hurry V., 2007. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.*, 176: 375-389.
- Christensen J.H., Hewitson B., Busuioc A., Chen A., Gao X. i in., 2007. Regional climate projections. [W:] Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L. (wyd.) *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press, Cambridge and New York, 847-940.
- Drożak A., Wasilewska W., Buczyńska A., Romanowska E., 2012. Fotosynteza typu C4. *Postępy Biochemii*, 58: 44-53.
- Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149: 78-90.
- Furbank R.T., Chitty J.A., Jenkins C.L.D., Taylor W.C., Trevanion S.J., von Caemmerer S., Ashton A.R., 1997. Genetic manipulation of key photosynthetic enzymes in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 24: 477-485.
- Hikosaka K., 2004. Interspecific difference in the photosynthesis – nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *J. Plant Res.*, 117: 481-494.
- Hurry V.M., Malmberg G., Gardeström P., Öquist G., 1994. Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiol.*, 106: 983-990.
- Long S.P., 1983. C₄ photosynthesis at low temperatures. *Plant Cell Environ.*, 6: 345-363.
- Lüttge U., 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Ann. Bot.*, 93: 629-652.
- Murata N., Los D.A., 1997. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.*, 115: 875-879.
- Ohta S., Ishida Y., Usami S., 2006. High-level expression of coldtolerant pyruvate, orthophosphate dikinase from a genomic clone with site-directed mutations in transgenic maize. *Mol. Breed.*, 18: 29-38.

- Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S., 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794.
- Reimholz R., Geiger M., Deiting U., Krause K.P., Sonnewald U., Stitt M., 1997. Potato plants contain multiple forms of sucrose phosphate synthase, that show differences in their tissue distribution, their response during development, and their response to low temperature. *Plant Cell Environ.*, 20: 291-305.
- Ruelland E., Zachowski A., 2010. How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.*, 69: 225-232.
- Sage R.F., Kubien D.S., 2007. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. *Plant Cell Environ.*, 30: 1086-1106.
- Samaj J., Baluska F., Hirt H., 2004. From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J. Exp. Bot.*, 55: 189-198.
- Vigh L., Nakamoto H., Landry J., Gomez-Munoz A., Harwood J.L., Horvath I., 2007. Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1113: 40-51.
- von Caemmerer S., 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO publishing, Collingwood, 1-165.
- Yamada K., Ko N., Hayashi M., Fukazawa M., Suzuki I., Nishimura M., 2007. Cytosolic HSP90 regulated the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 282: 37794-37804.
- Yamori W., Suzuki K., Noguchi K., Nakai M., Terashima I., 2006. Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant Cell Environ.*, 29: 1659-1670.
- Yamori W., von Caemmerer S., 2009. Effect of Rubisco activase deficiency on the temperature response of CO₂ assimilation rate and Rubisco activation state: insights from transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco activase. *Plant Physiol.*, 151: 2073-2082.
- Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I., 2010. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. *Plant Physiol.*, 152: 388-399.
- Yamori W., Masumoto C., Fukayama H., Makino A., 2012. Rubisco activase is a key regulator of non-steady state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant J.*, 71: 871-880.
- Yamori W., Hikosaka K., Way A.A., 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4 and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthes. Res.*, 119: 101-117.

8 Rola modyfikacji aktywności cyklu ksantofilowego w podnoszeniu tolerancji roślin na stres cieplny

Magdalena Trojak^{1*} / Ernest Skowron² / Tomasz Sobala²

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Biologii

¹ Zakład Biochemii i Genetyki

² Zakład Ochrony Przyrody i Fizjologii Roślin

ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
e-mail: * magdalenatrojak@onet.pl

Streszczenie: Cykl ksantofilowy, zaangażowany w regulowany mechanizm rozpraszania nadmiaru energii świetlnej, odgrywa kluczową rolę w ochronie struktur aparatu fotosyntetycznego. Modyfikacja jego przebiegu może zostać wykorzystana w uprawie roślin poddanych jednoczesnemu stresowi radiacyjnemu i termicznemu, przyczyniając się do złagodzenia ich negatywnych skutków. Celem badania była ocena efektywności działania regulatorów cyklu ksantofilowego w warunkach stresu cieplnego, po inkubacji w ciemności i wstępnej ekspozycji na światło. Analizę wpływu związków modyfikujących aktywność cyklu na termoodporność roślin przeprowadzono na jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare* L., odmiana „Zenek”), mierząc zmiany wartości parametrów fluorescencji (metodą PAM), w tym kierunek transferu energii zaabsorbowanej przez PSII. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, w przypadku kwasu askorbinowego (donor siły redukcyjnej) oraz putrescyny (bufor jonów wodorowych), wzrost wartości $\Phi(\text{NPQ})$ wraz ze wzrostem temperatury. W przypadku DTT (inhibitor deepoksydazy wiolaksantyny) wykazano obniżenie aktywności cyklu ksantofilowego, natomiast po zastosowaniu jonów wapnia (aktywator enzymów) w temperaturze 45°C, zanotowano obniżenie wartości $\Phi(\text{NPQ})$ w ciemności i znaczący wzrost po ekspozycji na światło oraz wyższą wartość $\Phi(\text{NO})$, co chroni PSII przed nadmiarem energii i fotoinhibicją. W temperaturze 25°C regulatory stymulowały aktywność fotosyntetyczną, nie oddziałując na wartość $\Phi(\text{NPQ})$. Poznanie mechanizmów działania związków wpływających na regulację przebiegu cyklu ksantofilowego, stwarza możliwość kontrolowania odpowiedzi roślin na stres cieplny, przyczyniając się do poprawy termoodporności, co skutkuje zwiększeniem ich przeżywalności i wysokości uzyskiwanego plonu.

Słowa kluczowe: cykl ksantofilowy, ditiotreitol (DTT), jony wapnia (Ca^{2+}), kwas askorbinowy (AsA), putrescyna (Put)

1. Wstęp

Stres cieplny jest głównym czynnikiem środowiskowym, ograniczającym wzrost i wydajność roślin, w dużej mierze poprzez negatywny wpływ na proces fotosyntezy, który uważany jest za jeden z najbardziej czułych fizjologicznych aspektów funkcjonowania roślin. Podczas długotrwałej ewolucji, rośliny wyższe, aby uniknąć fotoooksydacyjnych uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego z powodu utworzenia reaktywnych form tlenu (ROS), rozwinęły szereg strategii i mechanizmów ochronnych, umożliwiając zarówno obniżenie powstawania lub detoksykację już utworzonych ROS. W chloroplastach istnieją dwa główne szlaki generowania ROS: (1) podczas przeniesienia elektronów na tlen cząsteczkowy przy akceptorze fotosystemu I (PSI) lub fotosystemu II (PSII), co prowadzi do utworzenia rodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), a w następnych reakcjach – nadtlenu wodoru (H_2O_2) lub rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$); oraz (2) przeniesienie energii z chlorofilu tripletowego ($^3Chl^*$) na tlen cząsteczkowy, umożliwiając powstawanie tlenu singletowego ($^1O_2^*$) (Jahns, Holzwarth 2012).

Najważniejszym mechanizmem, równoważącym pochłoniętą energię świetlną z fotosyntezy, a tym samym chroniącym aparat fotosyntetyczny przed fotoinhibicją, jest termiczne rozpraszanie energii, zależne od cyklu ksantofilowego, mierzone jako niefotochemiczne wygaszanie (NPQ) fluorescencji chlorofilu. W cyklu ksantofilowym, zeaksantyna (Z) jest utworzona przez deepoksydowaną wiolaksantynę (V) za pośrednictwem anteraksantyny (A) (Xiong i in. 2012). Konwersja V do Z odbywa się, gdy rośliny oświetlone są silnym światłem, natomiast słabe światło lub ciemność stymulują reakcję odwrotną. W tym procesie zaangażowane są dwa enzymy zlokalizowane po przeciwnych stronach błon tylakoidów: deepoksydaza wiolaksantyny (VDE), występująca od strony światła i katalizująca deepoksydację V do Z, i epoksydaza zeaksantyny (ZE), wykonująca odwrotną reakcję epoksydacji Z do V, zlokalizowana w błonie tylakoidów po stronie stromy (Vaz, Sharma 2011). Znaczenie aktywności cyklu ksantofilowego w podnoszeniu termoodporności roślin jest również pośrednio związane ze zmniejszeniem płynności błon tylakoidalnych w następstwie zwiększenia w nich udziału Z, co stabilizuje strukturę aparatu fotosyntetycznego i podnosi termoodporność roślin (Xiong i in. 2012).

Wykazano, że zastosowanie ditiotritolu (DTT), będącego inhibitorem VDE, wpływa na zmianę natężenia NPQ. DTT, zwany odczynnikiem Clelanda, jest szeroko stosowanym związkiem umożliwiającym redukcję mostków disiarczkowych pomiędzy resztami cysteinowymi, chroniąc grupy sulfhydrylowe przed utlenieniem. Dodatkowo, jak wskazuje Alliegro (2000), mechanizm działania DTT jest zależny od struktury białka, a jego aktywność stwierdzono nawet wobec domen

białkowych, niezawierających reszt cysteinowych. W tym przypadku działanie DTT jest wynikiem hamującej aktywności enzymatycznej chelatacji kationów metali, bądź interakcji DTT z powierzchnią białka, co ogranicza lub uniemożliwia przestrzenne dopasowanie ligandu do miejsca aktywnego. Inhibicja, w przypadku VDE, jest skutkiem zrywania wiązań disiarczkowych w strukturze enzymu (Rockholm, Yamamoto 1996).

Askorbinian (AsA), działając jako przeciwutleniacz, usuwa generowany podczas procesów fotosyntetycznych nadtlenek wodoru w reakcji Mehlera, określanej mianem cyklu woda-woda (WWC) (Leipner i in. 2000). Ponadto, związek ten jest również zaangażowany w modulowanie aktywności PSII dzięki roli jako kofaktor niezbędny dla działania VDE, którego aktywność jest zależna od ΔpH i endogennego stężenia kwasu askorbinowego (Calatayud i in. 1999; Leipner i in. 2000).

Putrescyna (Put) jest diaminą i wraz ze spermidyną (Spd) i sperminą (Spm), stanowią główne poliamidy w roślinach, często określane jako endogenne regulatory wzrostu lub wewnątrzkomórkowe przekaźniki pośredniczące w wielu reakcjach fizjologicznych (Shu i in. 2012). Mechanizm ochronnego działania putrescyny, funkcjonujący w oparciu o model słabych zasad biologicznych (BWB), zaproponowany przez Ioannidis i in. (2012), zakłada, że Put pełni ważną rolę w ustalaniu równowagi składowych gradientu elektrochemicznego (pmf): ΔpH i $\Delta \psi$. W warunkach stresowych, rozładowanie nadmiaru przechwyconej energii jest regulowane przez zwiększenie gradientu protonowego, co powoduje zakwaszenie lumen tylakoidów i inicjację cyklu ksantofilowego, rozpraszającego nadmiar energii. Częsteczki putrescyny, obecne we wnętrzu tylakoidów, wiążąc protony, przechodzą w formę kationową. Dla obdarzonych ładunkiem cząsteczek, błona staje się nieprzepuszczalna, inicjując transport wolnych, niesprotonowanych amin do światła pęcherzyków. Putrescyna, działając w roli bufora, obniża stężenie protonów wodoru, nie zmieniając jednocześnie składowej elektrycznej (utrzymany jest gradient ładunków) zachowuje produkcję ATP (Skowron i in. 2016). Put, z powodu właściwości przeciwutleniających i neutralizujących kwaśne środowisko (Yuan i in. 2015), jest kluczowym sygnałem do zainicjowania fotoprotekcji centrów reakcji fotosyntezy przez zależne od energii niefotochemiczne wygaszanie (qE) (Ioannidis i in. 2012).

Wapń, znany jako regulator wielu procesów fizjologicznych i biochemicznych, w odpowiedzi na stresy abiotyczne roślin, prowadzi do przejściowego podwyższenia wolnego Ca^{2+} , wywołując cykl reakcji biochemicznych, które umożliwiają dostosowanie do odpowiednich warunków (Liang i in. 2009). Fakt, że jony wapnia poprawiają termoodporność roślin, związany jest z utrzymaniem wyższego wskaźnika fotosyntezy pod wpływem stresu, a wywołany przez światło napływ jonów

Ca^{2+} , wpływa nie tylko na koncentrację cytozolowego wolnego Ca^{2+} , ale również na regulację procesów enzymatycznych wewnątrz chloroplastów. Jony wapnia wpływają na fotosyntezę, poprawiając stabilność centrów reakcji PSII poprzez zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w celu zmniejszenia akumulacji reaktywnych form tlenu. Zmniejszenie wewnątrzkomórkowego ROS przyczynia się do ochrony białek PSII, łagodząc uszkodzenia spowodowane stresem, ponieważ wysoki poziom ROS może hamować syntezę białek D1 (Yang i in. 2015).

Badania dotyczące skuteczności działania modulatorów cyklu ksantofilowego w warunkach stresu cieplnego, zarówno po inkubacji w ciemności oraz wstępnej ekspozycji na światło, stają się nieodzowne i mają ogromne znaczenie, ponieważ zwiększenie tolerancji roślin na stres cieplny może być kluczowe w łagodzeniu niepożądanych skutków ocieplającego się klimatu, ograniczającego wysokość uzyskiwanych plonów.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Badania przeprowadzono na jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare* L.), odmiany „Zenek”, rosnącym w kontrolowanych warunkach (temperatura 23°C; promieniowanie (PFD) 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperiod 16/8godz.; względna wilgotność powietrza 55%). Materiał zebrano z drugiego liścia 20-dniowych roślin o podobnej kondycji fizjologicznej, z których wycięto krążki o średnicy 3 mm i przeniesiono na szalki Petriego zawierające bibułę filtracyjną zwilżoną wodą destylowaną. Krążki liściowe pozostawiono na 25 minut w ciemności lub traktowano promieniowaniem o natężeniu 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, odpowiadającym spektrum świetlnemu, przy którym wzrastały badane rośliny. Aby ocenić wpływ poszczególnych związków modyfikujących aktywność cyklu ksantofilowego, materiał roślinny umieszczono w 3 mM roztworze DTT, 10 mM roztworze kwasu askorbinowego, 10 mM roztworze putrescyny, 6 mM roztworze azotanu (V) wapnia oraz w wodzie (kontrola). Następnie każde z nich inkubowano przez 5 minut w ciemności bądź na świetle o natężeniu 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ w łaźni wodnej w wyznaczonej temperaturze, odpowiednio: 25, 35 i 45°C.

2.2. Fluorescencja modulowana (PAM)

W celu oszacowania aktywności fotosyntetycznej PSII, pomiary wykonano w temperaturze pokojowej (25°C) za pomocą fluorymetru IMAGING-PAM (Heinz Walz, Niemcy), wyznaczając parametry związane z kwantową wydajnością PSII:

- **$\Phi(PSII)$** – rzeczywistą wydajność kwantową reakcji w PSII oświetlonego liścia
[$\Phi(PSII)=(Fm'-F)/Fm$];
- **$\Phi(NPQ)$** – wydajność regulowanego wygaszania niefotochemicznego
[$\Phi(NPQ)=1-\Phi(PSII)-1/(NPQ+1+qL(Fm/Fo-1))$];
- **$\Phi(NO)$** – wydajność nieregulowanego wygaszania niefotochemicznego
[$\Phi(NO)=1/(NPQ+1+qL(Fm/Fo-1))$], gdzie: $1=\Phi(PSII)+\Phi(NPQ)+\Phi(NO)$;
- **Fv/Fm** – maksymalną wydajność kwantową PSII;
[$Fv/Fm=(Fm-Fo)/Fm$];

Fm – maksymalna wydajność fluorescencji po adaptacji w ciemności; Fm' – maksymalna wydajność fluorescencji na świetle; F – wskaźnik fluorescencji; Fo – fluorescencja minimalna; qL – wskaźnik wygaszania fotochemicznego.

Eksperyment przeprowadzono w czasie największej aktywności fotosyntetycznej roślin (między godziną 8.30 a 11.00), przy wykorzystaniu światła aktywniczego o długości fali 450 nm (natężenie promieniowania 56 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pomiaru dokonano po 30-minutowej adaptacji liści do ciemności.

2.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA (12.0, StatSoft, Polska). Normalność rozkładu zmiennej losowej zweryfikowano przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji oceniono testem Levene'a ($p=0,05$). W celu oszacowania różnicy w wartościach badanych parametrów w wyznaczonych temperaturach, przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy grupami badano testem Tukey'a, przy poziomie istotności: $p \leq 0,05$.

3. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników (ryc. 1) wykazano, że DTT przy braku światła, ograniczał aktywność cyklu ksantofilowego o blisko 20% w temperaturze 25 i 35°C oraz o 30% – w temperaturze 45°C. Wstępna ekspozycja roślin na światło skutkowała zniesieniem obserwowanego efektu w 25°C, blisko 20% podniesieniem

wartości $\Phi(\text{NPQ})$ w 35°C oraz jej spadkiem o ponad 20% w najwyższej ze stosowanych temperatur. W ciemności, inhibicja aktywności VDE przy udziale DTT nie skutkowała istotnym statystycznie obniżeniem (z wyjątkiem 35°C) rzeczywistej ani maksymalnej wydajności kwantowej PSII. W 45°C wykazano obniżenie wartości F_v/F_m (ryc. 2) i $\Phi(\text{PSII})$ względem kontroli o odpowiednio 12 i 34%. Następstwem ograniczonej przez DTT aktywności cyklu ksantofilowego i jednoczesnego działania światła, jest znaczący wzrost wartości $\Phi(\text{NO})$, wskazujący na niekontrolowany mechanizm rozpraszania energii w tych warunkach.

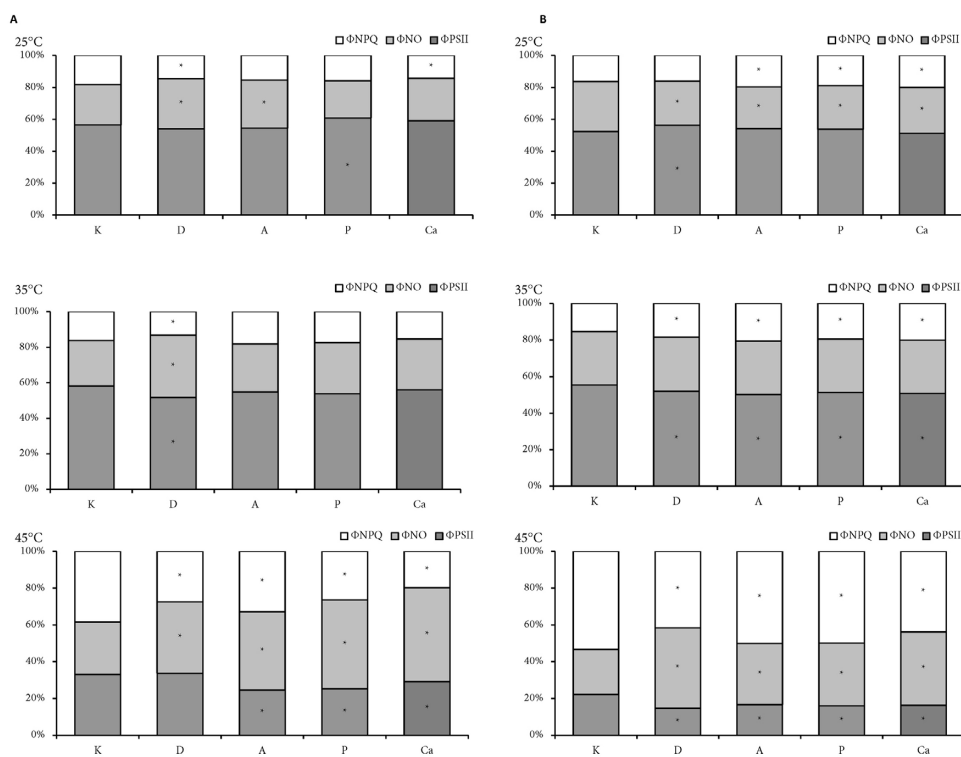
Inkubacja krążków liściowych z AsA skutkowała istotnym, względem kontroli, podniesieniem aktywności NPQ po naświetlaniu o ponad 20% i 33%, odpowiednio w: 25 i 35°C oraz 12% – przy 35°C w ciemności. Dalsze nasilenie stresu termicznego obniżyło $\Phi(\text{NPQ})$, względem kontroli w obu próbach, jednocześnie to właśnie w przypadku AsA obserwowano niski, 6% spadek tej wartości na świetle. W badaniu nie stwierdzono ochronnego działania kwasu askorbinowego na aktywność PSII w podwyższonej temperaturze. Statycznie istotne zmiany w parametrach $\Phi(\text{PSII})$ i F_v/F_m obserwowano wyłącznie na świetle w temperaturze 25°C, w których, po traktowaniu AsA, zanotowano wzrost o blisko 4%.

W badaniu stwierdzono stymulujący wpływ putrescyny na przebieg cyklu, notując ponad 7% wzrost jego aktywności w 35°C bez dostępu światła oraz blisko 15 i 27% w 25 i 35°C – po wstępnej ekspozycji na promieniowanie. W obu przypadkach putrescyna nie zahamowała obniżenia NPQ przy najwyższej ze stosowanych temperatur, jednak po działaniu światła spadek ten, względem kontroli, wyniósł niewiele ponad 6%. W 25°C stwierdzono istotną statystycznie różnicę wartości $\Phi(\text{PSII})$, wyższą w tożsamyh warunkach świetlnych o blisko 7,5 oraz 2,5%. W badaniu nie stwierdzono ochronnego działania putrescyny na maksymalną wydajność PSII w 45°C, notując obniżenie tego parametru, odpowiednio o: 17 i 13%. Nie wykazano również istotnego wpływu putrescyny na zmianę wartości $\Phi(\text{NO})$.

Stwierdzono statystycznie istotny wzrost aktywności cyklu ksantofilowego w próbkach naświetlanych i traktowanych roztworem azotanu (V) wapnia, wynoszący 22 i 30%, odpowiednio w 25 i 35°C. Bez wstępnej ekspozycji na światło, wartości te były niższe od stwierdzonych w kontroli o 12% (25°C) i 5% (35°C). Pomimo zanotowanego spadku wartości $\Phi(\text{NPQ})$ w temperaturze 45°C, stwierdzono pozytywną korelację między wstępną ekspozycją na światło a notowaną aktywnością $\Phi(\text{NPQ})$, która po naświetlaniu była wyższa o blisko 30% w warunkach stresu termicznego, potwierdzając rolę światła, jako nadrzędnego regulatora aktywności cyklu.

4. Dyskusja

W badaniu oceniono wpływ potencjalnych regulatorów cyklu ksantofilowego na jego aktywność bez uprzedniego naświetlania oraz po ekspozycji na światło, oraz znaczenie modyfikacji tej aktywności w utrzymaniu funkcjonalności fotosyntetycznej roślin w warunkach stresu termicznego. Do skutecznej inicjacji cyklu ksantofilowego niezbędne jest światło o natężeniu wysycającym fotosyntezę C3 ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Zhang i in. 2009), warunkujące transport elektronów i powstanie gradientu elektrochemicznego w poprzek błony tylakoidalnej. Spadek pH światła pęcherzyków aktywuje VDE, wykazującej funkcjonalne optimum przy $\text{pH}=5,0$, co umożliwia konwersję V w Z (Jahns i in. 2009).

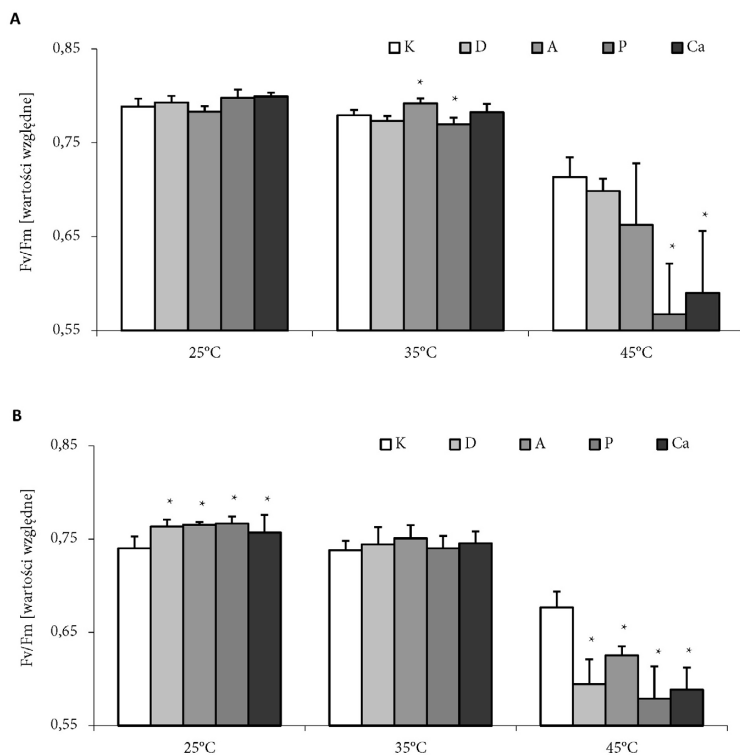


Rycina 1. Procentowy udział wybranych parametrów kwantowej wydajności fotosyntetycznej PSII jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L., odmiana „Zenek”), A: bez wcześniejszego naświetlania (0 PFD), B: po uprzednim traktowaniu promieniowaniem (500 PFD) w różnych warunkach temperaturowych (25, 35, 45°C); n=6.

* – oznaczają różnice statystycznie istotne pomiędzy kontrolą (K) a poszczególnymi grupami (DTT-D, AsA-A, Put-P, Ca^{2+} -Ca) badanej rośliny.

Źródło: Opracowanie własne.

Badania wykazały, że związki karotenoidowe odgrywają również kluczową rolę w dezaktywacji $^3\text{Chl}^*$ i $^1\text{O}_2^*$ w PSII oraz redukcji powstawania ROS – z powodu rozpraszania pochłanianej energii promieniowania świetlnego w postaci ciepła (NPQ) na poziomie chlorofilu singletowego ($^1\text{Chl}^*$) (Müller-Moulé i in. 2002; Jahns, Holzwarth 2012).



Rycina 2. Maksymalna wydajność kwantowa PSII jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L. odmiana „Zenek”), A: bez wcześniejszego naświetlania (0 PFD), B: po uprzednim traktowaniu promieniowaniem (500 PFD) w różnych warunkach temperaturowych (25, 35, 45°C); n=6.

* – oznaczają różnice statystycznie istotne pomiędzy kontrolą (K) a poszczególnymi grupami (DTT-D, AsA-A, Put-P, Ca^{2+} -Ca) badanej rośliny.

Źródło: Opracowanie własne.

W powstawanie ROS zaangażowana jest również reakcja peroksydazy Mehlera, która polega na fotoredukcji tlenu przez PSI do anionorodnika ponadtlenkowego, a następnie przez jego dysmutację do tlenu i nadtlenu wodoru, zredukowanego z udziałem peroksydazy askorbinianu (APX) do wody (Müller-Moulé i in. 2002).

Wykazano, że reakcja peroksydazy Mehlera może ograniczać qE przez zmniejszenie dostępności askorbinianu do reakcji VDE w tylakoidach chloroplastów (Neubauer, Yamamoto 1994; Müller-Moulé i in. 2002), gromadzących znaczną (20-40%) ilość AsA obecnego w komórkach mezofilu. Ma to bezpośredni związek z szeregiem funkcji spełnianych przez AsA, w tym kofaktora i kosubstratu reakcji enzymatycznych, których przebieg może być limitowany dostępnością fizjologicznie aktywnej (zredukowanej) formy AsA. Badania Müller-Moulé i in. (2002) oraz Yin i in. (2010) potwierdziły, że ograniczona dostępność kwasu askorbinowego bezpośrednio wpływa na aktywność cyklu ksantofilowego przez ograniczenie aktywności VDE, szczególnie w warunkach stresowych, w których wzrasta aktywność enzymatyczna APX. Pomimo wyższego powinowactwa VDE do AsA, to peroksydaza stanowi główny kompetytor deepoksydazy, ze względu na jej blisko 30-krotnie wyższe stężenie w tylakoidach oraz lokalizację w stromie, co skutkuje wykorzystaniem AsA jeszcze przed jego przeniknięciem do lumen. Znaczenie AsA i reakcji Mehlera ma również związek z generowanym przez „pseudocykliczny” przepływ elektronów gradientem H^+ , istotnym dla tworzenia Z i qE w chloroplastach (Neubauer, Yamamoto 1994). Zastosowanie w badaniu AsA skutkowało podniesieniem aktywności cyklu ksantofilowego w zakresie temperatur 25-35°C oraz wyłącznie niewielkim spadkiem w warunkach stresu termicznego (45°C). Pozytywny efekt stwierdzono w uprzednio naświetlanych próbkach, wykazując 1,2- oraz 1,3-krotne nasilenie NPQ dla odpowiednio: 25 i 35°C, potwierdzając kluczową rolę światła w szybkim generowaniu gradientu pH we wstępnym etapie fotosyntezy przy udziale WWC. Ograniczony ochronny wpływ AsA na utrzymanie Fv/Fm stwierdzono wyłącznie w 25°C, nie wykazując jego protekcyjnej roli w warunkach stresu termicznego, pomimo wyznaczonej we wcześniejszych badaniach roli AsA w utrzymaniu potencjału antyoksydacyjnego komórki (Müller-Moulé i in. 2002).

DTT zastosowany w badaniu skutecznie ograniczył aktywność cyklu ksantofilowego w próbach poddanych stresowi termicznemu, w których zanotowano spadek wartości $\Phi(NPQ)$, o odpowiednio: 20 i 30%, bez i po wstępnej ekspozycji na światło. Naświetlanie próbek przed zastosowaniem DTT pozwala na ocenę, w jakim stopniu aktywacja NPQ ma związek z podwyższeniem temperatury, gdyż DTT-zależna inhibicja VDE wystąpiła już po wstępnej aktywności enzymu, pozwalając na wytworzenie określonej puli Z. W temperaturze 45°C $\Delta\Phi(NPQ)$ [$\Delta\Phi(NPQ) = (\Phi(NPQ)_{0PFD} - \Phi(NPQ)_{500PFD}) \times 100\%$] wyniosła 10%, wskazując, że w warunkach stresu termicznego, światło tylko w ograniczonym stopniu pozwala utrzymać aktywność cyklu ksantofilowego. Potwierdzają to również badania Agrawala i in. (2016), w których po przekroczeniu temperatury 40°C, mechanizm rozpraszania energii uległ załamaniu kosztem nieregulowanych strat energii $\Phi(NO)$. W tym

badaniu zanotowano gwałtowny wzrost wartości $\Phi(\text{NO})$ w 45°C, wynoszący: 36 i 79% (w ciemności i po oświetleniu). Mechanizm DTT, jako inhibitora cyklu ksantofilowego, wynika z faktu, że VDE zachowuje funkcjonalność tylko w formie utlenionej, do której utrzymania kluczowe jest 6 wiązań disiarczkowych, a zerwanie nawet jednego z nich, na skutek działania DTT, powoduje inaktywację enzymu (Simionato i in. 2015).

W obecnym badaniu, egzogenna Put odgrywa kluczową rolę w ochronie PSII poprzez zwiększenie rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia w postaci ciepła. Spadek wartości Fv/Fm sugeruje, że stres cieplny indukuje wygaszanie fluorescencji, a większe wartości Fv/Fm wskazują, że nadmiar energii jest rozpraszany w postaci ciepła w kompleksie antenowym, co powoduje zmniejszenie wydajności kwantowej. Egzogenne zastosowanie Put zwiększa $\Phi(\text{NPQ})$, szczególnie po ekspozycji na światło, w temperaturze 25 i 35°C, aktywując fotoprotekcję, co potwierdza jej udział w poprawie zdolności rozpraszania ciepła i regulacji stanu deepoksydacji cyklu ksantofilowego. W 45°C nie wykazano wpływu Put na zmianę wartości $\Phi(\text{NO})$, na co wskazuje w badaniach Ioannidis i in. (2012), podkreślając znaczenie jej aktywności w regulacji wartości ΔpH gradientu protonów i zależnej od niego aktywacji VDE, oraz zdecydowanego obniżenia termicznych strat energii. Put odgrywa ważną rolę w modulowaniu *pmf in vivo* za pomocą mechanizmu BWB, prawdopodobnie działając jako część sieci regulującej fotosyntezę. Put może zapewnić roślinie niezależny mechanizm dostosowania reakcji qE do *pmf* oraz optymalizację równowagi pomiędzy przekazaniem energii a rozproszeniem w warunkach stresu (Ioannidis i in. 2012).

Zmiana w poziomie Ca^{2+} uruchamia szeroki zakres szlaków transdukcji sygnałów z powodu dużego powinowactwa białek wiążących jony wapnia, takich jak kalmodulina (CaM), która aktywuje szereg enzymów docelowych oraz nieenzymatycznych białek poprzez wiązanie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , odgrywając ważną rolę jako przekaźnik w regulacji metabolizmu i ekspresji genów. Zróżnicowana przepuszczalność błony komórkowej pozwala na kontrolowaną wymianę między komórką a środowiskiem. Zhao i Tan (2005) dowiedli, że w wyniku wzrostu temperatury, następuje znaczny wzrost wycieku elektrolitów, co sugeruje, że nastąpiły poważne uszkodzenia błony komórkowej. Dlatego wstępne traktowanie jonami Ca^{2+} znacznie złagodziło wyciek elektrolitów, co oznacza, że jony Ca^{2+} mogą chronić błonę komórkową przed uszkodzeniem spowodowanym stresem temperaturowym. Traktowanie egzogennymi jonami wapnia przyczyniło się do podwyższenia zależnego od cyklu ksantofilowego rozpraszania energii (NPQ) (25 i 35°C) oraz tłumienia fotoinhibicji PSII, co potwierdzono również w badaniach Yang i in. (2015). Zatem można spekulować, że egzogenne Ca^{2+} odgrywa istotną rolę

w ochronie podjednostki centrów reakcji PSII przed fotoinhibicją, poprzez redukcję generowania ROS. W związku z tym, egzogenne Ca^{2+} wydaje się odgrywać ważną rolę w łagodzeniu stresu oksydacyjnego i uszkodzeń składników komórkowych, takich jak lipidy błony komórkowej. Pod wpływem stresu cieplnego i wysokiej temperatury, Ca^{2+} odgrywa ważną funkcję w stabilizowaniu kompleksów białkowych i utrzymaniu aktywności PSII. W niniejszym badaniu, traktowanie jonami wapnia, mogłoby pomóc w usuwaniu ROS poprzez indukcję etapu elongacji translacji genu *pbsA2*, który koduje białko D1, powodując zwiększoną ochronę naprawy PSII (Yang i in. 2015).

Podsumowując, spośród zastosowanych związków, kwas askorbinowy najsukcesyjniej modyfikował aktywność cyklu ksantofilowego, gdyż jego endogenne stężenie jest czynnikiem limitującym aktywność VDE. Podobny efekt zaobserwowano po traktowaniu Put, co związane jest ze zwiększonym rozpraszaniem ciepła w wyniku przyspieszania reakcji deepoksydacji. Ponadto wykazano, że oba wymienione związki podnoszą termoodporność badanej odmiany jęczmienia tylko w zakresie 25 i 35°C, ponieważ wzrost temperatury powyżej 45°C skutkuje nieodwracalną utratą aktywności fotosyntetycznej. Ochronne działanie jonów Ca^{2+} , stwierdzone wyłącznie dla prób uprzednio naświetlanych, ma związek ze stymulującym wpływem na regenerację białka D1. Zastosowanie DTT skutkowało ograniczeniem aktywności zależnego od aktywności cyklu ksantofilowego rozpraszania energii (NPQ).

Podziękowania

Badania wykonane w ramach realizacji projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: 612078.

Literatura

- Agrawal D., Allakhverdiev S.I., Jajoo A., 2016. Cyclic electron flow plays an important role in protection of spinach leaves under high temperature stress. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2: 210-215.
- Alliegro M.C., 2000. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal. Biochem.*, 1:102-106.
- Calatayud A., Deltoro V.I., Abadía A., Abadía J., Barreno E., 1999. Effects of ascorbate feeding on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in the lichen *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio exposed to atmospheric pollutants. *Physiol. Plant.*, 4: 679-684.

- Ioannidis N.E., Cruz J.A., Kotzabasis K., Kramer D.M., 2012. Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit. *PloS one*, 1: e29864.
- Jahns P., Holzwarth A.R., 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *BBA-Bioenergetics*, 1: 182-193.
- Jahns P., Latowski D., Strzalka K., 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787: 3-14.
- Leipner J., Stamp P., Fracheboud Y., 2000. Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta*, 6: 964-969.
- Liang W., Wang M., Ai X., 2009. The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. *Sci. Hortic.*, 123: 34-38.
- Müller-Moulé P., Conklin P.L., Niyogi K.K., 2002. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol.*, 3: 970-977.
- Neubauer C., Yamamoto H.Y., 1994. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynth. Res.*, 39: 137-147.
- Rockholm D.C., Yamamoto H.Y., 1996. Violaxanthin de-epoxidase (purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride). *Plant Physiol.*, 2: 697-703.
- Shu S., Yuan L., Guo S., Sun J., Liu C., 2012. Effects of exogenous spermidine on photosynthesis, xanthophyll cycle and endogenous polyamines in cucumber seedlings exposed to salinity. *Afr. J. Biotechnol.*, 22: 6064-6074.
- Simionato D., Basso S., Zaffagnini M., Lana T., Marzotto F., Trost P., Morosinotto T., 2015. Protein redox regulation in the thylakoid lumen: The importance of disulfide bonds for violaxanthin de-epoxidase. *FEBS Lett.*, 589: 919-923.
- Skowron E., Trojak M., Sobala T., 2016. Wykorzystanie regulatorów stresowej odpowiedzi do podnoszenia tolerancji roślin na suszę. [w:] K. Krasiński, (red.), *Interdyscyplinarność jako droga do rozwoju IV*. Wyd. FUNDACJA HUTENA, Elbląg, ISBN: 978-83-945304-1-9, 43-54.
- Vaz J., Sharma P.K., 2011. Relationship between xanthophyll cycle and non-photochemical quenching in rice (*Oryza sativa* L.) plants in response to light stress. *Indian J. Exp. Biol.*, 1: 60-67.
- Xiong X., Wang X., Liao M., 2012. Xanthophyll cycle and its relative enzymes. *J. Life Sci.*, 6: 980-984.
- Yang S., Wang F., Guo F., Meng J.J., Li X.G., Wan S.B., 2015. Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. *J. Integr. Plant Biol.*, 57: 486-495.

- Yin Y., Li S., Liao W., Lu Q., Wen X., Lu C., 2010. Photosystem II photochemistry, photoinhibition, and the xanthophyll cycle in heat-stressed rice leaves. *J. Plant Physiol.*, 167: 959-966.
- Yuan Y., Zhong M., Shu S., Du N., He L., Yuan L., Sun J., Guo S., 2015. Effects of exogenous putrescine on leaf anatomy and carbohydrate metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under salt stress. *J. Plant Growth Regul.*, 3: 451-464.
- Zhang R., Cruz J.A., Kramer D.M., Magallanes-Lundback M.E., Dellapenna D., Sharkey T.D., 2009. Moderate heat stress reduces the pH component of the transthylakoid proton motive force in light-adapted, intact tobacco leaves. *Plant. Cell Environ.*, 11: 1538-1547.
- Zhao H.J., Tan J.F., 2005. Role of calcium ion in protection against heat and high irradiance stress-induced oxidative damage to photosynthesis of wheat leaves. *Photosynthetica*, 43: 473-476.

Aleksandra **Koźmińska** / Iwona **Kamińska** / Ewa **Hanus-Fajerska***

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii
Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin

Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

* email: e.hanus@ogr.ar.krakow.pl

Streszczenie: Zasolenie to, obok suszy, jeden z głównych czynników środowiskowych, który na całym świecie wydatnie zmniejsza produkcję roślin użytkowanych przez człowieka i ogranicza zasięg gatunków rosnących na naturalnych stanowiskach. Obecnie celem o globalnym znaczeniu jest zwiększenie zasobów roślin odpornych na ten groźny stres środowiskowy, co będzie prowadzone poprzez doskonalenie genetyczne organizmów. Wymaga to bardzo precyzyjnego zrozumienia mechanizmów warunkujących nabycie cechy tolerancji przez poszczególne genotypy. Tolerancja może być warunkowana sprawną syntezą organicznych, łatwo rozpuszczalnych w wodzie, substancji niskocząsteczkowych – osmolitów (ang. *osmolytes*, *compatible solutes*), co zapewnia sprawną regulację osmotyczną komórek. Związki te pełnią równocześnie rolę osmoprotektantów. Jednak szereg aspektów związanych z mechanizmem ich działania pozostaje jeszcze do zbadania, szczególnie w zakresie istotności względnego udziału poszczególnych związków w tolerancji na stres danego gatunku. W pracy przedstawiono przegląd doniesień naukowych wskazujących na istotną rolę osmolitów w generowaniu tolerancji na zasolenie u wybranych gatunków roślin.

Słowa kluczowe: halofity, osmolity, stres abiotyczny, tolerancja, zasolenie

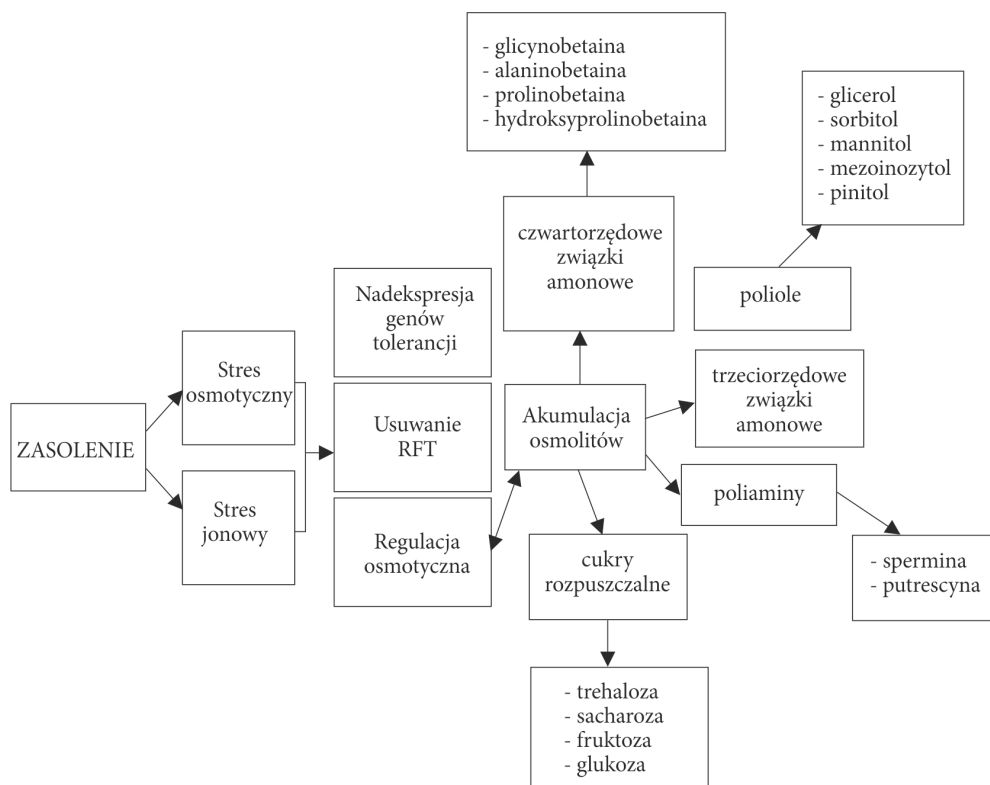
1. Wstęp

Zasolenie gleby wywołuje dwa rodzaje stresów u roślin: stres osmotyczny oraz stres związany z toksycznością jonów. Stres osmotyczny, generowany nie tylko poprzez zasolenie, ale również przez suszę, chłód czy wysoką temperaturę, wynika z nadmiernego odwodnienia protoplastu i utraty turgoru przez komórki roślinne (Greenway, Munns 1980; Serrano, Gaxiola 1994). Specyficznym skutkiem nadmiernego zasolenia jest wewnątrzkomórkowa akumulacja jonów Na^+ i Cl^- w wysokich stężeniach. Działanie toksyczne tych jonów wyraża się poprzez obniżanie aktywności wielu układów enzymatycznych i niektórych podstawowych procesów komórkowych, takich jak synteza białka czy przetwarzanie mRNA. Niekorzystny nadmiar jonów sodu i chloru prowadzi do zmniejszenia wydajności fotosyntezy poprzez ograniczenie przewodności szparkowej i redukcję asymilacji CO_2 , a także generuje stres oksydacyjny. Chlorek sodu również oddziałuje negatywnie na odżywianie mineralne roślin poprzez zakłócanie wychwytu jonów K^+ i Ca^{2+} (Yeo 1998; Zhu 2001). Jeśli granice tolerancji określonego gatunku (genotypu) są przekroczone, zwykle dochodzi do zahamowania wzrostu rośliny, a czasem nawet do jej śmierci. Wśród konserwatywnych mechanizmów nadających tolerancję roślin na stres, najważniejsze są oparte na: 1) kontroli homeostazy jonowej (segmentacji jonów toksycznych w wakuoli, wykluczania soli z pobierania, przemieszczania soli pomiędzy organami rośliny, usuwania nadmiaru soli), 2) komórkowej równowadze osmotycznej, czyli regulacji transportu wody do komórek, syntezie i akumulacji kompatybilnych substancji rozpuszczonych w cytoplazmie, oraz 3) aktywacji systemu antyoksydacyjnego (ryc. 1), zarówno enzymatycznego (dysmutaza nadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa) oraz nieenzymatycznego (zredukowany glutation, witaminy C i E, flawonoidy, karotenoidy i inne związki fenolowe) (Zhu 2001; Munns 2002; Vinocur, Altman 2005; Flowers, Colmer 2015).

2. Roślinne substancje kompatybilne

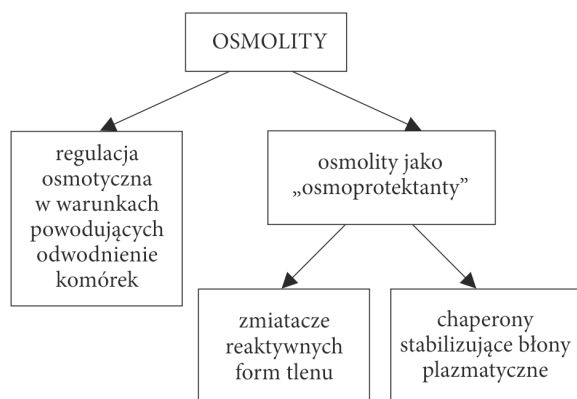
Synteza i gromadzenie rozpuszczonych substancji kompatybilnych, określanych też mianem metabolitów stresowych, pozwala na utrzymanie równowagi osmotycznej pomiędzy wakuolą, w której gromadzone są jony a cytoplazmą (Hussain i in. 2008; Parvaiz, Satyawati 2008). Nagromadzenie tych związków jest odpowiedzią na stresy środowiskowe prowadzące do odwodnienia komórki, indukowa-

ne u wszystkich organizmów, nie tylko u roślin (Burg i in. 1996), co stanowi uderzający przykład zbieżnej ewolucji. Jednak trudno ustalić czy natężenie stresu, powodujące wzrost stężenia określonego osmolitu, pełni w mechanizmach tolerancji danego gatunku rolę funkcjonalną, czy jest to tylko odpowiedź krótkotrwała, niekoniecznie nadająca tolerancję. Osmolity są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie, mają niski ciężar cząsteczkowy i nie zakłócają normalnego metabolizmu, nawet w wysokich stężeniach (stąd termin „rozpuszczone substancje kompatybilne”). Typ wytwarzanych przez rośliny metabolitów stresowych jest specyficzny dla gatunku. W komórce, do substancji gromadzonych w warunkach stresu solnego, mogą się zaliczać jony pierwiastków, takie jak K^+ czy Ca^{2+} . Jednak większość substancji kompatybilnych stanowią związki organiczne, wśród których wyróżnić należy cukry proste i złożone, związki azotu (ang. *nitrogen containing compounds*, NCC), wielowodorotlenowe alkohole cukrowe – poliole (glicerol, mannitol, sorbitol, mezoinozytol, pinitol) (Sairam, Tyagi 2004; Groppa, Benavides 2008; Parvaiz, Satyawati 2008). Osmolity są różnicowane chemicznie. Zalicza się do nich niektóre aminokwasy, takie jak prolina (Pro), metylowane czwartorzędowe związki amoniowe (QAC), takie jak glicynobetaina (GB), alaninobetaina, prolinobetaina, hydroksyprolinobetaina; poliaminy (spermina, putrescyna) (ryc. 1), a także trzeciorzędowe związki sulfoniowe (dimetylosulfopropionian) oraz cukry rozpuszczalne (trehaloza, sacharoza, fruktoza i glukoza) (Rhodes, Hanson 1993; Murakeozy i in. 2003; Sairam, Tyagi 2004; Bartels, Sunkar 2005). Poza rolą w regulacji osmotycznej komórki, osmolity pełnią dodatkowe funkcje w reakcji na zaistniały stres. Działają bowiem jako osmoprotektanty (ryc. 2), które mogą bezpośrednio stabilizować białka i struktury membranowe w warunkach odwodnienia (działanie chaperonów o niskiej masie cząsteczkowej, białek LEA (ang. *late embryogenesis abundant proteins*) oraz chronią komórki przed stresem oksydacyjnym jako wymiatacze reaktywnych form tlenu (RFT) (Shen i in. 1997; Akashi i in. 2001; Zhu 2001; Chen, Murata 2002; Ashraf, Foolad 2007; Szabados, Savouré 2010).



Rycina 1. Reakcje roślin na stres zasolenia z wyszczególnieniem strategii akumulacji związków osmotycznie czynnych.

Źródło: opracowanie własne



Rycina 2. Funkcje osmotolitów

Źródło: opracowanie własne

3. Reakcje halofitów oraz glikofitów na zasolenie

Zdecydowana większość gatunków uprawnych wykazuje podatność na stres abiotyczny, w tym również na zasolenie. Udomowienie oraz etap hodowli roślin uprawnych poprzez dobór cech, takich jak szybsze tempo wzrostu biomasy czy zwiększona produkcja owoców bądź nasion, nie spowodowały wzrostu tolerancji na czynniki stresowe. Rośliny uprawne zwykle wykazują niższy stopień odporności na stres abiotyczny w porównaniu do ich dziko rosnących przodków (Cominelli i in. 2013; Kosová i in. 2013). W naturze, hamowanie wzrostu wegetatywnego oraz rozwoju generatywnego, jest bezpośrednią odpowiedzią osobnika na stres, a rośliny wykorzystują wszystkie swoje zasoby (zasoby energetyczne, prekursorzy metaboliczne), aby przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe (Serrano, Gaxiola 1994; Zhu 2001). Pomimo tego istnieją w przyrodzie gatunki, określane jako halofity (słonorośla), które są przystosowane do zasolenia i występują jedynie na glebach słonych (Czarna, Wawrzyniak 2007; Gull i in. 2013; Flowers, Colmer 2015; Wang i in. 2015). W tych typach siedlisk, dodatkowym czynnikiem ograniczającym rozwój roślin jest zwykle niedobór składników odżywczych w podłożu, dlatego jedynie tolerancyjne genotypy mogą kiełkować, a następnie przeprowadzić cały cykl życiowy. Słonorośla są przystosowane do wzrostu i rozwoju w siedliskach, w których zasolenie gleby wynosi co najmniej 200 mM NaCl (Flowers, Colmer 2008). Rośliny halofilne stanowią zaledwie około 0,25% okrytonasiennych, co wynosi blisko 350 gatunków klasyfikowanych do wąskiej liczby rodzin botanicznych i należących do nielicznych rodzajów (Flowers i in. 2010). Rosną one w mokrych słonych bagnach śródlądowych, a także w suchych siedliskach, takich jak pustynie solankowe, wydmy i klify w obszarach przybrzeżnych. Odporność na zasolenie podłoża jest uzależniona od zdolności do akumulowania jonów Na^+ i Cl^- w wakuoli, dzięki czemu ich stężenie w cytoplazmie jest zasadniczo niższe, unikając w ten sposób hamowania procesów metabolicznych (Flowers i in. 1986; Serrano i Gaxiola 1994). Jednocześnie synteza i akumulacja kompatybilnych substancji rozpuszczonych w cytoplazmie stanowi podstawowy mechanizm utrzymujący komórkową równowagę osmotyczną (Flowers, Colmer 2015).

Jak wykazano powyżej, istnieją liczne publikacje z dziedziny botaniki i ekologii dotyczące halofitów i siedlisk, na których występują. Odpowiedź tych organizmów na stresowe warunki siedliskowe została również zbadana pod kątem fizjologicznym, a także do pewnego stopnia na poziomie biochemicznym. Jednakże niewiele wiadomo na temat podstaw molekularnych mechanizmów tolerancji na stres w tej grupie roślin (Gupta, Huang 2014). Paradoksalnie, większość badań na temat odpowiedzi na stres i tolerancji na stres roślin przeprowadzono na gatunkach mo-

delowych, które nie są odporne, a zwłaszcza na *Arabidopsis thaliana*, i w mniejszym stopniu na niektórych gatunkach uprawianych przez człowieka (Sanders 2000; Zhu 2000, 2001; Kosová i in. 2013), które *a priori* nie wydają się być najbardziej odpowiednim materiałem roślinnym dla tego typu prac. Tym niemniej, wykorzystywanie innych genotypów aniżeli gatunki tolerancyjne, może być co najmniej częściowo uzasadnione, gdyż istnieją dowody na to, iż zarówno rośliny wrażliwe (glikofity – rośliny wrażliwe na zasolenie), jak i odporne (halofity) wykorzystują te same podstawowe mechanizmy odpowiedzi na stres abiotyczny. Mechanizmy te niejako nakładają się na siebie dla obu grup, jak również są wspólne dla różnych rodzajów stresów środowiskowych. Natomiast stopień tolerancji na zasolenie u *Arabidopsis thaliana*, czy u innych gatunków modelowych nie jest porównywalny do spotykanego u roślin dziko rosnących, przystosowanych do ekstremalnych warunków środowiskowych. Mechanizmy odpowiedzi na stres zasolenia, występujące u dzikich gatunków, są o wiele bardziej skuteczne niż te, obecne w modelach nietolerancyjnych, choć podstawy molekularne są wspólne (Sanders 2000; Ellouzi i in. 2014).

Możliwym wyjaśnieniem znacznych różnic w tolerancji na stres między poszczególnymi gatunkami roślin jest obecność, lub jej brak, pewnych białek biorących udział w reakcji na stres. Białka te odgrywają kluczową rolę w mechanizmach tolerancji: mają wyższe poziomy ekspresji lub aktywności wewnętrznej u tolerancyjnych taksonów, w stosunku do białek homologicznych u gatunków wrażliwych. Są kodowane przez tak zwane geny tolerancji stresu i mogą obejmować, między innymi: transportery jonowe zlokalizowane w błonie komórkowej i tonoplazmie; enzymy zaangażowane w syntezę osmolitów, enzymy systemu antyoksydacyjnego lub regulatory ekspresji, specyficzne czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe (Wang i in. 2013). Różnice w poziomach ekspresji genów mogą być spowodowane względną siłą odpowiednich promotorów lub różnicami w ich mechanizmach regulacyjnych (Kosová i in. 2013; Gupta, Huang 2014). Geny tolerancji mogą być indukowane w warunkach stresowych u gatunków tolerancyjnych, a ich geny homologiczne nie są indukowane u roślin podatnych na stres. W związku z tym, dzikie gatunki roślin halofilnych stanowią dogodne źródło genów i ich elementów regulacyjnych. Po wyizolowaniu oraz scharakteryzowaniu, są stosowane jako narzędzia biotechnologiczne w celu genetycznej poprawy tolerancji u roślin uprawnych (transgeniczných) (Himabindu i in. 2016). Zakłada się, że tego rodzaju narzędzia będą bardziej skuteczne, niż do tej pory dostępne wyizolowane z modeli nietolerancyjnych. Rozwój upraw transgeniczných, tolerujących zasolenie czy inne stresy abiotyczne, jest jedną ze strategii, która w znacznym stopniu przyczyni się do zwiększenia wydajności produkcji rolniczej, a tym samym produkcji żywności,

co jest niezbędne do zasilenia rosnącej populacji w globalnym kontekście zmian klimatycznych (Rozema, Schat 2013).

Istnieją również doniesienia dotyczące pomiarów biochemicznych markerów stresowych, a konkretnie różnych osmolitów, wykorzystując materiał roślinny obejmujący halofity, które dostarczyły informacji na temat różnych mechanizmów odpowiedzi na stres solny tych tolerancyjnych taksonów. Niektóre z tych badań są przedstawione w niniejszej pracy.

4. Badania laboratoryjne dotyczące akumulacji osmolitów

Prace badawcze nad wpływem różnych osmoregulatorów na rośliny poddane działaniu stresu solnego są prowadzone od połowy XX w. W toku badań prowadzonych na halofitach i glikofitach potwierdzono, że w warunkach stresu solnego, rośliny odporne na zasolenie gromadzą więcej aminokwasów, a także iminokwasu, proliny, niż odmiany wrażliwe. U roślin narażonych na działanie zasolenia, odnotowano gromadzenie się amidów, takich jak glutamina i asparagina (Mansour 2000; Parvaiz, Satyawati 2008; Kosowska 2010). W warunkach stresowych, stwierdzono również wzrost ilości poliamin, jednak odnotowano różnice zarówno pomiędzy gatunkami, jak i w obrębie gatunków, co do ilości i rodzaju gromadzonych związków. Ochronne działanie poliamin potwierdza fakt, iż ich egzogenna aplikacja pozwala na złagodzenie efektów zasolenia u kilku gatunków roślin (Mansour 2000; Groppa, Benavides 2008). W odpowiedzi na stres solny, rośliny produkują także specyficzne klasy białek, które mogą być syntetyzowane *de novo* w odpowiedzi na zaistniały stres, bądź też mogą być stale obecne w małych ilościach w komórkach (Parvaiz, Satyawati 2008). Do białek zaangażowanych w reakcje na stres solny zalicza się pompy protonowe (H^+ -ATPazy), antyportery Na^+/H^+ , akwaporyny, osmotyny, dehydryny oraz białka obronne typu LEA (Sairam, Tyagi 2004). Osmotyny i dehydryny wykazują właściwości podobne do białek opiekuńczych i są najprawdopodobniej zaangażowane w utrzymanie struktury białek w warunkach zasolenia, mogą również stabilizować strukturę błon komórkowych (Tester, Davenport 2003). Funkcja białek obronnych typu LEA nie jest znana, jednakże przypuszcza się, iż zachowują się one jak molekuły wiążące wodę, a także biorą udział w kompartmentacji jonów oraz stabilizacji błon biologicznych i makromolekuł (Wang i in. 2003; Kosowska 2010).

Prolina to jeden z najczęstszych osmolitów występujący w roślinach i gromadzony w komórkach w wielu różnych sytuacjach stresowych, takich jak: zasolenie, susza, mróz, wysoka temperatura, brak substancji odżywczych, obecność metali

ciężkich, zanieczyszczeń powietrza czy promieniowania UV (Grigore i in. 2011). Oprócz udziału w regulacji osmotycznej, prolina może odgrywać inną rolę w mechanizmach tolerancji na stres, takich jak: bezpośrednia stabilizacja białek, błon i innych struktur subkomórkowych, wychwytywanie wolnych rodników, bilansowanie stanu redoks komórki w warunkach stresu czy aktywacji ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na stres (Verbruggen, Hermans 2008; Szabados, Savouré 2010).

Glicynobetaina to kolejny osmolit syntetyzowany w odpowiedzi roślin na działanie stresu solnego u wielu różnych grup organizmów (Ashraf, Foolad 2007). Istnieją doniesienia naukowe na temat endogennego gromadzenia glicynobetainy w bardzo wysokich stężeniach u gatunków o wysokim stopniu tolerancji zasolenia, takich jak: *Inula crithmoides*, *Sarcocornia fruticosa*, *Salicornia europaea* (Gil i in. 2014). Trzeciorzędowe związki sulfoniowe, jako osmolity, identyfikowano głównie w glonach morskich i w kilku rodzinach roślin wyższych (Asteraceae, Poaceae) (Rhodes i in. 2002). Poliole (głównie sorbitol, mannitol, mezoinozytol oraz cykliczne poliole) są ważną grupą osmolitów w warunkach, gdy synteza podstawowych osmoprotektantów (proliny) jest ograniczona na skutek niedoborów azotu (Rhodes i in. 2002).

Określenie udziału cukrów rozpuszczalnych w mechanizmach tolerancji zasolenia u roślin jest zazwyczaj trudne, ponieważ cukry pełnią wiele funkcji (są bezpośrednimi produktami fotosyntezy, komponentami metabolizmu podstawowego i cząsteczkami regulatorowymi). Funkcje te mogą maskować ich rolę osmotyczną w mechanizmach tolerancji roślin na stres abiotyczny. Jednak sugeruje się ochronną rolę cukrów w stabilizowaniu błon plazmatycznych i białek w komórkach, w odniesieniu do stresu zasolenia, która polega na redukcji agregacji zdenaturowanych białek (Singer, Lindquist 1998; Gupta, Huang 2014).

5. Badania terenowe

W badaniach składu chemicznego różnych halofitów, zebranych w rejonie jeziora Neusiedler w Austrii, Albert wraz ze współpracownikami (Albert, Kinzel 1973; Albert, Popp 1977) wprowadził termin „physiotypes”. Termin ten odnosi się do swoistego składu chemicznego halofitów, który opiera się głównie na zawartości jonów i akumulacji węglowodanów rozpuszczalnych w liściach. Kilka lat później, koncepcja ta została rozwinięta przez Gorham i współpracowników (1980), który również dokonał pomiarów dla innych rodzajów kompatybilnych substancji rozpuszczonych. Specyficzne badania nad osmolitami gromadzonymi u halofitów

zostały opublikowane przez Briens i Larher (1982), którzy podali ilościową zawartość cukrów rozpuszczalnych, polioli, betainy oraz wolnej proliny w różnych organach roślin, zebranych ze słonych bagien przybrzeżnych. Zidentyfikowali trzy główne grupy: 1) halofity produkujące duże ilości rozpuszczalnych węglowodanów i polioli, 2) halofity gromadzące głównie związki azotowe, takie jak prolina czy glicynobetaina, oraz 3) gatunki, które syntetyzują obydwie grupy osmolitów w warunkach wysokiego zasolenia. Obszerne badania nad betainą, w 63 gatunkach zebranych w obszarach przybrzeżnych Europy, Azji i Ameryki Południowej, zostały opublikowane przez Adrian-Romero i współpracowników (1998), którzy odnotowali ich wysokie poziomy u roślin z rodziny *Chenopodiaceae*. Biochemiczna różnorodność 51 halofitów z bagien solnych w Turcji była analizowana przez Tipirdamaz i współpracowników (2006). Stwierdzili oni, że gatunki te mogą być dyskryminowane w zależności od ich zdolności do akumulowania analizowanych związków, zarówno proliny, jak i glicynobetainy.

Wszystkie opisane badania były niezwykle cenne dla zrozumienia strategii życiowej przyjętej przez różne halofity znajdujące się w tym samym zbiorowisku, w odpowiedzi na specyficzne warunki środowiskowe. Większość badań dotyczących reakcji na stres wśród halofitów, w tym akumulacji osmolitów, była przeprowadzana w warunkach laboratoryjnych bądź szklarniowych, więc znaczenie biologiczne tych reakcji powinno zostać potwierdzone w doświadczeniach polowych. Reakcje poszczególnych gatunków słonorośli na stres solny w kontrolowanych, sztucznych warunkach mogą znacznie różnić się od ich odpowiedzi w warunkach naturalnych, choćby ze względu na brak możliwości dokładnego odzwierciedlenia warunków środowiskowych w warunkach laboratoryjnych. Praca w terenie jest niezwykle ważna, aby ocenić względny udział poszczególnych osmolitów w mechanizmach tolerancji zasolenia u halofitów.

6. Podsumowanie

Susza i zasolenie to najważniejsze czynniki środowiskowe generujące zmniejszenie plonów na całym świecie. Tego rodzaju niekorzystne warunki pojawią się w niedalekiej przyszłości w wielu regionach świata, z powodu globalnych zmian klimatycznych, co zaostrzy problem. Istnieje więc pilna potrzeba zwiększenia poziomu produkcji żywności, aby wyżywić rosnącą populację ludzką, a genetyczna poprawa tolerancji na stres głównych gatunków uprawnych (zarówno tradycyjnymi metodami hodowlanymi, jak i nowoczesnymi metodami biotechnologicznymi), może w znaczący sposób przyczynić się do realizacji tego celu. Jednak wymaga to

głębokiego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw reakcji roślin na stres środowiskowy. Jedną z najbardziej konserwatywnych reakcji roślin na stresy abiotyczne, która wydaje się być ogromnie istotna dla tolerancji na stres u licznych gatunków, jest synteza i akumulacja osmolitów. Pomimo intensywnie prowadzonych badań, ważne aspekty mechanizmów ich działania nadal pozostają nieznane. Szczególnie dużo uwagi należy poświęcić znaczeniu biologicznemu oraz względnemu udziałowi poszczególnych osmolitów w mechanizmach tolerancji stresu danego gatunku w warunkach naturalnych. Brak wiedzy wynika częściowo z podejścia metodycznego, zakładającego prowadzenie badań w warunkach laboratoryjnych lub szklarniowych, które nie odzwierciedlają naturalnych siedlisk. Dostępne informacje potwierdzają pogląd, że reakcje roślin na zasolenie, indukowane są w warunkach laboratoryjnych, nie odzwierciedlają reakcji roślin w naturalnych siedliskach, gdzie istnieje jednocześnie wiele niekontrolowalnych i stale zmieniających się środowiskowych czynników stresowych. Zdając sobie sprawę z tych ograniczeń, zasadne jest bardziej kompleksowe podejście, zakładające równoczesne prowadzenie badań reakcji roślin rosnących w naturalnych, stresowych siedliskach. Wierzymy, że badania terenowe w znacznym stopniu przyczynią się do zwiększenia wiedzy na temat mechanizmów tolerancji stresu środowiskowego w roślinach, oraz że wiedza ta będzie mogła zostać wykorzystana do genetycznej poprawy tolerancji gatunków użytkowanych przez człowieka.

Podziękowania

Autorzy wyrażają wdzięczność za sfinansowanie ich pracy z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową.

Literatura

- Adrian-Romero M., Wilson S.J., Blunden G., Yang M., Carabot-Cuervo A., Bashir A.K., 1998. Betaines in coastal plants. *Bio. Syst. Ecol.*, 26: 535-543.
- Akashi K., Miyake C., Yokota A., 2001. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Let.*, 508: 438-442.
- Albert R., Kinzel H., 1973. Unterscheidung von Physiotypen bei Halophyten des Neusiedlerseegebietes (Österreich): *Z. Pflanzenphysiol.*, 70: 138-158.
- Albert R., Popp M., 1977. Chemical composition of halophytes from the Neusiedler Lake region in Austria. *Oecologia*, 27: 157-170.
- Ashraf M.Y., Foolad M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.*, 59: 206-216.

- Bartels D., Ramanjulu S., 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sci.*, 24: 23-58.
- Briens M., Larher F., 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell Environ.*, 5: 287-292.
- Burg M.B., Kwon E.D., Kültz D., 1996. Osmotic regulation of gene expression. *FASEB J.*, 10: 1598-1606.
- Chen T.H.H., Murata N., 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 250-257.
- Cominelli E., Conti L., Tonelli Ch., Galbiati M., 2013. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biot.*, 30 www.elsevier.com/locate/nbt: 355-361.
- Czarna A., Wawrzyniak M., 2007. Nowe stanowisko mlecznika nadmorskiego *Glaux maritima* L. na terenie Wielkopolski. *Chrońmy Przyrodę Ojczyść*, 63: 28-32.
- DB Climate Change Advisors, 2009. Investing in agriculture: Far-reaching challenge, significant opportunity. An asset management perspective. (Deutsche Bank report). Whitepaper available online at: <http://www.dbcca.com/research>.
- Ellouzi H., Hamed K.B., Hernández I., Cela J., Müller M., Magné Ch., Abdelly Ch., Munné-Bosch S., 2014. A comparative study of the early osmotic, ionic, redox and hormonal signaling response in leaves and roots of two halophytes and a glycophyte to salinity. *Planta*, 240: 1299-1317.
- Flowers T.J., Colmer T.D., 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.*, 179: 945-963.
- Flowers T.J., Colmer T.D., 2015. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Ann. Bot.*, 115: 327-331.
- Flowers T.J., Galal H.K., Bromham L., 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct. Plant Biol.*, 37: 604-612.
- Gil R., Bautista I., Boscaiu M., Lidón A., Wankhade S., Sánchez H., Llinares J., Vicente O., 2014. Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions. *AoB Plants*, doi:10.1093/aobpla/plu049.
- Gorham J., Hughes L., Wyn Jones R.G., 1980. Chemical composition of salt-marsh plants from Ynys Môn (Anglesey): the concept of physiotypes. *Plant Cell Environ.*, 3: 309-318.
- Greenway H., Munns R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 149-190.
- Grigore M.N., Boscaiu M., Vicente O., 2011. Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of halophytes under natural conditions. *Eur. J. Plant Sci. Biotech.*, 5: 12-19.
- Groppa M.D., Benavides M.P., 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34: 35-45.

- Gull B., Ansari B., Flowers T.J., Khan A.A., 2013. Germination strategies of halophytes under salinity. *Environ. Exp. Bot.*, 92: 4-18.
- Gupta B., Huang B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.
- Himabindu Y., Chakradhar T., Reddy M.C., Kanygin A., Redding K.E., Chandrasekhar T., 2016. salt-tolerant genes from halophytes are potential players of salt tolerance in glycophytes. *Environ. Exp. Bot.*, 124: 39-63.
- Hussain T.M., Chandrasekhar T., Hazara M., Sultan Z., Saleh B.K., Gopal G.R., 2008. Recent advances in salt stress biology – a review. *Biotech. Mol. Biol.*, 3: 8-13.
- Kłosowska K., 2010. Reakcje roślin na stres solny. *Kosmos, Prob. Nauk Biol.*, 59: 539-549.
- Kosová K., Prášil I.T., Vitámvás P., 2013. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 6757-6789.
- Mansour M.F., 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.*, 43: 491-500.
- Munns R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25: 239-250.
- Murakeozy E.P., Nagy Z., Duhaze C., Bouchereau A., Tuba Z., 2003. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *J. Plant Physiol.*, 160: 395-401.
- Parvaiz A., Satyawati S., 2008. Salt stress and phytochemical responses of plants-a review. *Plant Soil Environ.*, 54: 89-99.
- Rhodes D., Hanson A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 357-384.
- Rhodes D., Nadolska-Orczyk A., Rich P.J., 2002. Salinity, osmolytes and compatible solutes. [W:] Läuchli A., Lüttge U. (red.), *Salinity: Environment – Plants – Molecules*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 181-204.
- Rozema J., Schat H., 2013. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environ. Exp. Bot.*, 92: 83-95.
- Sairam R.K., Tyagi A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.*, 86: 407-421.
- Sanders D., 2000. The salty tale of *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 10: 486-488.
- Singer M.A., Lindquist S., 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.*, 1: 639-648.
- Serrano R., Gaxiola R., 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13: 121-138.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J., 1997. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.*, 115: 527-532.

- Szabados L., Savouré A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15: 89-97.
- Tester M., Davenport R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91: 503-527.
- Tipirdamaz R., Gagneul D., Duhazé C., Aïnouche A., Monnier C., Özkum D., Larher F., 2006. Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environ. Exp. Bot.*, 57: 139-153.
- Verbruggen N., Hermans C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759.
- Vinocur B., Altman A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.*, 16: 123-132.
- Wang X., Chang L., Wang B., Wang D., Li P., Wang L., Yi X., Huang Q., Peng M., Guo A., 2013. Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance. *Mol Cell Prot.*, [http:// www.mcponline.org](http://www.mcponline.org).
- Wang P., Guo Q., Wang Q., Zhou X.R., Wang S.M., 2015. PtAKT1 maintains selective absorption capacity for K⁺ over Na⁺ in halophyte *Puccinellia tenuiflora* under salt stress. *Acta Physiol. Plant.*, 37: DOI 10.1007/s11738-015-1846-3.
- Yeo A., 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.*, 49: 915-929.
- Zhu J.-K., 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 124: 941-948.
- Zhu J.-K., 2001. Plant salt tolerance. *Trend. Plant Sci.*, 6: 66-71.

Alicja Piotrowska-Niczyporuk* / Andrzej Bajguz

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Biologii
Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
* e-mail: alicjap@uwb.edu.pl

Streszczenie: Wraz z rozwojem przemysłu, zawartość metali ciężkich w środowisku znacznie wzrosła, co spowodowało, że stały się one czynnikiem stresowym dla organizmów żywych. Rośliny wykształciły szereg mechanizmów obronnych, umożliwiających wzrost i rozwój w skażonych metalami ekosystemach. Duże zainteresowanie budzą metalotioneiny (MT) – niskocząsteczkowe peptydy bogate w reszty cysteinowe, występujące u niektórych Prokaryota, grzybów, roślin i zwierząt. Sugeruje się, że roślinne MT uczestniczą w homeostazie metali niezbędnych do życia, detoksykacji szkodliwych jonów metali oraz chronią tkanki przed stresem oksydacyjnym. Metalotioneiny można strukturalnie podzielić na trzy klasy. Peptydy wchodzące do dwóch pierwszych klas są pierwotnymi produktami genów, których ekspresja jest indukowana metalami ciężkimi. Trzecią klasę stanowią fitochelatyny (PC) o charakterystycznej strukturze γ -(Glu-Cys)_n-Gly, n=2-11, które zostały wyizolowane z wielu gatunków roślin. Są one syntetyzowane na drodze enzymatycznej, przy udziale syntazy fitochelatynowej (PCS). Rola PC w detoksykacji metali polega na ich wiązaniu w nietoksyczne kompleksy, dzięki czemu grupy tiolowe oraz histydyłowe białek komórkowych są chronione przed oddziaływaniem z toksycznymi metalami.

Słowa kluczowe: fitochelatyny, metale ciężkie, metalotioneiny, stres abiotyczny

1. Wstęp

Termin „metale ciężkie” jest na ogół używany w odniesieniu do pierwiastków o gęstości powyżej 5 mg cm^{-3} , które w reakcjach chemicznych wykazują tendencję do oddawania elektronów, tworząc proste kationy. Zaliczamy do nich: Cu, Mn, Mo, Ni, Zn, Se (w fizjologicznych ilościach niezbędne dla prawidłowego wzrostu roślin) oraz: Pb, Cd, Sr, Hg, Ag, Au (metale zbędne i toksyczne). Rośliny uprawiane w obecności metali ciężkich wykazują charakterystyczne objawy, tj.: zahamowanie wzrostu, zaburzenia transpiracji, chloroza liści, zakłócenia gospodarki wodnej i metabolizmu azotowego. Metale ciężkie mogą zmieniać ultrastrukturę komórek, szczególnie chloroplastów i mitochondriów. Zaburzają cytokinezę, modyfikują właściwości błon poprzez oddziaływanie z grupami funkcyjnymi białek i lipidów błony. Toksyczność metali ciężkich u roślin polega głównie na ich zdolności do wiązania się z grupami funkcyjnymi: -SH, -COOH i -NH₂, co powoduje utratę aktywności wielu ważnych białek. Metale mogą również zwiększać syntezę reaktywnych form tlenu (RFT), co wpływa destrukcyjnie na wszystkie makrocząsteczki komórki (Hirayama, Shinozaki 2010; Nagajyoti i in. 2010; Anjum i in. 2015; Luo i in. 2016). Rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalających im przeżyć w środowisku nawet bardzo silnie zanieczyszczonym metalami. Jedną z głównych strategii tolerancji na obecność metali ciężkich, jest unieczynnienie jonów poprzez ich chelatowanie przez różnego rodzaju ligandy, przede wszystkim metalotioneiny (MT) (Cobbett, Goldsbrough 2002; Leszczyszyn i in. 2013; Gavanji i in. 2014; Sharma i in. 2016). Niniejszy rozdział stanowi przegląd literatury naukowej dotyczącej budowy oraz roli MT w adaptacjach roślin do obecności metali ciężkich w środowisku.

2. Metalotioneiny

2.1. Struktura i klasyfikacja metalotionein

Metalotioneiny zostały wykryte w 1957 roku jako niskocząsteczkowe białka wiążące jony Cd w nerce konia. Od tego czasu, MT i kodujące je geny, zostały wykryte u innych zwierząt, roślin, bakterii i grzybów (Koszucka, Dąbrowska 2006; Leszczyszyn i in. 2013). Roślinne MT zbudowane są z 45-84 aminokwasów. Są one bogate w reszty cysteinowe (Cys), wykazujące wysokie powinowactwo do wiązania różnorodnych jonów metali. Masa cząsteczkowa MT waha się od 4 do 8 kDa (Freisinger 2011). Ze względu na rozmieszczenie reszt cysteinowych, wyróżnia się trzy

klasy MT. Klasa I metalotionein zawiera 20 reszt cysteinowych, o układzie Cys-Cys lub Cys-X-Cys (gdzie X jest aminokwasem innym niż cysteina) o wysokiej konserwatywności, które są homologiczne do ssaczych MT, zwłaszcza MT występującej w nerce konia. Klasa II MT również zawiera te grupy, jednak nie są one komplementarne do MT nerkowej konia. Klasy I i II MT są pierwotnymi produktami genów. Do klasy III zaliczono nietypowe MT występujące u roślin, nie będące bezpośrednimi produktami genów. Określone zostały jako γ -Glu-Cys peptydy, do których, między innymi, należą fitochelatyny (PC), różniące się występowaniem i rodzajem C-terminalnego aminokwasu. Włączono tutaj również grupę metaloprotein drożdżowych, zwanych kadystynami (Grill 1989; Cobbett, Goldsbrough 2002; Anjum i in. 2015).

Późniejsze odkrycie i wyizolowanie wielu genów MT z roślin spowodowało, że II klasa MT została podzielona na typy w oparciu o sekwencje aminokwasowe (Freisinger 2011). Typ 1 MT zawiera sześciokrotnie powtarzający się motyw Cys-X-Cys, rozdzielony na dwie domeny za pomocą 40-aminokwasowego odcinka zawierającego także aminokwasy aromatyczne. Typ 2 MT również zawiera dwie domeny bogate w cysteinę, oddzielone około 40-aminokwasowym odcinkiem, jednak pierwsza para cystein występuje jako motyw Cys-Cys w pozycji 3 i 4 białka. W domenie N-końcowej, bogatej w cysteinę, występuje dodatkowo motyw Cys-Gly-Gly-Cys, gdzie Gly oznacza glicynę. Typ 3 MT zawiera tylko 4 reszty cysteiny w domenie N-końcowej, natomiast typ 4 MT jest odmienny od pozostałych MT roślinnych i posiada trzy domeny bogate w cysteinę, z których każda posiada 5 lub 6 konserwatywnych reszt cysteiny, oddzielonych przez 10-15 innych aminokwasów (Koszucka, Dąbrowska 2006; Wu i in. 2014). Obecność licznych grup tiolowych w cząsteczkach MT umożliwia efektywne kompleksowanie jonów metali (Gavanji i in. 2014).

2.2. Rola metalotionein

Badania nad rolą roślinnych MT są znacznie utrudnione, ponieważ peptydy te występują w bardzo niskich stężeniach, ponadto są bardzo trudne do wyizolowania ze względu na wysoką niestabilność i wrażliwość na obecność tlenu. U zwierząt MT są naturalnym ligandem dla jonów Zn i Cu, dzięki czemu utrzymują ich stały poziom w komórce. Peptydy te wiążą również metale toksyczne, a także zapobiegają skutkom stresu oksydacyjnego. Ekspresję genów kodujących MT u roślin indukują różne czynniki abiotyczne, takie jak: niska i wysoka temperatura, susza, zasolenie, metale ciężkie i stres oksydacyjny (Guo i in. 2003, 2008; Koszucka, Dąbrowska 2006).

Roślinne MT uczestniczą w utrzymaniu homeostazy jonów Cu, która jest istotnym mikroelementem, wchodzi w skład grup prostetycznych wielu enzymów i pośredniczy w transporcie elektronów. Jednak nadmiar jonów Cu jest szkodliwy dla błon biologicznych, DNA i białek, stąd dostępność i transport jonów Cu w roślinie podlegają ścisłej kontroli (Koszucka, Dąbrowska 2006). Zaangażowanie roślinnych MT w gospodarkę Cu potwierdzają liczne dowody. Przykładowo, z *Pisum sativum* L. wyizolowano gen *PsMT_A* kodujący MT typu 2, którego ekspresję zbadano następnie w *Escherichia coli* i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Evans i in. 1992). Akumulacja Cu w komórkach *E. coli*, w których zaobserwowano ekspresję zrekombinowanego białka *PsMT_A*, była do ośmiu razy większa niż w komórkach kontrolnych. Podobnie w transformowanych roślinach *A. thaliana* zaobserwowano zwiększoną akumulację Cu, w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Przypuszcza się, że białko *PsMT_A* wiąże w roślinach jony Cu, a konstytutywna ekspresja jego genu przyczynia się do akumulacji tego pierwiastka (Evans i in. 1992). Stwierdzono, że jony Cu są najsilniejszym induktorem ekspresji genu *MT2* u *A. thaliana*, z kolei ekspresja genu *MT1* tej rośliny zachodzi w organach bogatych w jony Cu, między innymi, w pylnikach i słupkach. Geny *MT* typu I są indukowane przez jony Cu również u *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L. i *Nicotiana tabacum* L. (Guo i in. 2003, 2008).

Roślinne MT uczestniczą także w buforowaniu poziomu Zn. Pierwsza roślinna MT, wiążąca Zn, została zidentyfikowana i wyizolowana z niedojrzałych zarodków *T. aestivum* (MT-II-like wheat Ec) (Lane i in. 1987). Ponadto zauważono, że jej akumulacja zachodzi w określonym stadium rozwojowym zarodka, kiedy następuje przejście od fazy proliferacji do różnicowania, co wskazuje, że białko Ec jest magazynem Zn, dostępnego w razie potrzeby dla polimeraz DNA i RNA oraz czynników transkrypcyjnych. Takie specyficzne dla embriogenezy MT stanowią rezerwuar Zn, niezbędnego podczas kiełkowania (Hegelund i in. 2012). Poziom ekspresji genów kodujących MT zmienia się wraz z rozwojem rośliny. Stwierdzono, że poziom mRNA dla MT typu I zwiększa się w starzejących się liściach *Brassica napus* L., *A. thaliana* i *O. sativa*, gdzie prawdopodobnie stanowią one ochronę przed metalami wchodzącymi w skład enzymów i cząsteczek chlorofilu, a uwalnianymi w trakcie dominujących na tym etapie procesów katabolizmu, kiedy zachodzi wzmoczona degradacja białek i barwników (Hassinen i in. 2011). Zaobserwowano również akumulację mRNA dla MT w tkankach intensywnie dzielących się, co wskazuje na ich udział w podziałach komórkowych (Koszucka, Dąbrowska 2006).

Wzrost ekspresji genów kodujących MT jest związany z tolerancją roślin na metale ciężkie. Ekspresja ta zależy od gatunku, organu rośliny, rodzaju jonu, jego stężenia, a także czasu traktowania metalem. U roślin eksponowanych na metale

ciężkie zaobserwowano, że MT uczestniczą w utrzymaniu homeostazy jonów metali ciężkich (ryc. 1), sekwestracji metali ciężkich poprzez ich związanie z grupami tiolowymi reszt cysteinowych MT oraz transbłonowym transporcie białkowych kompleksów metali z cytoplazmy do wakuoli, co przyczynia się do ich detoksykacji (Clemens 2006a, b; Sharma i in. 2016). Ekspresję genów kodujących MT pod wpływem Pb, Cd, Cu czy Zn zanotowano między innymi u *A. thaliana*, *Populus alba* L., *Hordeum vulgare* L., *O. sativa*, *B. napus*. Stwierdzono, że tolerancja *P. sativum* na wysokie stężenie jonów Cu wiąże się ze zwiększoną ekspresją genów kodujących MT (Poschenrieder i in. 2006). Ponadto, celowana mutagenезa genów MT zaburza u roślin mechanizmy homeostazy metali oraz zwiększa ich toksyczność (Carpenè i in. 2007). Wzrost syntezy białek MT pod wpływem jonów Cd i Hg u roślin może być traktowany jako specyficzny ekotoksykologiczny biomarker zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi (Dabrio et al. 2002; Zhou i in. 2014).

Przypuszcza się również, że roślinne MT chronią komórki przed stresem oksydacyjnym (ryc. 1), dzięki obecności reszt cysteinowych wychwytyjących RFT (Leszczyszyn i in. 2013). Dowodu potwierdzającego zaangażowanie MT w ochronę struktur komórkowych przed RFT dostarczyli Lee i in. (2004), którzy wykazali, że produkty genów *AtMT2a* i *AtMT3*, pochodzących z *A. thaliana*, ulegających ekspresji w transformowanych komórkach szparkowych *Vicia faba* L., powodują obniżenie poziomu RFT, powstających po potraktowaniu komórek Cd. Podobnie siewki *Gossypium hirsutum* L. – eksponowane na stres suszy, solny, niskiej temperatury, kwasu abscysynowego, etylenu, Cu i Zn – wykazują zwiększoną ekspresję genu *GhMT3*, co wiąże się z obniżeniem poziomu RFT oraz wiązaniem w kompleksy z MT jonów Zn (Xue i in. 2009). Rośliny *A. thaliana*, rosnące w niskiej temperaturze, charakteryzują się wzmożoną ekspresją genu *AtMT2a*, co przyczynia się do łagodzenia skutków stresu oksydacyjnego generowanego w tych warunkach (Zhu i in. 2009; Sharma i in. 2016).

wynosi od 2 do 11 (Mou i in. 2016; Sharma i in. 2016). Peptydy te powstają niezależnie od rybosomów w wyniku reakcji enzymatycznej, w której substratem jest GSH lub jego homologi. Dzięki obecności grup -SH cysteiny, fitochelatyny i ich homologi odgrywają podstawową rolę w chelatowaniu, a przez to detoksykacji jonów metali ciężkich (Romero i in. 2014; Sharma i in. 2016).

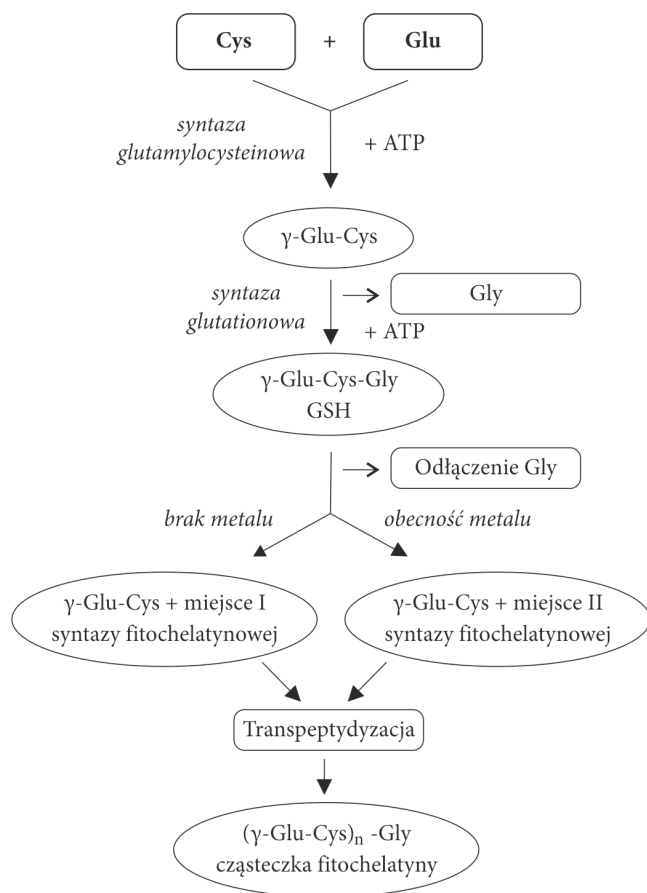
3.2. Biosynteza PC

Synteza PC jest katalizowana przez dwupeptydylową transpeptydazę γ -glutamylcysteiny, potocznie zwaną syntazą fitochelatynową (PCS) [E.C. 2.3.2.15]. Enzym ten odpowiada za reakcję przenoszenia dwuaminokwasowego fragmentu γ -Glu-Cys z cząsteczki donorowej, którą może być GSH lub PC2 na cząsteczkę akceptorową, którą może być GSH lub inna PC, co prowadzi do syntezy polimerów PC o różnej długości (PC2, PC3, PC4 itd.). Syntaza fitochelatynowa jest enzymem konstytutywnym, zlokalizowanym w cytoplazmie i aktywowanym obecnością wolnych jonów metali (Brunetti i in. 2011). Najefektywniejszymi stymulatorami aktywności tego enzymu są w kolejności: Cd>Cu>Ag>Hg>Zn>Pb, natomiast jony: Ca, Ba, Co i K nie aktywują PCS (Rea 2012).

Porównanie sekwencji aminokwasowej PCS wyizolowanych z różnych organizmów: roślin (*A. thaliana*, *T. aestivum*), drożdży (*Saccharomyces pombe* Lindner A. Jörg.) i nicienia (*Caenorhabditis elegans* Maupas) wskazują na duże podobieństwo tych białek (Clemens 2006a; Kühnlenz i in. 2014). Domena N-końcowa tego enzymu wykazuje dużą konserwatywność. Około 40% sekwencji białka PCS u tych 4 organizmów jest identyczne. Mimo braku pokrewieństwa między owymi gatunkami, mechanizm obrony przed toksycznym wpływem metali ciężkich jest taki sam. Budowa tego enzymu jest bardzo podobna, a mechanizm działania – identyczny. Domena C-końcowa, mimo braku homologii, w każdym przypadku posiada liczne powtórzenia par cysteiny, które pełnią funkcję receptora wiążącego jony metali i przenoszą je do miejsca katalicznego enzymu znajdującego się w domenie N-końcowej. Stąd też PCS jest modyfikowana postranslacyjnie przez jony metali ciężkich, a do reakcji wymaga zredukowanego GSH i odpowiednio tiolowanego metalu, np. Cd-GS₂ lub Zn-GS₂. Regulacja aktywności PCS odbywa się na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Enzym aktywowany wolnymi jonami metali, katalizuje reakcję syntezy PC, które chelatują metale, zapobiegając dalszej aktywacji enzymu, a tym samym dalszej produkcji PC (Clemens 2006a; García-García i in. 2014).

Badania wykazały, że PCS zawiera dwa miejsca katalityczne wiążące substrat (miejsce I i miejsce II), z których pierwsze ma wysokie, natomiast drugie niskie powinowactwo do GSH. W środowisku, gdzie nie występują jony metali, acetylacja

GSH zachodzi w miejscu I (w obrębie cysteiny) w cząsteczce PCS, które zawiera cysteinę, histydynę i asparaginian. Sekwencja aminokwasów w miejscu I jest w 100% konserwatywna u wszystkich syntaz. Stąd acetylacja w tym obszarze i dalsza transpeptydyzacja na drugą cząsteczkę GSH lub PC jest niezależna od metalu. Jednak acetylacja miejsca II odbywa się wyłącznie w obecności metalu, zwłaszcza Cd, stąd jest to etap ściśle zależny od obecności metali (Kühnlenz i in. 2014). Przypuszczalny model aktywacji tego enzymu przedstawia się następująco (ryc. 2): cząsteczka donorowa GSH (γ -Glu-Cys-Gly) dokonuje acetylacji enzymu na domenie N-końcowej, z jednoczesnym odłączeniem grupy Gly – 1 etap. W 2 etapie powstaje aktywna forma enzymu γ -Glu-Cys-PCS, która następnie przenosi cząsteczkę γ -Glu-Cys na drugi substrat, którym jest cząsteczka GSH z przyłączonym przez grupę tiolową -SH cysteiny metalem, dzięki czemu powstaje kompleks PC2-metal.



Rycina 2. Synteza PC

Źródło: Sharma i in. 2016, zmienione.

Charakterystyczna jest kinetyka wytwarzania PC o różnej długości łańcucha. We wczesnym etapie ekspozycji na metal, najszybciej wzrasta ilość najkrótszej PC (PC2). Jednak przy dłuższym czasie działania stresora jej poziom maleje, ponieważ krótkołańcuchowe PC2 są wykorzystywane do syntezy dłuższych peptydów, takich jak PC6, natomiast rośnie ilość PC3 i PC4 (Vatamaniuk i in. 2000; García-García i in. 2014). Dużym osiągnięciem było odkrycie genów kodujących PCS u różnych gatunków roślin (tab. 1).

Tabela 1. Geny kodujące syntazę fitochelatynową (PCS) u wybranych gatunków roślin wyższych traktowanych metalami

Gatunek roślin	Geny kodujące PCS	Rola	Literatura
<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	<i>PCS1</i>	Homeostaza Zn	Adams i in. (2011)
<i>Nicotiana tabaccum</i> L.	<i>TcPCS1</i>	Sekwestracja Cd	Liu i in. (2011)
<i>Triticum vulgare</i> Vill.	<i>TaPCS1</i>	Detoksykacja metali ciężkich	Liu i in. (2011)
<i>Triticum vulgare</i> Vill.	<i>TaPCS1</i>	Detoksykacja i akumulacja Cd	Wang i in. (2012)
<i>Brassica juncea</i> L.	<i>PCS</i>	Detoksykacja As	Ahmad, Gupta (2013)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>PCR2</i>	Akumulacja Zn	Deng i in. (2013)
<i>Nicotiana tabaccum</i> L.	<i>CdPCS1</i>	Akumulacja Cd i As	Shukla i in. (2013)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>AtPCS2</i>	Biosynteza fitochelatyn w odpowiedzi na Cd	Kühnlenz i in. (2014)
<i>Ceratophyllum demersum</i> L.	<i>CdPCS1</i>	Sekwestracja As	Shri i in. (2014)
<i>Sophora viciifolia</i> Hance.	<i>SvPCS1</i>	Akumulacja Pb	Xu i in. (2014)
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex St	<i>PaPCS</i>	Nadwrażliwość na Cd	Zhao i in. (2014)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>AtPCS1</i>	Odporność na As i Sb	Kamiya, Fujiwara (2015)
<i>Raphanus sativus</i> L.	<i>PCS</i>	Akumulacja i detoksykacja Cd	Xu i in. (2015)
<i>Medicago stiva</i> L.	<i>AtPCS1</i>	Detoksykacja Cd	Kabir i in. (2016)
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>OsPCS1</i>	Akumulacja i detoksykacja As	Begum i in. (2016)

3.3. Rola fitochelatyn

Synteza PC jest jednym z podstawowych elementów odpowiedzi rośliny w warunkach skażenia metalami. Proces unieszkodliwiania metali obejmuje: kompleksowanie jonów metali w cytoplazmie, transport kompleksów do wakuoli i ich deponowanie (Cobbett, Goldsbrough 2002). Rola PC w detoksykacji metali polega na ich wiązaniu w tzw. kompleksy LMW (ang. *Low Molecular Weight*), dzięki czemu grupy tiolowe (-SH) oraz grupy histydylowe białek komórkowych są chronione przed oddziaływaniem z toksycznymi metalami (Petraglia i in. 2014; Pivato i in. 2014). Kompleksy takie tworzą się w cytoplazmie, a następnie są transportowane do wakuoli, gdzie niskie pH sprzyja dysocjacji metalu. Część peptydowa może być degradowana przez wakuolarne hydrolazy na fragmenty i/lub wolne aminokwasy, albo być transportowana z powrotem do cytoplazmy. Uwolniony metal łatwo wiąże się z obecnymi w wakuoli kwasami organicznymi, aminokwasami lub tworzy wysokocząsteczkowe kompleksy HMW (ang. *High Molecular Weight*) z PC o dużej zawartości siarki (Wu i in. 2008). Stosunek jonów S^{2-} do Cd^{2+} jest wyższy w kompleksach HMW niż LMW. Kompleksy HMW występują w wakuoli jako agregaty o średnicy 20 Å, których jądro stanowi krystaliczny rdzeń otoczony PC. Stąd też detoksykacja jest procesem przeniesienia metalu z cytoplazmy do przedziałów komórki o obniżonej aktywności metabolicznej, np. wakuoli i trwałym unieruchomieniu go przez związanie z efektywniejszymi niż PC ligandami. Mechanizm ten jest istotny w procesach detoksykacji Cd i Cu. Kompleksy tworzone przez PC z Zn i Pb nie są stabilne (Wu i in. 2008; Song i in. 2014).

Stwierdzono, że niedobór PC u roślin jest sprzężony z hiperwrażliwością na jony Cd, Cu i As (Clemens 2006b), jednakże wielokrotnie wykazano, iż sama zdolność rośliny do syntezy PC oraz ich zwiększona ilość nie determinują poziomu tolerancji na metale. Uważa się, że na poziom tolerancji rośliny na dany metal, w odniesieniu do PC, mają wpływ: szybkość formowania kompleksów z jonami metali, zdolność do formowania kompleksów przez istniejący system PC z danym metalem, zdolność do syntezy różnych rodzajów PC o różnej długości łańcucha, wydłużanie łańcucha PC, oraz szybkość transportu kompleksów PC-metal do wakuoli (Pivato i in. 2014).

Fitochelatyny biorą również udział w gospodarce mikroelementów. Dotyczy to zwłaszcza tych jonów metali ciężkich, których rośliny wymagają do prawidłowego rozwoju (Cu, Zn, Ni). Jony niezbędnych w komórce metali, związane w formę Cu-, Zn- czy Ni-PC, mogą być, po degradacji kompleksów, uwalniane i wykorzystane do wytwarzania metaloenzymów. Związane w ten sposób metale są przechowywane głównie w wakuoli, a wyeliminowanie wolnych jonów metali z cytoplazmy

zabezpiecza wrażliwe na metale grupy funkcyjne enzymów i białek strukturalnych. Przy wzroście zapotrzebowania na metale, są one uwalniane z PC i przenoszone na apoformy metalobiałek (Tukendorf 1993; Cobbett, Goldsbrough 2002; Guo i in. 2008).

Niektóre PC, zwłaszcza te, których syntezę indukuje Cd, zawierają dodatkowe, luźno związane jony siarczkowe (S^{2-}) lub siarczanowe IV (SO_3^{2-}), które są często uwalniane w postaci H_2S po zakwaszeniu kompleksów. Po raz pierwszy obecność takiego składnika kompleksów Cd-PC stwierdzono w roślinach *Solanum lycopersicum* L., gdy podczas ekstrakcji PC w warunkach kwaśnego pH, zaobserwowano wydzielanie H_2S (ang. *acid-labile sulfide*) (Rauser, Meuwly 1995). Występowanie dodatkowych grup siarkowych stwierdzono również u innych gatunków roślin i grzybów. Ich rolą jest zwiększenie trwałości, stabilności i odporności kompleksu PC z metalami oraz podniesienie efektywności detoksykacji metali ciężkich. Obecność grup siarkowych w cząsteczkach PC wskazuje również na istotny udział tych peptydów w metabolizmie siarki. Kompleksy Cd-PC mogą funkcjonować jako nośniki tiolowe w asymilacyjnej redukcji siarczanów u roślin, na co wskazują następujące fakty: a) Cd najefektywniej indukuje syntezę PC, do których wytwarzania niezbędna jest cysteina, b) Cd stymuluje aktywność enzymów katalizujących syntezę cysteiny w szlaku redukcji siarczanów, tzn. sulfurylazę ATP i sulfotransferazę APS (adenozyno-5'-fosfosiarczanu), c) roślinne kompleksy Cd-PC zawierają luźno związane jony SO_3^{2-} i S^{2-} , które wykazują podobieństwo do tiolowych nośników szlaku redukcji siarczanów, d) siarka jest uwalniana w środowisku kwaśnym z kompleksów Cd-PC, podobnie jak siarka przyłączona do grupy -SH nośników tiolowych w szlaku redukcji siarczanów może być wymieniona i wydzielć się po obniżeniu pH (Tukendorf 1993; Rauser, Meuwly 1995; Wu i in. 2008).

4. Podsumowanie

Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w wyjaśnieniu mechanizmów obronnych roślin narażonych na metale ciężkie, zwłaszcza roli MT, stanowi istotny wkład do praktycznego zastosowania fitoremediacji, czyli wykorzystania roślin do oczyszczania środowisk zanieczyszczonych metalami. W wielu laboratoriach prowadzone są prace nad modyfikacją genetyczną roślin w celu zwiększenia ich przydatności w procesach usuwania metali, zwłaszcza metali ciężkich z ekosystemów. Rośliny genetycznie modyfikowane, odporne na metale ciężkie, charakteryzują się większą zdolnością wiązania i detoksykacji metali, poprzez wzrost ekspresji genów kodujących MT oraz ich transportu do wakuoli. Zastosowanie inżynierii genetycz-

nej pozwoli na ominięcie wielu ograniczeń związanych z wykorzystaniem tej technologii oczyszczania środowiska.

Literatura

- Ahmad M.A., Gupta M., 2013. Exposure of *Brassica juncea* (L.) to arsenic species in hydroponic medium: comparative analysis in accumulation and biochemical and transcriptional alterations. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20: 8141-8150.
- Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Thangavel P., Roychoudhury A., Gill S.S., Rodrigo M.A., Adam V., Fujita M., Kizek R., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I., 2015. Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants-an overview. *Front. Plant Sci.*, 6: 192-199.
- Begum M.C., Islam M.S., Islam M., Amin R., Parvez M.S., Kabir A.H., 2016. Biochemical and molecular responses underlying differential arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, 104: 266-277.
- Brunetti P., Zanella L., Proia A., De-Paolis A., Falasca G., Altamura M.M., Sanità di Toppi L., Costantino P., Cardarelli M., 2011. Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*. *J. Exp. Bot.*, 62: 5509-5519.
- Carpenè E., Andreani G., Isani G., 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 1: 35-39.
- Clemens S., 2006a. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.*, 163: 319-332.
- Clemens S., 2006b. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707-1719.
- Cobbett C., Goldsbrough P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 159-182.
- Dabrio M., Rodríguez A.R., Bordin G., Bebianno M.J., De Ley M., Sestáková I., Vasák M., Nordberg M., 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 88: 123-134.
- Deng F., Yamaji N., Xia J., Ma J.F., 2013. A member of the heavy metal P-Type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol.*, 163: 1353-1362.
- Evans K.M., Gatehouse J.A., Lindsay W.P., Shi J., Tommey A.M., Robinson N.J., 1992. Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMT* function. *Plant Mol. Biol.*, 20: 1019-1028.
- Freisinger E., 2011. Structural features specific to plant metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16: 1035-1045.

- García-García J.D., Girard L., Hernández G., Saavedra E., Pardo J.P., Rodríguez-Zavala J.S., Encalada R., Reyes-Prieto A., Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sánchez R., 2014. Zn-bis-glutathionate is the best co-substrate of the monomeric phytochelatin synthase from the photosynthetic heavy metal-hyperaccumulator *Euglena gracilis*. *Metallomics*, 6: 604-616.
- Gavanji S., Larki B., Mojiri M., 2014. Bioinformatics prediction of metal binding sites in metallothionein proteins. *J. Bioinf.*, 1: 20-25.
- Grill E., 1989. Phytochelatins in plants. [W:] Hamer D.H., Winge D.R. (red.), Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry. Alan R. Liss Inc., New York, 282-300.
- Grill E., Winnacker E.U., Zenk M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674-676.
- Guo W.J., Meetam M., Goldsbrough P.B., 2008. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol.*, 146: 1697-1706.
- Guo W.J., Bundithya W., Goldsbrough P.B., 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol.*, 159: 369-381.
- Hassinen V.H., Tervahauta A.I., Schat H., Kärenlampi S.O., 2011. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol.*, 13: 225-232.
- Hegelund J.H., Schiller M., Kichey T., Hansen T.H., Pedas P., Husted S., Schjoerri J.K., 2012. Barley metallothioneins: MT3 and MT4 are localized in the grain aleurone layer and show differential zinc binding. *Plant Physiol.*, 159: 1125-1137.
- Hirayama T., Shinozaki K., 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.*, 61: 1041-1052.
- Kabir A.H., Hossain M.M., Khatun M.A., Mandal A., Haider S.A., 2016. Role of silicon counteracting cadmium toxicity in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Front Plant Sci.*, 7: 1117-1123.
- Kamiya T., Fujiwara T., 2015. A novel allele of the *Arabidopsis* phytochelatin synthase 1 gene conferring high sensitivity to arsenic and antimony. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52: 272-278.
- Koszucka A.M., Dąbrowska G., 2006. Roślinne metalotioneiny. *Post. Biol. Kom.*, 33: 285-302.
- Kühnlenz T., Schmidt H., Uraguchi S., Clemens S., 2014. *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 2 is constitutively active *in vivo* and can rescue the growth defect of the PCS1-deficient *cad1-3* mutant on Cd-contaminated soil. *J. Exp. Bot.*, 65: 4241-4253.
- Lane B., Kajioka R., Kennedy T., 1987. The wheat-germ-Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem. Cell Biol.*, 65: 1001-1005.
- Lee J., Shim D., Song W.Y., Hwang I., Lee Y., 2004. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol. Biol.*, 54: 805-815.

- Leszczyszyn O.I., Imam H.T., Blindauer C.A., 2013. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. *Metallomics*, 9: 1146-1169.
- Liu G.Y., Zhang Y.X., Chai T.Y., 2011. Phytochelatin synthase of *Thlaspi caerulescens* enhanced tolerance and accumulation of heavy metals when expressed in yeast and tobacco. *Plant Cell Rep.*, 30: 1067-1076.
- Luo Z.B., He J., Polle A., Rennenberg H., 2016. Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnol Adv.*, S0734-9750: 30090-30098.
- Mou R.X., Cao Z.Y., Lin X.Y., Wu L., Cao Z.Z., Zhu Z.W., Chen M.X., 2016. Characterization of the phytochelatin synthase and their derivatives in rice exposed to cadmium based on high-performance liquid chromatography coupled with data-dependent hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30: 1891-1900.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 8: 199-216.
- Petraglia A., De Benedictis M., Degola F., Pastore G., Calcagno M., Ruotolo R., Mengoni A., Sanità di Toppi L., 2014. The capability to synthesize phytochelatin synthase and the presence of constitutive and functional phytochelatin synthases are ancestral (plesiomorphic) characters for basal land plants. *J. Exp. Bot.*, 65: 1153-1163.
- Pivato M., Fabrega-Prats M., Masi A., 2014. Low-molecular-weight thiols in plants: functional and analytical implications. *Arch. Biochem. Biophys.*, 560: 83-99.
- Poschenrieder C., Tolrá R., Barcelo J., 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.*, 11: 1360-1385.
- Rausser W.E., Meuwly P., 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatin and related thiol peptides. *Plant Physiol.*, 109: 195-202.
- Rea P.A., 2012. Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiol. Plant.*, 145: 154-164.
- Romero L.C., Aroca M.A., Laureano-Marin A.M., Moreno I., Garcia I., Gotor C., 2014. Cysteine and cysteine related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant*, 7: 264-276.
- Sharma R., Bhardwaj R., Handa H., Gautam V., Kohli S.K., Bali S., Kaur P., Thukral A.K., Arora S., Ohri P., Vig A.P., 2016. Responses of phytochelatin and metallothioneins in alleviation of heavy metal stress in plants: an overview. [W:] Ahmad P. (red.), *Plant – metal interaction. Emerging remediation techniques*. Elsevier, Amsterdam, 263-283.
- Shri M., Dave R., Diwedi S., Shukla D., Kesari R., Tripathi R.D., Trivedi P.K., Chakrabarty D., 2014. Heterologous expression of *Ceratophyllum demersum* phytochelatin synthase, *CdPCS1*, in rice leads to lower arsenic accumulation in grain. *Sci. Rep.*, 4: 5784-5789.

- Shukla D., Kesari R., Tiwari M., Dwivedi S., Tripathi R.D., Nath P., Trivedi P.K., 2013. Expression of *Ceratophyllum demersum* phytochelatin synthase, *CdPCS1*, in *Escherichia coli* and *Arabidopsis* enhances heavy metal(loid)s accumulation. *Protoplasma*, 250: 1263-1272.
- Song W.Y., Mendoza-Cózatl D.G., Lee Y., Schroeder J.I., Ahn S.N., Lee H.S., Wicker T., Martinoia E., 2014. Phytochelatin-metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 37: 1192-1201.
- Tukendorf A., 1993. Fitochelatin – roślinne peptydy wiążące metale ciężkie. *Post. Bioch.*, 39: 60-67.
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A., 2000. Mechanism of heavy metal activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.*, 275: 31451-31459.
- Wang F., Wang Z., Zhu C., 2012. Heteroexpression of the wheat phytochelatin synthase gene (*TaPCS1*) in rice enhances cadmium sensitivity. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 44: 886-893.
- Wu C.S., Chen D.Y., Chang C.F., Li M.J., Hung K.Y., Chen L.J., Chen P.W., 2014. The promoter and the 50-untranslated region of rice metallothionein *OsMT2b* gene are capable of directing high-level gene expression in germinated rice embryos. *Plant Cell Rep.*, 33: 793-806.
- Wu J.S., Ho T.C., Chien H.C., Wu Y.J., Lin S.M., Juang R.H., 2008. Characterization of the high molecular weight Cd-binding complex in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) when exposed to Cd. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 5806-5812.
- Xu L., Wang Y., Liu W., Wang J., Zhu X., Zhang K., Yu R., Wang R., Xie Y., Zhang W., Gong Y., Liu L., 2015. De novo sequencing of root transcriptome reveals complex cadmium-responsive regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Sci.*, 236: 313-323.
- Xu Z., Ban Y., Li Z., Chen H., Yang R., Tang M., 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi play a role in protecting roots of *Sophora viciifolia* Hance. from Pb damage associated with increased phytochelatin synthase gene expression. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 21: 12671-1283.
- Xue T., Li X., Zhu W., Wu C., Yang G., Zheng C., 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J. Exp. Bot.*, 60: 339-349.
- Zhao C., Xu J., Li Q., Li S., Wang P., Xiang F., 2014. Cloning and characterization of a *Phragmites australis* phytochelatin synthase (PaPCS) and achieving Cd tolerance in tall fescue. *PLOS ONE*, 9: 103771-103777.

- Zhou B., Yao W., Wang S., Wang X., Jiang T., 2014. The metallothionein gene, TaMT3, from *Tamarix androssowii* confers Cd²⁺ tolerance in tobacco. Int. J. Mol. Sci., 15: 10398-10409.
- Zhu W., Zhao D., Miao Q., Xue T., Li X., Zheng C., 2009. *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. J. Plant Biol., 52: 585-592.

11 Zakres specyficzności gospodarza bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej pochodzącej ze starej hałdy Zn-Pb Bolesław oraz stanowiska kontrolnego

Ewa Oleńska^{1*} / Wanda Małek²

¹ Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
* e-mail: chwelat@uwb.edu.pl

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Streszczenie: Rośliny należące do rodziny bobowatych (*Fabaceae*) wchodzą w symbiotyczne asocjacje z bakteriami brodawkowymi (ryzobiami). Asocjacje te są wzajemną interakcją obu partnerów symbiozy i polegają na utworzeniu przez makrosymbionta (roślinę-gospodarza) odpowiedniej niszy (brodawki) oraz dostarczaniu substancji odżywczych mikrosymbiontom, w zamian za co bakterie dostarczają roślinom przyswajalną formę azotu – amoniak, który syntetyzują, w wyniku redukcji azotu cząsteczkowego, przy użyciu enzymatycznego kompleksu nitrogenazy. Nawiązanie efektywnej symbiozy przez obu partnerów jest procesem złożonym i specyficznym gatunkowo, co oznacza, że powstanie brodawki (nodulacja) jest poprzedzone wymianą informacją i rozpoznaniem właściwych sobie uczestników symbiozy. Na przykład *Rhizobium tropici* tworzy asocjacje symbiotyczne z roślinami rodzajów: *Leucaena* sp., *Phaseolus* sp., *Medicago* sp. czy *Macroptileum* sp.; *R. leguminosarum* bv. *viciae* z: *Pisum* sp., *Viciae* sp., *Lathyrus* sp., *Lens* sp.; *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z *Phaseolus* sp.; natomiast *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z *Trifolium* sp.

Celem pracy jest określenie zakresu gospodarza ryzobiów wyizolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej, rosnącej na „starej” około 70-100-letniej hałdzie Bolesław (Wyżyna Śląsko-Krakowska) oraz kontrolnej łące w Bolestraszczykach (Pogórze Przemyskie). Zakres gospodarza ustalono poprzez laboratoryjny test inokulacji roślin. Nasiona roślin bobowatych: groch siewny (*Pisum sativum*) odmiana Milwa, lucerna siewna (*Medicago sativa*), łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius*) odmiana Karo, koniczyna biała (*Trifolium repens*) odmiany RD 80 oraz wyka siewna (*Vicia sativa*) odmiana Hanka, wyjałowiono powierzchniowo 75% etanolem oraz 0,1% sublimatem, wypłukano w jałowej wodzie, skielkowano, a 2-3-dniowe siewki przeniesiono na skosy stałego, bezazotowego podłoża Hoagland’a w celu zakorzenienia. Po siedmiu dniach rośliny szczepiono badanymi izolatami bakterii, w dwóch powtórzeniach. Po czterech tygodniach hodowli roślin określono liczbę i zabarwienie brodawek korzeniowych oraz świeżą masę pędu roślin.

Słowa kluczowe: bobowate, ryzobia, zakres gospodarza, *Trifolium* sp., geny *nod*, nodulacja

1. Wstęp

Bobowate stanowią jedną z najbogatszych gatunkowo rodzin, w której skład wchodzi około 9% roślin dwuliściennych występujących na świecie. Do tej pory w Polsce opisano 161 gatunków roślin *Fabaceae*, będących przedstawicielami 41 rodzajów tej rodziny (Mirek i in. 2002; Rutkowski 2007). Rośliny te charakteryzuje szerokie spektrum zasiedlania często różnych, skrajnie nieprzyjaznych środowisk, między innymi, z powodu ich zdolności do tworzenia asocjacji symbiotycznych z wolno żyjącymi saprofitycznymi bakteriami ryzosferowymi – ryzobiami, wiążącymi azot atmosferyczny. Ryzobia są Gram-ujemnymi ruchliwymi pałeczkami, które w obrębie 13 rodzajów, skupiają 98 gatunków bakterii brodawkowych podzielonych na dwie grupy: (1) „typowe ryzobia” (*Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Ensifer* sp., *Mesorhizobium* sp., *Rhizobium* sp.) oraz (2) „nowe ryzobia” (*Aminobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp., *Devosia* sp., *Methylobacterium* sp., *Microvirga* sp., *Ochrobactrum* sp., *Phyllobacterium* sp. i *Shinella* sp.) – do niedawna traktowane jako niesymbiotyczne organizmy (van Berkum, Eardly 1998; Graham 2008; Rivas i in. 2009; Peix i in. 2015; Gnat i in. 2015; <http://rhizobia.co.nz>). Bakterie te, w obecności właściwego gatunku rośliny bobowatej, indukują proces nodulacji, tj. powstawania organów symbiozy – brodawek, w których wiążą azot cząsteczkowy (N_2), otrzymując w zamian od roślinnego gospodarza produkty asymilacji CO_2 oraz bezpieczną niszę (Shiferaw i in. 2004; Fauvart, Michiels 2008). Reakcja biologicznego wiązania azotu cząsteczkowego (diazotrofia) jest katalizowana przez enzymatyczny kompleks dinitrogenazy, składającej się z właściwej dinitrogenazy oraz reduktazy dinitrogenazowej, a produktem redukcji jest przyswajalna dla roślin forma azotu – amoniak (Garg, Geetanjali 2009). Azot, jako składnik kluczowych makrocząsteczek, takich jak na przykład białka czy kwasy nukleinowe, oraz wielu innych strukturalnych i metabolicznych związków chemicznych, jest niezbędny dla wzrostu i rozwoju roślin (Czerpak 1993; Krishnan, Bennett 2006).

Nawiązanie mutualistycznej relacji pomiędzy makro- i mikrosymbiontem jest procesem specyficznym gatunkowo (Hadri, Bisseling 1998; Desbrosses, Stougaard 2011). Jednak zakres specyficzności gospodarza u ryzobiów jest zróżnicowany (Spaink 1994, 2004). Niektóre gatunki ryzobiów, np. *Rhizobium galegae* czy *R. etli* wykazują wąski zakres specyficzności gospodarza, nawiązując symbiotyczne asocjacje z jednym, konkretnym rodzajem rodziny *Fabaceae*, inne posiadają szerokie spektrum: np. *R. tropici* tworzy interakcje symbiotyczne z wieloma gatunkami roślin bobowatych (Maunoury i in. 2005). Wiadomo, że na przykład, *R. leguminosarum* bv. *viciae* nawiązuje relację symbiotyczną z *Pisum* sp., *Vicia* sp., *Lathyrus* sp.,

Lens sp., *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z *Trifolium* sp., *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z *Phaseolus* sp., *Sinorhizobium meliloti* z *Medicago* sp., *Melilotus* sp., *Trigonella* sp., *R. etli* z *Phaseolus* sp., *Mesorhizobium loti* z *Lotus* sp., *Anthyllis* sp., *Lupinus* sp., *M. ciceri* z *Cicer* sp., *M. huakuii* z *Astragalus* sp., *Rhizobium galegae* z *Galega* sp., *Sinorhizobium fredii* z *Glycine* sp., *Vigna* sp., *S. meliloti* z *Medicago sativa* i *Melilotus alba*, *R. tropici* z *Leucaena* sp., *Phaseolus* sp., *Medicago* sp., *Macroptilium* sp., *Bradyrhizobium japonicum* i *B. elkanii* z *Glycine* sp., *Macroptilium* sp., *Vigna* sp., *Azorhizobium caulinodans* z *Sesbania rostrata*, *Rhizobium* sp. BR816 z *Leucaena* sp. i *Phaseolus* sp. (Hadri, Bisseling 1998; Wang, in. 2012; Ansari i in. 2014).

Najistotniejszym czynnikiem determinującym specyficzność gospodarza, są tzw. czynniki Nod (Hadri, Bisseling 1998; Debelle i in. 2001), kodowane przez geny brodawkowania *nod* (Schlaman i in. 1998; Krishnan, Bennett 2006). Wśród genów brodawkowania, występują: rodzina genów regulatorowych *nodD*, geny wspólne *nod* (ang. *common nod genes*), np. *nodABCIJ* oraz geny specyficzności gospodarza *hsn* (ang. *host specificity nodulation*) (Downie 1998; Sadowsky 2005). Czynniki Nod powstają w odpowiedzi na specyficzny rodzaj flawonoidu, wydzielanego przez określoną roślinę: na przykład luteolina, wytwarzana przez *Medicago sativa*, indukuje geny *nod* *S. meliloti*, apigenina i eriodyktiol wydzielany przez *Pisum sativum* indukują geny *nod* u *R. leguminosarum* bv. *viciae*, natomiast genisteina i daidzeni-na, pochodzące z *Glycine max*, indukują geny *nod* u *B. japonicum* i *S. fredii* (Krishnan, Bennett 2006). Specyficzność gospodarza ryzobiowych czynników Nod wynika z obecności na ich lipochitoooligosacharydowej strukturze rdzeniowej różnych podstawników (monocukrów, grupy sulfonowej, grupy metylowej, karbamylowej i in.), i jest to determinowane przez geny *hsn* (Gordon i in. 2001; Yakota, Hayashi 2011).

Literatura naukowa wskazuje na negatywny wpływ metali ciężkich na tworzenie brodawek u roślin bobowatych (Ahmad i in. 2012). Jony tych pierwiastków mogą hamować rozwój brodawek i działać selekcyjnie na genotypy ryzobiów, występujących w brodawkach korzeniowych (Giller i in. 1989; Chaudhary i in. 2004). Na terenie Polski, do obszarów o wysokim stężeniu toksycznych jonów metali ciężkich w podłożu, głównie cynku (Zn), ołowiu (Pb) i kadmu (Cd) należą hałdy pokopalniane rud cynku i ołowiu, tzw. galmany (Szarek-Łukaszewska, Niklińska 2002). Stanowiska te są skrajnie nieprzyjazne dla wzrostu roślin, w tym bobowatych oraz ich mikrosymbiontów (Zahran 1999). Ponieważ zwałowiska galmanowe są utworami pochodzenia antropogenicznego, stanowią siedliska wysoce zróżnicowane pod względem składu chemicznego i struktury fizycznej podłoża, są obszarem silnie nasłonecznionym, narażonym na erozję, ubogim w wodę oraz składniki odżywcze. Celem pracy jest ustalenie zakresu specyficzności gospodarza i zdolności

wiązania azotu atmosferycznego ryzobiów wyizolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej (*Trifolium repens*), rosnącej na „starej” – ok. 70-100-letniej hałdzie galmanowej Bolesław oraz kontrolnej łące w Bolestraszczykach – na podstawie liczby i barwy brodawek korzeniowych oraz świeżej masy pędu wybranych gatunków roślin bobowatych, inokulowanych badanymi izolatami.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły czyste kultury ryzobiów, uzyskane w wyniku izolacji z brodawek korzeniowych koniczyny białej (podrozdział 2.2.1) i zastosowaniu metody rozcieńczeń (podrozdział 2.2.2). Rośliny, z których bakterie brodawkowe izolowano pochodziły ze „starej” – ok. 70-100-letniej hałdy Zn-Pb Bolesław (10 izolatów) oraz ze stanowiska kontrolnego w Bolestraszczykach (10 izolatów). Zakres gospodarza badanych izolatów ustalono na podstawie ich zdolności do tworzenia brodawek na korzeniach wybranych gatunków roślin bobowatych, wykorzystując w tym celu laboratoryjny test roślinny (podrozdział 2.2.3). W teście roślinnym wykorzystano pięć gatunków roślin: groch siewny (*Pisum sativum*) odmiana Milwa, lucernę siewną (*Medicago sativa*), łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius*) odmiana Karo, koniczynę białą (*Trifolium repens*) odmiany RD80 oraz wykę siewną (*Vicia sativa*) odmiana Hanka.

2.2. Metody

2.2.1. Izolacja ryzobiów z brodawek korzeniowych koniczyny białej

Rośliny, wykopane wraz z systemem korzeniowym, oczyszczono z ziemi i dokładnie umyto pod bieżącą wodą. System korzeniowy, po odcięciu, został ponownie opłukany trzykrotnie pod bieżącą wodą oraz trzykrotnie opłukany jałową wodą destylowaną. Odcięte brodawki korzeniowe poddano powierzchniowemu jałowieniu. Proces jałowienia polegał na zanurzeniu brodawek w sublimacie (0,1% HgCl_2) na okres 45 sek., następnie trzykrotnym opłukaniu jałową wodą destylowaną, zanurzeniu w 75% etanolu przez 60 sek., oraz pięciokrotnym płukaniu jałową wodą destylowaną (Vincent 1970). Brodawki, po odcięciu wyjałowionym skalpelem, miażdżono w kropli jałowej wody destylowanej, a uzyskany materiał zawierający ryzobia, posiewano metodą sektorowo-redukcyjną na stałe podłoże 79CA, o składzie: $10 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ D-mannitol, $0,5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0,2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,

0,1 g×L⁻¹ NaCl, 0,1 g×L⁻¹ glicerofosforan wapnia, 1 g×L⁻¹ ekstrakt drożdżowy Difco, 1 g×L⁻¹ kwaśny hydrolizat kazeiny, 14 g agaru, pH 7,2-7,4. Szalki umieszczano w cieplarni o temperaturze 28°C.

2.2.2. Uzyskanie czystych kultur ryzobiów metodą rozcieńczeń

Izolaty bakterii uzyskane z brodawek korzeniowych oczyszczano metodą rozcieńczeń przy wykorzystaniu jałowego roztworu 0,9% NaCl w komorze laminarnej ESCO Smart Control z zamkniętym obiegiem powietrza. Procedura polegała na pobraniu wyizolowanych bakterii przy pomocy ezy, umieszczeniu ich w sterylnych probówkach zawierających 300 µL 0,9% NaCl, wymieszaniu przez pipetowanie, i rozcieńczeniu. 100 µL mieszaniny (z różnych rozcieńczeń) posiewano na płytki Petry'ego zawierającą stałe podłoże 79CA (Vincent 1970). Płytki umieszczano w cieplarni o temperaturze 28°C. Pojedyncze, mlecznobiałe kolonie bakterii, o średnicy około 1,5 mm po trzech dniach wzrostu, stanowiły czyste kultury bakterii.

2.2.3. Laboratoryjny test roślinny

Jałowe nasiona uzyskane zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.2.1., pozostawiano na dwie godziny w celu napęczenia (Vincent 1970). Wyjałowione nasiona roślin umieszczano na szalkach Petry'ego ze stałym podłożem Hoagland'a (5 mM×L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂, 5 mM×L⁻¹ KCl, 1 mM×L⁻¹ KH₂PO₄, 2 mM×L⁻¹ MgSO₄×7H₂O, 0,25 mM×L⁻¹ FeC₆H₅O₇, 42,5 µM×L⁻¹ H₃BO₃, 9 µM×L⁻¹ MnCl₂×4H₂O, 0,3 µM×L⁻¹ CuSO₄×5H₂O, 0,75 µM×L⁻¹ ZnSO₄×7H₂O, 0,1 µM×L⁻¹ Na₂MoO₄×2H₂O, pH 7,2-7,4) i inkubowano w ciemności w temperaturze 21°C. Wykiełkowane nasiona przenoszono pojedynczo do probówek ze stałym podłożem Hoagland'a (zamkniętych korkami z ligniny), i umieszczono w kontrolowanych warunkach stałego oświetlenia PAR (promieniowanie fotosyntetycznie czynne) 150 µE×m⁻²×s⁻¹ i temperatury ok. 21°C. Jednotygodniowe siewki roślin szczepiono badanymi ryzobiami poprzez przeniesienie bakterii za pomocą ezy w pobliże strefy korzeniowej rośliny (każdy szczep w dwóch powtórzeniach). Probówki z roślinami inkubowano przez okres czterech tygodni w temperaturze 21°C przy fotoperiodzie 12/12 godz. (światło/ciemność). Kontrolę negatywną stanowiły rośliny, które nie były szczepione ryzobiami. Badania kontrolne wykonano w trzech powtórzeniach.

2.2.4. Analiza zdolności bakterii do tworzenia brodawek korzeniowych i wiązania azotu atmosferycznego

Po czterech tygodniach wzrostu roślin na podłożu bezazotowym policzono liczbę brodawek, określono ich barwę, a także oznaczono świeżą masę pędu poprzez ich zważenie z dokładnością do 0,0001 g.

2.2.5. Analiza statystyczna

Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne $\pm$ SD. Dane poddano dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA), a istotność różnic między średnimi oceniono przy pomocy wielokrotnego testu rozstępu Duncana (IBM SPSS Statistics 21, IBM Corporation, Somers, NY, USA).

3. Teren badań

Koniczyna biała, z której izolowano ryzobia, pochodziła ze stanowiska hałdowego Bolesław oraz z łąki w Bolestraszcach. Hałda Bolesław (50°17'N, 19°29'E) jest antropogenicznie ukształtowanym zwałowiskiem pokopalnianym rud cynku i ołowiu, zlokalizowanym w miejscowości Bolesław, na obszarze Olkuskiego Okręgu Rudnego, ok. 20 km od Olkusza (Wyżyna Śląsko-Krakowska). Wiek tej hałdy szacuje się na około 70-100 lat. Stanowisko to jest porośnięte zwartą murawą, powstałą drogą sukcesji. Jednak stanowi ono siedlisko nieprzyjazne dla życia roślin, ze względu na długotrwałą insolację, deficyt wody i składników mineralnych oraz bardzo wysoką zawartość jonów metali ciężkich w industrioziemiu (40000 mg Zn $\times$ kg⁻¹, 3000 mg Pb $\times$ kg⁻¹, 170 mg Cd $\times$ kg⁻¹ s.m. gleby – na podstawie: Szarek-Łukaszewska, Niklińska 2002), przy dopuszczalnym stężeniu tych metali wynoszącym: Zn 100-3000 mg $\times$ kg⁻¹, Pb 50-1000 mg $\times$ kg⁻¹, Cd 1-20 mg $\times$ kg⁻¹ (Dz. U. 02.165.1359 z dn. 04.10.2002 r).

Łąka kontrolna w Bolestraszcach jest zlokalizowana na Pogórzu Przemyskim, ok. 10 km od Przemyśla (49°48'N, 22°50'E). Teren ten jest w niskim stopniu zanieczyszczony metalami ciężkimi. Średnie stężenie jonów metali w ryzosferowej warstwie gleby wynosi: Zn 49,6 mg $\times$ kg⁻¹, Pb 21,0 mg $\times$ kg⁻¹, Cd 0,30 mg $\times$ kg⁻¹ (Lipińska 2013). Wybór stanowiska kontrolnego był podyktowany podobnymi warunkami klimatycznymi, długością sezonu wegetacyjnego oraz podobną historią geologiczną w odniesieniu do obszaru badanego zwałowiska galmanowego.

4. Wyniki

Test roślinny z dwudziestoma szczepami ryzobiów, które zostały uzyskane z brodawek korzeniowych koniczyny białej, pochodzącej ze starej hałdy Zn-Pb Bolesław i stanowiska kontrolnego w Bolestraszcach, wykazał zdolność baterii do indukcji brodawek jedynie na systemie korzeniowym koniczyny białej. Brodawki miały różową barwę, a świeża masa pędu koniczyny białej szczepionej badanymi ryzobiami była istotnie wyższa niż roślin kontrolnych, które nie były szczepione ryzobiami, i u których nie stwierdzono brodawek korzeniowych (tab. 1). Wyniki te wskazują na wiązanie azotu atmosferycznego przez badane ryzobia w symbiozie z *T. repens*.

Tabela 1. Biomasa roślin inokulowanych izolatami ryzobiów, pochodzących z brodawek korzeniowych roślin rosnących na stanowisku hałdowym w Bolesławiu (h) i kontrolnym w Bolestraszcach (k), NI – rośliny nieinokulowane

Nr szczepu	Świeża masa pędu roślin [g]				
	<i>P. sativum</i>	<i>M. sativa</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>T. repens</i>	<i>V. sativa</i>
1.1k	1,54±0,03 ^a	0,043±0,009 ^a	0,98±0,21 ^a	0,56±0,14 ^a	0,26±0,05 ^a
1.2k	2,20±0,56 ^a	0,032±0,002 ^a	0,85±0,19 ^a	0,80±0,10 ^a	0,37±0,07 ^a
2.1k	0,79±0,12 ^a	0,036±0,006 ^a	0,98±0,47 ^a	0,49±0,11 ^a	0,33±0,09 ^a
3.6k	1,32±0,85 ^a	0,031±0,010 ^a	1,02±0,27 ^a	0,80±0,09 ^a	0,29±0,04 ^a
3.7k	1,58±0,09 ^a	0,032±0,012 ^a	0,88±0,09 ^a	0,78±0,08 ^a	0,32±0,08 ^a
3.8k	1,45±0,50 ^a	0,037±0,008 ^a	0,95±0,19 ^a	0,96±0,10 ^a	0,24±0,06 ^a
3.10k	0,89±0,13 ^a	0,035±0,008 ^a	1,30±0,62 ^a	0,65±0,15 ^a	0,55±0,11 ^a
4.1k	1,32±0,22 ^a	0,037±0,011 ^a	0,90±0,14 ^a	0,54±0,24 ^a	0,25±0,08 ^a
6.2k	0,97±0,11 ^a	0,030±0,010 ^a	0,88±0,19 ^a	0,57±0,16 ^a	0,27±0,10 ^a
9.1k	1,06±0,03 ^a	0,028±0,009 ^a	1,09±0,27 ^a	0,59±0,05 ^a	0,44±0,12 ^a
3.1h	1,20±0,45 ^a	0,058±0,002 ^a	1,21±0,36 ^a	0,66±0,09 ^a	0,22±0,14 ^a
3.2h	0,68±0,08 ^a	0,038±0,008 ^a	1,07±0,42 ^a	0,84±0,07 ^a	0,37±0,02 ^a
4.6h	1,56±0,12 ^a	0,027±0,010 ^a	1,32±0,29 ^a	0,59±0,13 ^a	0,11±0,04 ^a
4.7h	1,05±0,25 ^a	0,051±0,009 ^a	0,85±0,12 ^a	0,55±0,07 ^a	0,39±0,06 ^a
4.8h	0,98±0,35 ^a	0,020±0,004 ^a	0,99±0,03 ^a	0,52±0,20 ^a	0,33±0,09 ^a
5.6h	1,21±0,40 ^a	0,034±0,004 ^a	1,40±0,18 ^a	0,54±0,16 ^a	0,28±0,03 ^a
5.7h	1,44±0,20 ^a	0,063±0,008 ^a	0,73±0,17 ^a	0,75±0,20 ^a	0,14±0,02 ^a
5.8h	0,88±0,17 ^a	0,030±0,007 ^a	0,96±0,09 ^a	0,89±0,12 ^a	0,19±0,05 ^a

6.1h	0,70±0,07 ^a	0,050±0,003 ^a	0,80±0,16 ^a	0,65±0,10 ^a	0,27±0,06 ^a
6.2h	1,45±0,09 ^a	0,042±0,009 ^a	0,87±0,22 ^a	0,48±0,08 ^a	0,24±0,09 ^a
NI	0,83±0,02 ^a	0,052±0,012 ^a	0,94±0,10 ^a	0,16±0,02 ^b	0,31±0,07 ^a

Źródło zmienności ANOVA (wartości P)

szczep	NS	NS	NS	NS	NS
roślina	NS	NS	NS	0,0000	NS
szczep× roślina	NS	NS	NS	NS	NS

Oznaczenia: Wartości średnie w kolumnie oznaczone różnymi literami zapisanymi w indeksie górnym różnią się istotnie przy $p < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA i test post hoc Duncan'a); NS – wartość nieistotna statystycznie

Źródło: opracowanie własne

W przypadku takich roślin jak: groch siewny, lucerna siewna, łubin wąskolistny i wyka siewna, inokulowanych badanymi ryzobiami, nie stwierdzono brodawek korzeniowych, a ich świeża masa pędu nie różniła się istotnie w stosunku do roślin, które nie były zakażone tymi bakteriami.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ciężarze nadziemnej części koniczyny białej inokulowanych bakteriami pochodzącymi ze stanowiska kontrolnego i pochodzącymi ze starej hałdy Bolesław.

5. Dyskusja

Literatura naukowa wskazuje, że metale ciężkie hamują proces tworzenia brodawek korzeniowych u roślin bobowatych oraz zaburzają ich funkcjonowanie (Chaudhary i in. 2004). McGrath i in. (1987, 1988) oraz Giller i in. (1989) stwierdzili, że w obecności jonów metali ciężkich ryzobia indukują nieefektywne brodawki na korzeniach *T. repens*, których masa była istotnie mniejsza w porównaniu do roślin rosnących na stanowisku nieskażonym. Stwierdzono również, że aktywność dinitrogenazy diazotroficznych bakterii wiążących azot w stanie asymbiotycznym jest istotnie niższa w środowisku zawierającym podwyższony poziom metali ciężkich (Brookes i in. 1984; Stark, Lee 1988). Izolaty z brodawek korzeniowych koniczyny białej pochodzącej ze starej, ok. 70-100-letniej hałdy Zn-Pb Bolesław nawiązują asocjację symbiotyczną oraz wytwarzają efektywne brodawki korzeniowe na swoim naturalnym gospodarzu podobnie jak ryzobia ze stanowiska kontrolnego w Bolestraszcach (tab. 1).

Badane ryzobia, uzyskane z brodawek korzeniowych *T. repens*, rosnącej na stanowisku hałdowym oraz na kontrolnej łące w Bolestraszcach, nie indukowały brodawek na korzeniach grochu siewnego (*Pisum sativum*), lucerny siewnej (*Medicago sativa*), łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) i wyki siewnej (*Vicia sativa*). Wynik ten potwierdza znany z literatury wąski zakres gospodarza roślinnego symbiontów koniczyny białej, co dodatkowo ułatwia ich identyfikację taksonomiczną w oparciu o ten parametr, który dawniej był wykorzystywany w klasyfikacji bakterii do gatunku (Willems 2006). Należy także podkreślić, że rośliny rodzaju *Trifolium* nawiązują relację symbiotyczną jedynie z *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rogel i in. 2011; Wang i in. 2012). Brak brodawek korzeniowych na korzeniach grochu siewnego, lucerny siewnej, łubinu wąskolistnego i wyki siewnej, szczepionych symbiontami koniczyny białej, jest dodatkowym dowodem na to, że wszystkie badane izolaty z brodawek korzeniowych koniczyny białej należą do gatunku *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Wcześniejsze badania sekwencji genu *nifH* (kodującego reduktazę dinitrogenazy) symbiontów *T. repens* pochodzących ze starej hałdy Zn-Pb Bolesław wykazały ich 100% identyczność z sekwencjami genu *nifH* referencyjnych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, które zostały zdeponowane w bazie danych GenBank (Oleńska, Małek 2015).

Różowe zabarwienie brodawek korzeniowych koniczyny białej, inokulowanej badanymi ryzobiami, oraz istotna statystycznie różnica masy tych roślin w odniesieniu do roślin nie inokulowanych (tab. 1), świadczy o efektywnym wiązaniu azotu cząsteczkowego oraz jego redukcji do amoniaku (NH_3), a więc formy azotu przyswajalnej dla roślin. Azot atmosferyczny (N_2) jest nieprzyswajalny dla organizmów żywych, z wyjątkiem diazotroficzných bakterii i archeonów, z powodu obecności w cząsteczce bardzo silnego, potrójnego wiązania pomiędzy atomami tego pierwiastka. Jedynie diazotrofy, dzięki wytwarzaniu kompleksu dinitrogenazy, są zdolne do obniżenia energii aktywacji reakcji redukcji azotu cząsteczkowego, z wytworzeniem NH_3 (Rees, Howard 2000; Peters, Szilagyi 2006). Ryzobia, jako symbiotyczne diazotrofy, dostarczają przyswajalne formy azotu swym roślinnym gospodarzom (Fustec i in. 2010), w wyniku czego pierwiastek ten jest wykorzystywany do syntezy związków chemicznych istotnych w budowie składników komórkowych i w metabolizmie roślin, a rezultatem jest wzrost ich masy.

Literatura

- Ahmad E., Zaidi A., Khan M.S., Oves M., 2012. Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. [W:] Zaidi A., Wani P.A., Khan M.S. (red.) Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation, Springer-Verlag/Wien, 29-44.

- Ansari P.G., Rao D.L.N., 2014. Soybean rhizobia in Indian soils: populations, host specificity and competitiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, 84, 3: 457-464.
- Brookes P.C., McGrath S.P., Klein D.A., Elliot E.T., 1984. Effects of heavy metals on microbial activity and biomass in field soils treated with sewage sludge. [W:] *Environmental Contamination*, CEP, Edinburgh, 574-585.
- Chaudhary P., Dudeja S.S., Kapoor K.K., 2004. Effectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiol. Res.*, 159: 121-127.
- Czerpak R., 1993. *Biochemia ogólna Część I. Biochemia strukturalna*. Instytut Biologii Filii UW w Białymstoku, Białystok.
- Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., 2001. *nod* genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim. Polon.*, 48, 2: 359-365.
- Desbrosses G.J., Stougaard J., 2011. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host & Microbe*, 10: 348-358.
- Downie A.J., 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. [W:] Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.) *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 2-21.
- Fauvart M., Michiels J., 2008. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium legume symbiosis. *FEMS Microbiol Lett.*, 285: 1-9.
- Fustec J., Lesuffleur F., Mahieu S., Cliquet J.B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 30: 57-66.
- Garg N., Geetanjali M., 2009. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling: a review. [W:] Lichtfouse E. i in. (red.), *Sustainable Agriculture*, Springer Science+Business Media B.V. – EDP Sciences, 519-531.
- Giller K.E., McGrath S.P., Hirsch P.R., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 841-848.
- Gnat S., Małek W., Oleńska E., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Łotocka B., Wójcik M., 2015. Phylogeny of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L. *PLoS ONE*, 10 (10): e0141504.
- Gordon A.J., Lea P.J., Rosenberg Ch., Trinchant J-Ch., 2001. Nodule formation and function. [W:] Lea P.J. et al. (red.), *Plant Nitrogen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 101-146.
- Graham P.H., 2005. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. [W:] Werner D., Newton E. (red.) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*, Springer Netherlands, 89-112.
- Hadri A-E., Bisseling T., 1998. Responses of the Plant to Nod Factors. [W:] Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.) *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 2-21.
- <http://rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>

- Krishnan H.B., Bennett J.O., 2006. *Rhizobium*-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. [W:] Gnanamanickam S.S. (red.) Plant-associated bacteria, Springer, Netherlands, 57-104.
- Lipińska E.J (red.), 2013. Raport o stanie środowiska w województwie podkarpackim w 2012 roku. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska, Rzeszów; www.wios.rzeszow.pl [data dostępu: 08.06.2015].
- Maunoury N., Kondorosi A., Kondorosi E., Mergaert P., 2005. Cell biology of nodule infection and development. [W:] Werner D., Newton E. (red.) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment, Springer Netherlands, 89-112.
- McGrath S.P., Brookes P.C, Giller K.E., 1988. Effects of potentially toxic metals in soils derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. Soil Biol. Biochem., 20: 415-424.
- McGrath S.P., Giller K.E., Brookes P.C., 1987. Rothamsted Experimental Station Report for 1986, 154.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M., Paul W., Ronikier M., Bernacki L., Cieślak E., Głowacki Z., Leda M., Mitka J., Paśnik A., Rostański K., Szeląg Z., Wójcicki J.J., Zalewska-Gałosz J., Zieliński J., Żukowski W., 2002. Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist. Biodiversity of Poland 1.W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 442.
- Oleńska E., Małek W., 2015. Genetic differentiation of *Trifolium repens* microsymbionts deriving from Zn–Pb waste-heap and control area in Poland. J. Basic Microbiol., 55: 462-470.
- Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Velázquez E., Eulogio, Bedmar J., Bedmar E.J., 2015. Bacterial associations with legumes., CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 34: 1-3.
- Peters J.W., Szilagy R.K., 2006. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. Curr. Opin. Chem. Biol., 10:101-108.
- Rees D.C., Howard J.B., 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. Curr. Opin. Chem. Biol., 4: 559-566.
- Rivas R., García-Fraile P., Velázquez E., 2009. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiol. Insights, 2: 51-69.
- Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Romero E.M., 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. Syst. Appl. Microbiol., 34: 96-104.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. Dz. U. 02.165.1359 z dn. 04.10. 2002 r.
- Rutkowski L., 2007. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. Warszawa. Wyd. Naukowe PWN, 834.

- Sadowsky M.J., 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. [W:] Werner D., Newton E. (red.) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment, Springer Netherlands, 89-112.
- Schlaman H.R.M., Donald A., Phillips D.A., Kondorosi E., 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. [W:] Spalink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.) The *Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 2-21.
- Shiferaw B., Bantilan M.C.S., Serraj R., 2004. Harnessing the potential of BNF for poor farmers: technological policy and institutional constraints and research need. [W:] Serraj R. (red.) Symbiotic nitrogen fixation: prospects for enhanced application in tropical agriculture. Oxford & IBH, New Delhi, 3.
- Spalink H.R., 1994. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 65: 81-98.
- Spalink H.R., 2004. Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. Trends in Microbiol., 12, 5: 201-204.
- Stark J.H., Lee D.H., 1988. Sites with a history of sludge deposition. Final Report on Rehabilitation Field Trials and Studies Relating to Soil Microbial Biomass (LDS9166 SLD).
- Szarek-Łukaszewska G., Niklińska M., 2002. Concentration of some chemical elements in *Biscutella laevigata* L. and *Plantago lanceolata* L. from calamine soils (S. Poland). Acta Biol. Cracov. ser Botanica, 44: 29-38.
- van Berkum P., Eardly B.D., 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. [W:] Spalink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.) The *Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 2-21.
- Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria, International Biological Programme Handbook No. 15, Blackwell Science Publications, Oxford.
- Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H., 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. Cell. Microbiol., 14, 3: 334-342.
- Willems A., 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil, 287: 3-14.
- Yokota K., Hayashi M., 2011. Function and evolution of nodulation genes in legumes. Cell. Mol. Life Sci., 68: 1341-1351.
- Zahran H.H., 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63: 969-989.

12 Genetyczne i biochemiczne zróżnicowanie grzybów z rodzaju *Malassezia* ze szczególnym uwzględnieniem szczepów *Malassezia pachydermatis* od zdrowych i chorych zwierząt

Adam Tylicki* / Urszula Czyżewska / Magdalena Siemieniuk

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Cytobiochemii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

* e-mail: atyl@uwb.edu.pl

Streszczenie: Grzyby należą do organizmów charakteryzujących się ogromną bioróżnorodnością. Spośród opisanych ponad 100 tys. gatunków, tylko niewielka część jest patogenna dla człowieka. Wśród drożdżaków zasiedlających organizmy zwierząt i ludzi, znajdują się gatunki oportunistyczne, np. z rodzaju *Malassezia*, które w sprzyjających warunkach, mogą powodować choroby. Według najnowszych badań, zaliczono do tego rodzaju 17 gatunków, wśród których znajduje się: 16 grzybów lipidozależnych i 1 lipidoniezależny – *M. pachydermatis*. Gatunki te wykazują znaczne zróżnicowanie, zarówno pod względem cech morfologicznych, fizjologicznych, jak i biochemicznych. Grzyby z rodzaju *Malassezia* są związane między innymi, z: zapaleniem ucha zewnętrznego, łojotokowym i atopowym zapaleniem skóry, łupieżem pstrym. Grzyby te są izolowane także ze zdrowej skóry zwierząt stałocieplnych (w tym człowieka). Obecnie coraz częściej stawiane jest pytanie, czy w przypadku zakażeń oportunistycznych, oprócz stanu fizjologicznego gospodarza, istnieją specyficzne cechy grzyba ułatwiające rozwój infekcji? Czy wśród środowiskowych szczepów można odróżnić te typowo komensalne od potencjalnie patogennych? Informacji na ten temat dostarczają badania na poziomie genetycznym i biochemicznym, które oprócz odmienności gatunków, ukazują również wyraźne zróżnicowanie wśród szczepów tego samego gatunku uzyskiwanych od chorych i zdrowych gospodarzy. Badania takie ugruntowują tezę, że wśród gatunków z rodzaju *Malassezia* istnieją szczepy typowo komensalne oraz patogenne.

Słowa kluczowe: drożdżaki, grzyby oportunistyczne, choroby ludzi i zwierząt, szczepy patogene i niepatogene

1. Wstęp

Grzyby zajmują niezwykle zróżnicowane nisze ekologiczne, co świadczy o ich ogromnej bioróżnorodności. Występują w najbliższym otoczeniu ludzi, zwierząt i roślin, jak również bezpośrednio na oraz wewnątrz organizmu człowieka jako komensale lub pasożyty wywołujące lub nasilające objawy różnego rodzaju grzybic. Liczbę gatunków grzybów na świecie szacuje się na około 1,5 mln, z czego opisano ok. 5% (Hawksworth i Rossman, 1997). Spośród tak wielu gatunków grzybów, jedynie ok. 200 uznaje się za patogeny ludzi, a zaledwie kilkanaście z nich powoduje łącznie 90% wszystkich zakażeń grzybiczych u człowieka. Większość z tych patogenów należy do *Deuteromycota*, zaś mniejsza część do *Zygomycota*. Wśród pasożytów zwierząt i ludzi znajdują się też gatunki należące do *Ascomycota* (wiele dermatofitów) i *Basidiomycota* (wśród nich rodzaj *Malassezia*, tab. 1).

Tabela 1. Pozycja systematyczna grzybów z rodzaju *Malassezia*

Jednostka systematyczna	Nazwa łacińska jednostki
Królestwo:	<i>Fungi</i>
Typ:	<i>Basidiomycota</i>
Podtyp:	<i>Ustilaginomycotina</i>
Klasa:	<i>Malasseziomycetes</i>
Rząd:	<i>Malasseziales</i>
Rodzaj:	<i>Malassezia</i>
Gatunki:	<i>M. arunalokei</i> , <i>M. brasiliensis</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. cuniculi</i> , <i>M. dermatis</i> , <i>M. equine</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. nana</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. psittaci</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. yamamotoensis</i> ,

Źródło: na podstawie: Wang i in. 2014, Wu i in. 2015, Cabanes i in. 2016, Honnavar i in. 2016.

Wśród drożdżaków zasiedlających organizmy zwierząt i ludzi występują gatunki oportunistyczne, które w sprzyjających warunkach (w przypadku zaburzeń immunologicznych, metabolicznych czy hormonalnych w organizmie gospodarza), mogą powodować zakażenia z klinicznymi objawami choroby. Do tej grupy zalicza się, między innymi, gatunki z rodzaju *Malassezia* (Gaitanis i in. 2012). Grzyby z rodzaju *Malassezia* są uznawane za składnik mikroflory skóry ludzi i zwierząt od 170 lat. Pierwszych obserwacji *Malassezia* dokonał Eichstedt w 1846 r. w materiale pobranym od pacjenta z łupieżem pstrym. Obserwacje Eichstedta w 1874 r. po-

twierdził Malassez, ku czci którego nazwano analizowany rodzaj grzybów. Castellani i Chalmers w 1913 r. opisali gatunek *Pityrosporum ovale*, a w 1951 r. Gordon wyizolował od chorych na łupież pstry, jak również ze zdrowej skóry ludzi drożdżaki, które określił jako *Pityrosporum orbiculare* (Gueho i in. 1996). Dopiero w roku 1977 udało się zweryfikować wyżej wspomniane gatunki – jako odrębne formy morfologiczne *Malassezia furfur* (gatunek zatwierdzony w 1984 r.), który może występować zarówno w formie drożdżopodobnej, jak i strzępkowej (Yarrow i in. 1984). W 1925 r. Weidmann opisał kolejny gatunek z rodzaju *Malassezia*, którym był *Malassezia pachydermatis*. Do roku 2016, w rodzaju *Malassezia* wyróżniono 14 gatunków: 13 lipidozależnych oraz 1 lipidoniezależny – *M. pachydermatis* (Wu i in. 2015). W ostatnich miesiącach opisano 3 nowe lipidozależne gatunki tego rodzaju: *M. brasiliensis*, *M. psittaci* (Cabanes i in. 2016) oraz *M. arunalokei* (Honnavar i in. 2016, tab. 1).

Wśród wyodrębnionych gatunków występuje znaczne zróżnicowanie cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych (tab. 2). Oprócz lipofilności, cechą charakterystyczną rodzaju *Malassezia* jest ściana komórkowa. Ma ona budowę wielowarstwową i jest znacznie grubsza od ścian komórkowych innych drożdżaków. Zawiera znacznie większy odsetek tłuszczów. Grubość ściany wynosi około 0,12 μm , stanowiąc 26-37% objętości komórki. Zbudowana jest z wielocukrów (70%), białek (10%) i tłuszczów (20%). Charakterystyczna struktura ściany komórkowej i wysoka zawartość lipidów powodują podwyższoną oporność *Malassezia* na czynniki chemiczne i fizyczne (Guillot i in. 1995) oraz stanowią istotny czynnik wirulencji grzyba, ułatwiający adhezję do komórek gospodarza i utrudniający fagocytozę patogenu, jak też hamujący odpowiedź zapalną (Kesavan i in. 1997). Grzyby z rodzaju *Malassezia* nie fermentują cukrów, ale wykorzystują je w procesach tlenowych (Tylicki i in. 2008). Ich wzrost i rozwój nie jest uzależniony od witamin w podłożu. Źródłem siarki jest głównie metionina, mogą również wykorzystywać cystynę i cysteinę. Preferują warunki tlenowe, jednak tolerują również warunki mikroaerofilne (Dworecka-Kaszak i Adamski 2005).

Jako typowi oportuniści, grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą być izolowane ze skóry różnych gatunków zdrowych ssaków, wliczając człowieka, nie powodując objawów choroby. W sprzyjających warunkach mogą jednak być przyczyną lub czynnikiem wikłającym wielu chorób skóry, a nawet fungemii (Gaitanis i in. 2012). Przykładowo *M. pachydermatis*, jest izolowany w 30-70% przypadków zapalenia ucha zewnętrznego u psów i w 30% przypadków łojotokowego i atopowego zapalenia skóry u tych zwierząt (Kumar i in. 2002, Bardshiri 2014). Badania przesiewowe wskazują, że gatunek ten zasiedla również skórę od 20% do nawet 80% zdrowych zwierząt (Nakano i in. 2005). Wśród ludzi chorych na atopowe zapalenie skóry,

prawie w 60% przypadków izolowane są grzyby z rodzaju *Malassezia* (Gaitanis i in. 2012). Grzyby te występują również jako komensale na skórze zdrowych ludzi (Prohic i Kasumagic-Halilovic 2009), co nastręcza problemów na poziomie wczesnej diagnozy.

Tabela 2. Charakterystyka czterech wybranych gatunków *Malassezia*

Cecha	Gatunek			
	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. globosa</i>
morfologia kolonii	gładkie, miękkie, kruche	gładkie, płaskie, miękkie	gładkie, miękkie kruche, wypukłe	szorstkie, serowate, kruche
barwa kolonii	kremowa	kremowa do beżowej	kremowa	kremowa do beżowej
kształt komórki	wydłużone, owalne	jajowate, kuliste	cyldryczne	sferyczne
długość komórki	ok. 6 µm	2,5-5 µm	2,5-5 µm	6-8 µm
typ pączkowania	szeroka podstawa	sympodialne	szeroka podstawa	wąska podstawa
% G+C	66,4	60,6	55,3	52,7
synteza katalazy	+	+	zmienne	+
redukcja DBB ¹	+	+	+	+
synteza ureazy	+	+	+	+
wzrost 37°C	dobry	dobry	dobry	słaby
max. temp. wzrostu °C	40-41	40-41	40-41	38
wzrost na podłożu bez lipidów	-	-	+	-
asymilacja Tween 20	+	-	+	-
asymilacja Tween 40, Tween 60, Tween 80	+	+	+	-
hydroliza eskuliny ²	-	+	zmienne	-

Oznaczenia: ¹ DBB (diazonium blue B) – związek wykorzystywany w wykrywaniu podstawczaków; ² eskulina – glikozyd kumarynowy kasztanowca wykorzystywany do identyfikacji niektórych grzybów i bakterii; „+” obecność cechy; „-” brak cechy.

Źródło: na podstawie: Jagielski i in. 2013.

Obecnie coraz częściej stawiane jest pytanie, czy w przypadku zakażeń oportunistycznych, oprócz stanu fizjologicznego gospodarza, istnieją specyficzne cechy grzyba ułatwiające rozwój infekcji? Czy wśród środowiskowych szczepów można

odróżnić te typowo komensalne – od potencjalnie patogennych? Zagadnienie to nabiera szczególnego znaczenia obecnie, kiedy grzybnice dotyczą coraz większego odsetka ludzi i zwierząt. Leczenie ich jest trudne, a choroby często mają charakter nawrotowy (Zawirska i Adamski 2004). Dodatkowo coraz częściej, również w przypadku grzybów z rodzaju *Malassezia*, stwierdza się ograniczenie wrażliwości na powszechnie stosowane leki (Watanabe i in. 2014), a gatunki uznawane za typowo zoofilne izoluje się również od chorych i zdrowych ludzi (Prohic i Kasumagic-Halilovic 2009). Poniższa praca podsumowuje dane dotyczące różnorodności grzybów z rodzaju *Malassezia*, ze szczególnym uwzględnieniem *M. pachydermatis* na poziomie biologii molekularnej i biochemii, wskazując na istotne różnice pomiędzy szczepami izolowanymi od chorych i zdrowych gospodarzy.

2. Genetyczne i biochemiczne zróżnicowanie w rodzaju *Malassezia*

Mimo, że grzyby z rodzaju *Malassezia* cieszą się zainteresowaniem lekarzy, weterynarzy i biologów od 170 lat, do niedawna genomy tych drożdżaków były słabo poznane. Pierwsze sekwencje genomów przedstawicieli *Malassezia* uzyskano na początku XXI wieku. Do niedawna znane były sekwencje genomów tylko 3 spośród 17 gatunków: *M. globosa*, *M. restricta* i *M. sympodialis* (Gioti i in. 2013, Xu i in. 2007). W październiku 2015 r. ukazała się informacja o sekwencji genomu *M. pachydermatis* (Triana i in. 2015), natomiast w listopadzie 2015 r. opublikowano obszerną pracę, w której zaprezentowano porównanie genomów 14 gatunków z rodzaju *Malassezia* (Wu i in. 2015). Wielkość genomu wśród przedstawicieli rodzaju *Malassezia* waha się przeważnie od 6,4 do 8,5 Mbp, chociaż w przypadku niektórych szczepów *M. furfur* stwierdzono wielkość genomu na poziomie aż 14,8 Mbp. Genomy tych grzybów są małe w porównaniu z innymi przedstawicielami drożdżaków i innych grzybów, zawierają stosunkowo mniej genów i większy odsetek regionów kodujących białka. Ograniczona w stosunku do innych drożdżaków wielkość sekwencji niekodujących oraz liczba genów mogą wynikać ze skrajnego przystosowania tych grzybów do zajmowanej niszy ekologicznej, jaką jest skóra organizmów stałocieplnych. Średnia liczba genów u gatunków *Malassezia* wynosi ok. 4700 (Wu i in. 2015).

Obserwacje dotyczące poziomego transferu, jak i utraty genów dostarczają intrygujących informacji prowadzących do zrozumienia ewolucji rodzaju *Malassezia*. Analiza uzyskanych sekwencji wykazała, że w trakcie rozwoju ewolucyjnego

rodzaj *Malassezia* mógł uzyskać 64 geny związane ze specyficzną niszą zajmowaną przez te organizmy. Jeden z tych genów (domena PFam PF06742, hydrolaza o nieznannej funkcji) jest obecny u wszystkich gatunków w jednej kopii, z wyjątkiem *M. furfur* i *M. slooffiae*, posiadających po 2 kopie tego genu. Mimo, że gen ten jest uniwersalny dla wszystkich *Malassezia*, nie stwierdzono go u innych podstawczaków. Fakt ten może świadczyć o procesie poziomego transferu genów z patogennych bakterii i grzybów, u których stwierdzano podobne sekwencje. Gen ten może mieć duże znaczenie w przystosowaniu grzybów z rodzaju *Malassezia* do zajmowanej niszy ekologicznej, gdyż stwierdzono jego podwyższoną ekspresję w warunkach niedoboru składników odżywczych w środowisku. Innym przykładem horyzontalnego transferu genów od bakterii *Blastomonas* i *Sphingomonas* do przedstawicieli *Malassezia* może być gen kodujący katalazę (PFam domena PF00199), którego obecność stwierdzono u wszystkich *Malassezia* oprócz *M. restricta* i *M. pachydermatis* (Kaneko i in. 2007). Biorąc pod uwagę fakt, że oba gatunki żyją w środowisku tlenowym skóry, muszą wykazywać inne mechanizmy obronne przeciw reaktywnym formom tlenu. W przypadku *M. pachydermatis*, stwierdzono aktywność katalazy o odmiennych właściwościach w stosunku do pozostałych przedstawicieli rodzaju *Malassezia* (Kaneko i in. 2007). *M. slooffiae* posiada dodatkowy, oprócz bakteryjnego, gen katalazy zbliżony sekwencją do genów charakterystycznych dla królestwa grzybów. Inna, charakterystyczna dla *Malassezia* grupa genów prawdopodobnie kodujących proteazy (PFam domena PF13367), była stwierdzona we wszystkich genomach gatunków znajdujących na skórze ludzi, podczas gdy u zoofilnych przedstawicieli *Malassezia* i pozostałych podstawczaków sekwencji takich nie stwierdzono, co może świadczyć o niszowo-specyficznym horyzontalnym transferze genów do gatunków antropofilnych (Wu i in. 2015).

Zestaw 741 genów został utracony w trakcie ewolucji rodzaju *Malassezia*. Dotyczyło to głównie genów związanych z metabolizmem węglowodanów, zgodnie z adaptacją do ubogiego w cukry środowiska skóry zwierząt stałocieplnych. Analiza porównawcza genomów 14 gatunków *Malassezia* ujawniła ponadto ogromne adaptacyjne znaczenie genów kodujących lipazy, fosfolipazy, proteazy aspartyłowe i inne peptydazy (Wu i in 2015). W przypadku *M. pachydermatis*, stwierdzono obecność 50 genów kodujących enzymy degradujące lipidy (35 lipaz i 15 esteraz). Nie stwierdzono natomiast typowej dla grzybów syntazy kwasów tłuszczowych, co jest interesujące w obliczu faktu, że ten gatunek, jako jedyny w rodzaju *Malassezia*, jest lipidoniezależny. W przypadku tego gatunku stwierdzono natomiast obecność syntazy poliketydowej (Triana i in. 2015) powiązanej z syntezą lipidów. Droga, na której *M. pachydermatis* syntetyzuje kwas mirystynowy, będący prekursorem innych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jest nadal niejasna.

Wcześniejsze badania genetyczne dotyczące zróżnicowania wśród szczepów *M. pachydermatis* wyizolowanych od psów zdrowych oraz osobników ze zmianami skórnymi ujawniły zróżnicowanie genetyczne na poziomie sekwencji *chs-2* (gen kodujący syntazę chityny 2) i ITS-1 (ang. *internal transcribed spacer 1*). Ustalono, że szczepy uzyskane od zwierząt chorych charakteryzowały się podwyższoną aktywnością fosfolipaz. Tylko jeden z wyodrębnionych genotypów grupował szczepy od zdrowych zwierząt charakteryzujące się obniżoną aktywnością fosfolipaz (Cafarchia i in. 2008). Analizując sekwencje IGS-1 (ang. *intergenic spacer 1*) wyróżniono 3 grupy genotypów *M. pachydermatis*, wśród których stwierdzono 10 podtypów (Sugita i in. 2005). Porównując owe genotypy wyodrębnione wśród szczepów pobranych od psów zdrowych i chorych na atopowe zapalenie skóry stwierdzono, że wśród izolatów od psów chorych dominował podtyp 3D i 3C. Pozostałe podtypy przeważały wśród izolatów uzyskanych od psów zdrowych. Dodatkowo stwierdzono, że podtypy charakterystyczne dla psów chorych wykazywały lepszy wzrost w podwyższonym pH pożywki (8,0), podczas gdy pozostałe szczepy najlepiej rosły w pożywce o pH 6,0-7,0. Powyższa cecha może ułatwiać kolonizację skóry psów podatnych na atopowe zapalenie skóry, gdyż w tych przypadkach stwierdza się pH skóry podwyższone do wartości 8,2-9,0 (Koike i in. 2013). Odkrycia związane ze zróżnicowaniem genetycznym szczepów *M. pachydermatis*, w zależności od źródła izolacji (osobniki zdrowe lub chore), wskazują na istnienie cech warunkujących patogenność szczepów (Han i in. 2013).

Synteza różnych białek, w tym enzymów i antygenów przez mikroorganizmy jest wiązana z ich patogennością. Badania sekrecji sulfatazy chondroityny oraz hialuronidazy u szczepów *M. pachydermatis*, izolowanych od chorych i zdrowych psów, nie wykazały różnic ani w sekrecji, ani w aktywności badanych enzymów (Couinho 2005). Uzyskane wyniki skłoniły do poszukiwania innych czynników patogenności. Porównanie profili białkowych *M. pachydermatis*, izolowanych od psów zdrowych i chorych na zapalenie ucha, wykazało istotne różnice (Nowakiewicz i Ziółkowska 2013). Znalezione 8 białek o masie molekularnej od 13 do 75 kDa, które były charakterystyczne wyłącznie dla szczepów wyizolowanych od zwierząt chorych, co może wskazywać na znaczne różnice w ekspresji informacji genetycznej w obu grupach szczepów, lub różnice w posiadanej informacji genetycznej. Może to również wpływać na zróżnicowanie struktury antygenowej obu grup szczepów, jak również różnych gatunków z rodzaju *Malassezia* (Habibah i in. 2005, Zargari i in. 2003). Chen i in. (2002) zaobserwowali białka *M. pachydermatis*, które powodowały reakcję immunologiczną u przeszło 50% psów z atopowym zapaleniem skóry, podczas gdy u zdrowych psów nie obserwowano tak silnej reakcji.

Malassezia posiadają zdolności lipolityczne w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Potrafią syntetyzować fosfolipazy, których aktywność ma wpływ na uwalnianie kwasu arachidonowego z komórek. Metabolity tego kwasu związane są z procesami zapalnymi skóry, przez co mogą być czynnikiem rozpoczynającym proces zapalenia, zainicjowany przez dany rodzaj drożdżaków. Co więcej, *Malassezia* posiadają zdolność syntezy lipoperoksydazy. W rezultacie uszkodzają błony komórkowe gospodarza, co sprzyja rozwojowi infekcji. Objawem aktywności lipoperoksydazy są także zmiany pigmentacji skóry obserwowane w przebiegu chorób powodowanych przez te drożdżaki (De Luca i in. 1996). Ostatnie badania dotyczące genotypowania szczepów *M. pachydermatis* pod względem sekwencji ITS-1 i IGS-1, wykonane na 27 szczepach od psów zdrowych i 32 szczepach od psów z zapaleniem ucha zewnętrznego, nie wykazały istotnego zróżnicowania. Jednakże stwierdzono znacznie podwyższoną aktywność fosfolipaz u szczepów izolowanych od psów chorych, podczas gdy aktywność lipaz była porównywalna (Teramoto i in. 2015). Badania z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów poszczególnych fosfolipaz wykazały, że istotne znaczenie w procesie patogenezy stanów zapalnych powodowanych przez drożdżaki, ma aktywność fosfolipazy D (Hube i in. 2001, Teramoto i in. 2015). Wcześniejsze badania wykazały wyższą aktywność wydzielanych pozakomórkowo fosfolipaz u szczepów *M. pachydermatis* uzyskanych od zdrowych psów – w porównaniu ze szczepami uzyskanymi ze skóry ludzi (Park i in. 2013). Badacze (Park i in. 2013) potwierdzili również, że zapalenie ucha, indukowane przez infekcję *M. pachydermatis*, wiązało się z podwyższoną sekrecją fosfolipaz.

3. Podsumowanie

Wyniki powyżej cytowanych prac wskazują, że prócz odmienności genetycznej gatunków z rodzaju *Malassezia*, spowodowanej horyzontalnym transferem genów, jak również eliminacją pewnych sekwencji charakterystycznych dla innych podstawczaków na drodze ewolucji i adaptacji do specyficznej niszy ekologicznej zajmowanej przez te grzyby, istnieje wyraźne zróżnicowanie wśród szczepów tego samego gatunku uzyskiwanych od chorych i zdrowych zwierząt. Zróżnicowanie to przekłada się na specyficzne cechy biochemiczne (np. aktywność fosfolipaz lub strukturę antygenową) zasadniczo różniące obie grupy szczepów. Odkrycia te przyczyniają się do uznania hipotezy o istnieniu szczepów potencjalnie patogenych i typowo komensalnych wśród gatunków z rodzaju *Malassezia*. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga identyfikacji różniących szczepy białek i badań nad zróżnico-

waniem ekspresji informacji genetycznej w obu grupach szczepów. Uznanie powyższej hipotezy może spowodować weryfikację dotychczas uznawanej definicji oportunizmu wśród grzybów.

Podziękowania

Artykuł sfinansowany z grantu NCN – DEC-2013/11/N//NZ6/02567.

Literatura

- Bardshiri B., Tavena M., Peighambarzadeh S.Z., Abdolrahimi M., 2014. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canals of dogs with and without *otitis externa*. *Walia J.*, 30: 24-26.
- Cabanes F.J., Coutinho S.D., Puig L., Bragulat M.R., Castella G., 2016. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. *Rev. Iberoam. Micol.*, 33: 92-99.
- Cafarchia C., Gasser R.B., Latrofa M.S., Parisi A., Campbel B.E., Otranto D., 2008. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. *FEMS Yeast Res.*, 8: 451-459.
- Chen T.A., Halliwaell R.E., Hill P.B., 2002. IgG responses to *Malassezia pachydermatis* antigens in atopic and normal dogs. In: *Advances in Veterinary Dermatology* vol. 4, edited by Thoday K.L., Foil C.S., and Bond R. Blackwell Science Ltd., Oxford, 2002, 202-209.
- Couinho S.D.A., 2005. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57: 149-153.
- De Luca C., Picardo M., Breathnach A., Passi A., 1996. Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in *pityriasis versicolor*. *Exp. Dermatol.*, 5: 49-56.
- Dworecka-Kaszak B., Adamski Z., 2005. Zakażenia grzybami z rodzaju *Malassezia*. Wydawnictwo SGGW. Warszawa 2005.
- Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M., Bassukas I.D., Velegraki A., 2012. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 25: 106-141.
- Gioti A., Nystedt B., Li W., Xu J., Andersson A., Averette A.F., Münch K., Wang X., Kappauf C., Kingsbury J.M., Kraak B., Walker L.A., Johansson H.J., Holm T., Lehtiö J., Stajich J.E., Mieczkowski P., Kahmann R., Kennell J.C., Cardenas M.E., Lundeberg J., Saunders C.W., Boekhout T., Dawson T.L., Munro C.A., de Groot P.W.J., Butler G., Heitman J., Scheynius A., 2013. Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *mBio* 4: e00572-12, doi.org/10.1128/mBio.00572-12.

- Gueho E., Boekhout T., Ashbee H. R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J., 1998. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medicine Mycology*, 36 (Suppl. 1): 220-229.
- Gueho E., Midgley G., Guillot J., 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 337-55.
- Guillot J., Gueho E., Prevost M.C., 1995. The ultrastructure of dimorphic yeast *Malassezia furfur*. *J. Mycol. Med.* 5: 86-91.
- Habibah A., Catchpole B., Bond R., 2005. Canine serum immunoreactivity to *M. pachydermatis* *in vitro* is influenced by the phase of yeast growth. *Vet. Dermatol.* 16: 147-152.
- Han S.H., Chung T.H., Nam E.H., Park S.H., Hwang C.Y., 2013. Molecular analysis of *Malassezia pachydermatis* isolated from canine skin ear in Korea. *Med. Mycol.*, 51: 396-404.
- Honnavar P., Prasad G.S., Ghosh A., Dogra S., Handa S., Rudramurthy S.N., 2016. *Malassezia erunaloeki* sp nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. *J. Clin. Microbiol.*, 54: 1826-1834.
- Hawksworth D.L. Rossman A.Y., 1997. Where are all the Undescribed Fungi? Mini-Review. *Phytopathology*, 87: 888-891.
- Hube B., Hess D., Baker C.A., Schaller M., Schafer W., Dolan J.W., 2001. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology*, 147: 879-889.
- Jagielski T., Rup E., Macura A.B., Bielecki J., 2013. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia*. I. Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne. *Postępy Mikrobiologii*, 52: 295-305.
- Kaneko T., Makimura K., Abe M., Shiota R., Nakamura Y., Kano R., Hasegawa A., Sugita T., Shibuya S., Watanabe S., Yamaguchi H., Abe S., Okamura N., 2007. Culture-Based system for identification of *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 3737-3742.
- Kesavan S., Holland K., Cunliffe W., Ingham E., 1997. The effects of de-lipidisation on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species. *J. Invest. Dermatol.*, 108: 389A.
- Koike A., Kano R., Nagata M., Chen C., Hwang C.Y., Hasegawa A., Kamata H., 2013. Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine health skin and lesional skin of atopic dermatitis in Japan, Korea, and Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 955-985.
- Kumar A., Singh K., Sharma A., 2002. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in health and infected dog ears. *Israel J. Vet. Med.*, 57: 145-148.
- Nakano Y., Wada M., Tani H., Sasai K., Baba E., 2005. Effect of β -thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* rezedey for canine *otitis externa*. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1243-1247.
- Nowakiewicz A., Ziółkowska G., 2013. Comparative analysis of protein profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 57: 41-46.

- Park M., Do E., Jung W.H., 2013. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology*, 41: 67-72.
- Prohic A., Kasumagic-Halilovic E., 2009. Identification of *Malassezia pachydermatis* from health and diseased human skin. *Med. Arh.*, 63: 317-319.
- Sugita T., Takeo K., Hama K., Virtudazo E., Takashima M., Nishikawa A., Kucsera J., Dorogi J., Komori S., Nakagaki K., Vollekova A., Slavikova E., Farkas V., 2005. DNA sequence diversity of intergenic spacer 1 region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med. Mycol.*, 43: 21-26.
- Teramoto H., Kumeda Y., Yokoigawa K., Hosomi K., Kozaki S., Mukamoto M., Kohda T., 2015. Genotyping and characterisation of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. *Vet. Rec. Open*, 2: e000124 doi: 10.1136/vetreco-1015-000124.
- Triana S., Ganzalez A., Ohm R.A., Wosten H.A.B., de Cock H., Restrepo S., Celis A., 2015. Draft genome sequence of the Animals and human pathogen *Malassezia pachydermatis* strain CBS 1879. *Gen. Annouc.*, 3: e01197-15.
- Tylicki A., Ziółkowska G., Bołkun A., Siemieniuk M., Czerniecki J., Nowakiewicz A., 2008. Comparative study of the activity and kinetic properties of malate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase from *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.*, 54: 734-741.
- Wang Q.M., Theelen B., Groenewald M., Bai F.Y., Boekhout T., 2014. *Moniliellomycetes* and *Malasseziomycetes*, two new classes in *Ustilagiomycotina*. *Personia-Mol. Phylogeny Evol. Fungi*, 33: 41-47.
- Watanabe S., Koike A., Kano R., Nagata M., Chen C., Hwang C., Hasegawa A., Kamata H., 2014. In vitro susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine skin with atopic dermatitis to ketokonazole and intraconazole in east Asia. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 579-581.
- Wu G., Zhao H., Li C., Rajapakse M.P., Wong W.C., Xu J. Saunders C.W., Reeder N.L., Reilman L.A. Scheynius A., Sun S., Billmyre B.R., Li W., Averette A.F., Mieczkowski p., Heitman J., Theelen B., Schröder M.S., De Sessions P.F., Butler G., Maurer-Stroh S. Boekhout T., Nagarajan N., Dawson T.L., 2015. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. *PLoS Genet.*, 11: e1005614. doi: 10.1371/journal.pgen.1005614.
- Xu J., Saunders C.W., Hu P., Grant R.A., Boekhout T., Kuramae E.E., Kronstad J.W., DeAngelis Y.M., Reeder N.L., Johnstone K.R., Leland M., Fieno A.M., Begley W.M., Sun Y., Lacey M.P., Chaudhary T., Keough T., Chu L., Sears R., Yuan B., Dawson T.L., 2007. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 18730-18735.

- Yarrow D., Ahearn D.G., 1984. *Malassezia* Baillon. [W:] The yeasts. A taxonomic study. 3ed. NJW Kroger van Rij (red.), North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1984, s. 882-885.
- Zargari A., Midgley G., Back O., Johansson S.G.O., Scheynius A., 2003. IgE-reactivity to seven *Malassezia* species. *Allergy*, 58: 306-311.
- Zawirska A., Adamski Z., 2004. Grzyby z rodzaju *Malassezia*. Nowe informacje. *Post. Dermatol. Alergol.*, 2: 97-103.

13 Dominacja gatunkowa grzybów glebowych w wybranym zbiorowisku grądu *Tilio-Carpinetum* z terenu Puszczy Białowieskiej w 2015 roku

Zofia Tyszkiewicz* / Grażyna Łaska**

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45a, 15-351 Białystok

* email: z.tyszkiewicz@pb.edu.pl, ** email: g.laska@pb.edu.pl

Streszczenie: Zbiorowiska mikroskopowych grzybów glebowych są czułym wskaźnikiem stanu ekosystemu, dlatego ich struktura i funkcje w dużej mierze zależą od warunków siedliskowych. Warunki siedliskowe kształtują się, między innymi, pod wpływem charakteru szaty roślinnej, która powstaje w określonych warunkach środowiska przyrodniczego. W związku z tym, pomiędzy zespołami grzybów glebowych a zbiorowiskami roślinnymi, powstają specyficzne relacje i zależności. Celem badań jest określenie dominacji gatunkowej grzybów zasiedlających poziom próchniczny gleby w zbiorowisku grądu *Tilio-Carpinetum* w Nadleśnictwie Białowieża. Próby do badań mikologicznych pobrano w lipcu 2015 roku. Do izolacji zbiorowisk grzybów glebowych wybrano metodę płytek glebowych Warcupa w modyfikacji Mańki. W celu określenia i porównania dominacji gatunkowej grzybów, posłużono się formułą zaproponowaną przez Trojana i Sierotę.

Wyniki badań wykazały, że badane zbiorowisko grzybów jest zróżnicowane i składa się ze 140 kolonii oraz 16 różnych gatunków grzybów *micromycetes*. Dominacja gatunkowa (związana z liczebnością) kształtuje się od 0,7% do 34%. Gatunkiem o największej frekwencji, a tym samym o największej dominacji, jest *Penicillium janczewski* Zaleski. Dużą dominacją gatunkową (na tle analizowanego zbiorowiska) cechują się również: *Absidia spinosa* Lendner, *Mortierella ramanniana* var *angulispora* (Naumov) Linnem. i *Trichoderma viride* Pers. ex Gray. Najmniejszą dominacją charakteryzują się natomiast takie gatunki, jak: *Gliocladium catenulatum* Gilm. & Abbott, *Gliomastix murorum* (Corda) Hughes., *Hormonema dematioides* Melin & Nannf., *Oidiodendron griseum* Robak i *Torulomyces lagena* Delitsch.

Słowa kluczowe: grzyby mikroskopowe, poziom próchniczny gleby, grąd subkontynentalny *Tilio-Carpinetum*

1. Wstęp

Mikroorganizmy glebowe, w tym grzyby *micromycetes*, pełnią ważną rolę w ekosystemach lądowych. Jest to niezwykle liczna i różnorodna, pod względem taksonomicznym i metabolicznym, grupa organizmów. Różnorodność zbiorowisk grzybów zasiedlających glebę związana jest z wieloma czynnikami, między innymi, wynika z bardzo zróżnicowanej poziomej i pionowej struktury przestrzennej gleby, tworzonej przez cząstki stałe, fazę ciekłą i gazową. Jest również wywołana chemicznym zróżnicowaniem związków organicznych, które występują w glebie i jednocześnie stanowią substrat dla saprofitycznych mikroorganizmów glebowych. O różnorodności mikroorganizmów glebowych decyduje też konkurencja o biogeny, a także czasowa zmienność warunków, szczególnie w wierzchnich poziomach glebowych. Nie bez znaczenia są też czynniki związane z klimatem i pogodą – ilość opadów, ich rozkład w czasie roku i temperatura (Paul, Clark 2000; Badura 2003; van Loon, Duffy 2007; Niklińska, Stefanowicz 2015).

Glebowe grzyby *micromycetes* uczestniczą w rozkładzie złożonych związków organicznych, takich jak białka, wielocukry (lignina, celuloza), tłuszcze oraz wielu innych budujących martwą materię organiczną pochodzenia roślinnego i zwierzęcego – do aminokwasów, cukrów prostych, kwasów tłuszczowych, a te – do związków nieorganicznych (Paul, Clark 2000; Więckowski 2008). Następnie produkty rozkładu materii organicznej są wykorzystywane przez rośliny do produkcji biomasy. Grzyby są również odpowiedzialne za tworzenie w ryzosferze różnorodnych asocjacji z korzeniami roślin wyższych, nawiązują też z nimi więzi symbiotyczne – typu mikoryz (Badura 2002, 2003, 2004). Pomędzy grzybami glebowymi a roślinami wyższymi powstają specyficzne relacje istotnie wpływające na wzrost i rozwój nie tylko pojedynczych gatunków, ale również całych zbiorowisk roślinnych (Badura 2004; Bogacz i in. 2004; Niklińska, Stefanowicz 2015). Działalność drobnoustrojów glebowych odgrywa ważną rolę w życiu roślin, a te w istotny sposób wpływają na rozwój drobnoustrojów. Korzenie roślin zmieniają warunki siedliska, w którym żyją, co ma ogromne znaczenie dla drobnoustrojów. Rośliny kształtują zespoły mikroorganizmów glebowych – ich strukturę ilościową i jakościową – a tym samym wpływają na przemiany mikrobiologiczne zachodzące w środowisku (Frączek 2010). Współdziałanie mikroorganizmów i roślin wyższych doprowadza do powstania pewnego rodzaju równowagi w układach biocenotycznych środowiska glebowego. Równowaga ta może być zakłócona przez każdy nowy dopływ substancji chemicznej lub gwałtowną zmianę właściwości fizyczno-chemicznych gleby (Natywa i in. 2010). Zmiany parametrów mikrobiologicznych mogą być skutkiem oddziaływania zarówno czynników naturalnych, jak i antropogenicznych. Właści-

wy stan zespołów mikroorganizmów glebowych, związany z ich aktywnością, liczebnością, czy też różnorodnością, stanowi natomiast podstawowe ogniwo w glebowych łańcuchach troficznych i jest warunkiem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania ekosystemów lądowych (Niklińska, Stefanowicz 2015). Stąd też, rozpoznanie składu zbiorowisk mikroorganizmów glebowych, jest niezbędnym i ważnym wskaźnikiem w ocenie stabilności ekologicznej ekosystemów (Dąbek-Szreniawska 2002). Celem niniejszej pracy jest poznanie zbiorowiska grzybów *micromycetes* zasiedlających przypowierzchniową warstwę gleby w grądzie *Tilio-Carpinetum* Tracz. 1962 z terenu Nadleśnictwa Białowieża w Puszczy Białowieskiej oraz określenie dominacji gatunkowej otrzymanych organizmów.

2. Teren badań

Puszcza Białowieska – jeden z największych i najlepiej zachowanych kompleksów leśnych na niżu środkowo-wschodniej Europy, w granicach Polski rozciąga się pomiędzy 23°31' a 24°21' długości geograficznej wschodniej i 52°29' a 52°57' szerokości geograficznej północnej (Sokołowski 2004). Teren Puszczy wznosi się od 134 do 202 m n.p.m. (średnio ok. 170 m n.p.m.) i przecina go granica państwowa Polski z Białorusią. Polska część po zachodniej stronie granicy zajmuje obszar o powierzchni 635 km² i leży na terenie 5 gmin (Białowieży, Narewki, Hajnówki, Dubicz Cerkiewnych i Narwi) powiatu hajnowskiego, w województwie podlaskim. Białoruska część po stronie wschodniej, określana jako Państwowy Park Narodowy, zajmuje powierzchnię 875 km² i leży w okręgach Brześć i Grodno. Na terenie Polski, ok. 105 km² obszaru Puszczy Białowieskiej, zajmuje Białowiecki Park Narodowy, z czego 57,3 km² podlega ochronie ścisłej. W Puszczy utworzono 21 rezerwatów o łącznej powierzchni 119,5 km². Pozostałą część Puszczy stanowią lasy gospodarcze zarządzane przez Lasy Państwowe, które, łącznie z rezerwatami przyrody, zajmują powierzchnię 526,9 km². Lasy te znajdują się na terenie trzech nadleśnictw: Nadleśnictwa Białowieża (126,1 km²), Browsk (204,1 km²) i Hajnówka (196,7 km²), stanowiąc Leśny Kompleks Promocyjny „Puszcza Białowieska” (Walczak i in. 2001; Okołów 2003; Sokołowski 2004).

Klimat Puszczy Białowieskiej ma charakter kontynentalny, o średniej rocznej temperaturze powietrza 6,8°C i średniej rocznych opadów 617 mm (Górniak 2000). W kompleksie puszczańskim, w odniesieniu do klimatu zachodnioeuropejskiego, obserwuje się skrócenie okresu wegetacyjnego średnio do 205 dni i wydłużenie zalegania pokrywy śnieżnej średnio do 92 dni (Sokołowski 2004).

Flora roślin naczyniowych Puszczy Białowieskiej liczy ok. 1017 gatunków, które należą do 93 rodzin i 428 rodzajów (Sokołowski 1995). Naturalny skład drzewostanu Puszczy buduje 25 rodzimych gatunków drzew, z których największy udział ma: świerk, sosna, dąb, olsza i brzoza. W stosunku do lasów Europy Wschodniej, drzewostan Puszczy Białowieskiej wyróżnia się dużym udziałem grabu i dębu, a w odróżnieniu od lasów Europy Zachodniej – brakiem buka i jawora (Sokołowski 2004).

Próbę glebową do badań mikologicznych pobrano z typowego płatu roślinnego grądu *Tilio-Carpinetum*. Zespół *Tilio-Carpinetum* Tracz. 1962 – wielogatunkowy las klonowo-lipowo-grabowy, na terenie Puszczy Białowieskiej reprezentuje kontynentalną, wschodnio-europejską postać. Na badanym terenie występuje on na gliniastej morenie dennej i świeżych siedliskach, które charakteryzują żyzne gleby brunatnoziemne, w typie gleb brunatnych. Drzewostany grądu typowego, na terenie badań są wielogatunkowe i średnio zwarte. W górującej warstwie drzew występuje klon *Acer platanoides*, dąb *Quercus robur*, jesion *Fraxinus excelsior* i świerk *Picea abies*, a w warstwie podokapowej – grab *Carpinus betulus* i lipa *Tilia cordata*. Bogato wykształconą warstwę zielną budują eutroficzne (*Stellaria holostea*, *Galeobdolon luteum*, *Galium odoratum*) i mezotroficzne gatunki grądowe (*Anemone nemorosa*) oraz grupa gatunków towarzyszących – żyznych i średnio żyznych siedlisk. Z gatunków towarzyszących, licznie jest reprezentowany *Oxalis acetosella*. Warstwa mszysta jest słabo wykształcona i budują ją głównie mchy grądowe (*Atrichum undulatum*, *Eurhynchium angustirete*).

Badaniom mikologicznym poddano próbę gleby pochodzącą z przypowierzchniowej warstwy (z głębokości 5-15 cm), pobraną w lipcu 2015 roku z grądu *Tilio-Carpinetum* w Nadleśnictwie i Obrębie Białowieża w Puszczy Białowieskiej (oddział 424B, koordynaty współrzędnych 52°42'33.50" i 23°47'29.70"). Próbę glebową pobrano z poziomu próchnicznego o ciemnoszarej barwie, którego stan uwilgotnienia – w trakcie badań terenowych – oceniono jako suchy.

3. Metody badań

Do izolacji grzybów *micromycetes* wybrano metodę płytek glebowych Warcupa (1950) w modyfikacji Mańki (Johnson, Mańka 1961; Mańka 1964; Mańka, Salomanowicz 1987). W celu określenia dominacji gatunkowej grzybów, posłużono się formułą zaproponowaną przez Trojana (1981) i Sierotę (1995):

$$D = 100 \cdot \frac{Sa}{S}$$

gdzie:

D – współczynnik dominacji

Sa – suma izolatów danego gatunku grzyba

S – suma izolatów badanego zbiorowiska grzybów glebowych

Grzyby oznaczono na podstawie cech makroskopowych i mikroskopowych, stosując standardowe klucze do oznaczania grzybów *micromycetes* (Raper, Fennell 1965; Raper i in. 1968; Domsch, Gams 1972; Domsch i in. 1981; Pitt 1991).

4. Wyniki i dyskusja

Analiza próby glebowej pochodzącej z przypowierzchniowego poziomu glebowego grądu *Tilio-Carpinetum* w Nadleśnictwie Białowieża, wskazuje na zróżnicowane zbiorowisko grzybów. Składa się ono ze 140 kolonii grzybów *micromycetes* i 16 różnych ich gatunków. Największą liczebnością cechują się: *Penicillium janeczki* Zaleski (48 izolatów) i *Mortierella ramanniana* var *angulispora* (Naumov) Linnem. (36 izolatów). Gatunki te posiadają też największą dominację gatunkową, gdyż cecha ta jest uzależniona od frekwencji: im większa jest liczba izolatów danego gatunku w zbiorowisku, tym również większa jest dominacja gatunkowa. Wynosi ona odpowiednio 34% i 26% (tab.1).

W zbiorowisku grzybów znaczną frekwencją charakteryzują się również takie gatunki, jak: *Trichoderma viride* Pers. ex Gray (13 izolatów) i *Absidia spinosa* Lendner (10 izolatów). Dominacja gatunkowa wymienionych grzybów kształtuje się na poziomie 9% i 7%. Liczebność pozostałych gatunków wynosi od 9 do 1 izolatu, a dominacja gatunkowa od 6% do 0,7%. Do gatunków o najmniejszej frekwencji, a tym samym najmniejszej dominacji gatunkowej, należą: *Gliocladium catenulatum* Gilm. & Abbott, *Gliomastix murorum* (Corda) Hughes, *Hormonema dematioides* Melin & Nannf., *Oidiodendron griseum* Robak i *Torulomyces lagenae* Delitsch (tab. 1).

4.1. Rola grzybów glebowych w zbiorowiskach grądowych

Grzyby glebowe *micromycetes* wykazują ogromną różnorodność funkcjonalną, dzięki której mogą tworzyć wielogatunkowe układy zajmujące różnorodne mikrosiedliska, mogą również wypełniać różne zadania w swoich niszach, zapewniając

tym samym sprawne funkcjonowanie ekosystemu jako całości. Innymi słowy, grzyby te stanowią ważny składnik ekosystemów lądowych, pełniąc w nich wiele istotnych funkcji (Kałużka 2008). Obecność mikroorganizmów glebowych jest czynnikiem, który wraz z szatą roślinną, określa zarówno kierunek, jak i charakter przemian biochemicznych, a także całość przemian związanych z aktywnością biologiczną i właściwościami fizykochemicznymi gleb (Paul, Clark 2000; Natywa i in. 2010). Wynikiem relacji pomiędzy grzybami a roślinami wyższymi jest specyficzny dla danego środowiska przyrodniczego stan równowagi dynamicznej (Skiba 2002). Grzyby odgrywają kluczową rolę w rozkładzie substancji organicznej dostarczanej przez szatę roślinną i są niezbędnym ogniwem w łańcuchu reakcji, których efektem, z jednej strony, jest powstawanie próchnicy, a z drugiej – mineralizacja związków organicznych (Schlegel 2000; van Loon, Duffy 2007). Wynika z tego, że podłożem dla ich rozwoju może być każda obumierająca roślina, a wiele grzybów to pierwsi kolonizatorzy substancji gromadzącej się w powierzchniowej części gleb po obumarciu roślin (Badura 2003).

Tabela 1. Frekwencja i dominacja gatunkowa grzybów zasiedlających analizowaną glebę

Gatunek grzyba	Frekwencja [szt.]	Dominacja gatunkowa [%]
<i>Penicillium janczewski</i> Zaleski	48	34
<i>Mortierella ramanniana</i> var <i>angulispora</i> (Naumov) Linnem.	36	26
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Gray	13	9
<i>Absidia spinosa</i> Lendner	10	7
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bain.	9	6
<i>Chrysosporium merdarium</i> (Link ex Grev.) Carm.	6	4
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	4	3
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Pers.) Rifai	3	2
<i>Acremonium rutilum</i> W. Gams	2	1
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	2	1
<i>Penicillium canescens</i> Scopp	2	1
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilm. & Abbott	1	0,7
<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) Hughes	1	0,7
<i>Hormonema dematioides</i> Melin & Nannf.	1	0,7
<i>Oidiodendron griseum</i> Robak	1	0,7
<i>Torulomyces lagena</i> Delitsch	1	0,7
Razem:	140	

Źródło: Opracowanie własne

Zbiorowisko grzybów *micromycetes*, zasiedlające badaną glebę grądu *Tilio-Carpinetum*, cechuje się zróżnicowaniem, zarówno ilościowym (140 kolonii), jak i jakościowym (16 gatunków). Jednak grądy to wielogatunkowe i wielowarstwowe lasy mieszane występujące na żyznych, mineralnych i optymalnie wilgotnych siedliskach (Matuszkiewicz 1981, 1993; Faliński, Pawlaczyk 1991). Są to fitocenozy o wysokiej troficzności, a gleby, na których występują, cechują się znaczną ilością materii organicznej. Dlatego też oczekiwano, że zbiorowisko grzybów zasiedlające poziom próchniczny gleby zespołu grądowego będzie posiadało większą frekwencję i będzie wyraźniej zróżnicowane jakościowo w porównaniu z uzyskanymi wynikami. Sugerowały to również wyniki wcześniej prowadzonych przez autorkę badań w zbiorowiskach grądowych (Tyszkiewicz 1999, 2001). Otrzymane rezultaty to najprawdopodobniej skutek niewielkiej ilości opadów i wysokich temperatur powietrza, które panowały w okresie poprzedzającym pobranie próby glebowej, która – w czasie poboru – była sucha. Grzyby natomiast do rozwoju potrzebują nie tylko substratu, jakim jest substancja organiczna, ale również wpływ na ich kondycję i występowanie ma wilgotność i temperatura – zarówno gleby, jak i powietrza (Paul, Clark 2000; Schlegel 2000). Borowska (1986) stwierdziła, że w okresach upalnych i suchych miesiącach letnich, rozwój grzybów mikroskopowych jest zahamowany. Grzyby *micromycetes* – to składnik biocenozy najszybciej reagujący na zmiany parametrów środowiska (Błaszczuk 2007; Frączek 2010). Dlatego też mogą być one wykorzystywane jako wskaźnik zmian środowiskowych. Każda zmiana warunków siedliska ma wpływ na zmianę struktur zbiorowisk grzybów glebowych i stosunki biotyczne panujące pomiędzy mikroorganizmami (Paul, Clark 2000; Barabasz, Voříšek 2002; Bogacz i in. 2004).

Analizowane zbiorowisko grzybów składa się z gatunków kosmopolitycznych saprotrofów posiadających umiejętność wykorzystywania łatwo rozpuszczalnych materiałów, takich jak cukry i aminokwasy. Należą do nich, między innymi, grzyby rodzaju: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, czy też *Absidia*. Grzyby te mają zdolność do szybkiego zasiedlania świeżo obumarłych organizmów wchodzących w skład materii organicznej (Wiackowski 2008). W badanym zbiorowisku występowały również grzyby odgrywające znaczącą rolę w degradacji celulozy. Należą do nich, między innymi, *Mortierella* i *Trichoderma* (Schlegel 2000). Ponadto grzyby rodzaju *Trichoderma* znane są z dużej aktywności metabolicznej. Są to gatunki o dużych zdolnościach adaptacyjnych, które występują w różnych środowiskach i cechują się szybkim tempem wzrostu (Sierota 1982). Podobnymi cechami charakteryzują się grzyby rodzaju *Glocladium*, które – podobnie jak *Trichoderma* – wykorzystywane są w biologicznej ochronie roślin, między innymi, przed fusariozami (Paavanen-Huhtala i in. 2000; Strasser i in. 2011).

Największe znaczenie w badanym zbiorowisku grzybów stwierdzono dla *Penicillium janczewski* Zaleski i *Mortierella ramanniana* var *angulispora* (Naumov) Linnem. Gatunki te cechują się również największą dominacją, co wskazuje jednocześnie na ich znaczącą rolę w zbiorowiskach grądowych.

5. Wnioski

1. Zbiorowisko grzybów zasiedlające przypowierzchniowy poziom glebowy grądu *Tilio-Carpinetum* w Nadleśnictwie Białowieża cechuje się wyraźnym zróżnicowaniem.
2. Największą dominacją gatunkową, a tym samym największym znaczeniem w zbiorowisku grzybów, cechują się: *Penicillium janczewski* Zaleski i *Mortierella ramanniana* var *angulispora* (Naumov) Linnem.

Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach prac Nr S/WBiŚ/1/14 i Nr S/WBiŚ/5/2016 oraz sfinansowano ze środków na naukę MNiSW.

Literatura

- Badura L., 2002. Mikroorganizmy w ekosystemach lądowych. [W:] Barabasz W. (red.), Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach. Wyd. Katedra Mikrobiologii AR, Kraków, 11-21.
- Badura L., 2003. Problemy mikrobiologii gleby. Rocz. Glebozn., 54 (1/2): 5-11.
- Badura L., 2004. Bioróżnorodność i jej znaczenie w funkcjonowaniu ekosystemów. Rocz. Glebozn., 55 (1): 39-51.
- Barabasz W., Voříšek K., 2002. Bioróżnorodność mikroorganizmów w środowisku glebowym. [W:] Barabasz W. (red.). Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach. Wyd. Katedra Mikrobiologii AR, Kraków, 23-34.
- Błaszczak M.K., 2007. Mikroorganizmy w ochronie środowiska. PWN, Warszawa.
- Borowska A., 1986. Grzyby (Mycota). PWN, Warszawa-Kraków.
- Bogacz A., Szulc A., Bober A., Płaskowska E., Matkowski K., 2004. Wpływ stopnia zmurzenia torfu na skład i liczebność grzybów glebowych obiektu Przedmoście. Rocz. Glebozn., 55 (3): 39-51.
- Dąbek-Szreniawska M., 2002. Kierunki i perspektywy badań mikrobiologicznych gleb i roślin. Acta Agroph., 78: 13-24.

- Domsch K.H., Gams W., 1972. Fungi in agricultural soil. Longman Group Limited, London.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H., 1981. Compendium of soil fungi. Academic Press, London.
- Faliński J.B., Pawlaczyk P., 1991. Zarys ekologii. [W:] Białobok S. (red.), Lipy – *Tilia* L. Nasze drzewa leśne, 15. Agencja Arkadia, Poznań, 145-247.
- Frączek K., 2010. Skład mikrobiocenotyczny drobnoustrojów biorących udział w procesach przemian azotu w glebie w otoczeniu składowiska odpadów komunalnych. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 10: 61-71.
- Górniak A., 2000. Klimat województwa podlaskiego. Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej, Białystok.
- Johnson L.F., Mańka K., 1961. A modification of Warcup's soil-plate method for isolating soil fungi. Soil Sci., 92: 79-84.
- Kałużka I., 2008., Analiza ilościowa zbiorowisk grzybów makroskopowych na podstawie obserwacji owocników. [W:] Mułenko W. (red.), Mykologiczne badania terenowe. Przewodnik metodyczny. Wyd. UMCS, 76-98.
- Mańka K., 1964. Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn., PTPN, 17: 29-45.
- Mańka K., Salmanowicz B., 1987. Udoskonalenie niektórych technik zmodyfikowanej metody płytek glebowych do izolowania grzybów z gleby z punktu widzenia mikologii fitopatologicznej. Rocz. Nauk Roln., 17: 35-46.
- Matuszkiewicz J.M., 1981. Potencjalne zbiorowiska roślinne i potencjalne fitokompleksy krajobrazowe północnego Mazowsza. Monogr. Bot., 62: 3-78.
- Matuszkiewicz J.M., 1993. Krajobrazy roślinne i regiony geobotaniczne Polski. PAN, Inst. Geogr. Zagosp. Przestrzenn., Prace Geogr., 158: 1-107.
- Natywa M., Sawicka A., Wolna-Murawka A., 2010. Aktywność mikrobiologiczna i enzymatyczna gleby pod uprawą kukurydzy w zależności od zróżnicowanego nawożenia azotem. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 10: 111-120.
- Niklińska M., Stefanowicz A.M., 2015. Mikroorganizmy glebowe na terenach metalonowych. [W:] Wierzbińska M. (red.). Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale. Wyd. Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, 207-225.
- Okołów C., 2003. Ochrona przyrody w polskiej części Puszczy Białowieskiej. [W:] de Bruijn O., Kozulko, G., Okołów Cz. (red.), Puszcza Białowieska w trzecim tysiącleciu. Wyzwania stojące przed ochroną przyrody i zrównoważonym rozwojem. Materiały z konferencji transgranicznej zorganizowanej w Kamieniukach (Białoruś) i Białowieży (Polska) w dniach 27-29.06.2000, Północnopodlaskie Towarzystwo Ochrony Ptaków, Białystok, 33-36.
- Paul E.A., Clark F.E., 2000. Mikrobiologia i biochemia gleb. Wyd. Uniwersytet M. Curie Skłodowska, Lublin.

- Paavanen-Huhtala S., Avikainen H., Yli-Mattila T., 2000. Development of Strain-specific Primers for a Strain of *Gliocladium catenulatum* Used in Biological Control. European J. Plant Pathol., 106: 187-198.
- Pitt J.I.A., 1991. Laboratory guide to common *Penicillium* species. Nord Ryde. N.S.W., Australia.
- Raper K.B., Fennell D.J., 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Raper K.B., Thom Ch, Fennell D.J., 1968. A manual of the *Penicillia*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Schlegel H.G., 2000. Mikrobiologia ogólna. PWN, Warszawa.
- Sierota Z., 1982. Wpływ niektórych soli mineralnych na rozwój *Trichoderma viride in vitro*. Pr. Inst. Bad. Leśn., 612: 1-13.
- Sierota Z., 1995. Rola grzyba *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Jülich w ograniczaniu huby korzeni w drzewostanie sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na gruntach porolnych. Rozprawa habilitacyjna, Prace IBL, 810.
- Skiba S., 2002. Gleba w środowisku przyrodniczym. [W:] Barabasz W. (red.), Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach. Wyd. Katedra Mikrobiologii AR, Kraków, 157-167.
- Sokołowski A.W., 1995. Flora roślin naczyniowych Puszczy Białowieskiej. Białowiecki Park Narodowy, Białowieża.
- Sokołowski A.W., 2004. Lasy Puszczy Białowieskiej. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa.
- Strasser H., Hutwimmer S., Burgstalle W., 2011. Metabolite Toxicology of Fungal Biocontrol Agents. [W:] Ehlers R. (red.), Regulation of Biological Control Agents. Online, 191-213.
- Trojan P., 1981. Ekologia ogólna. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Tyszkiewicz Z., 1999. Soil fungi communities from broadleaved forests with different phytocenoses (*Tilio-Carpinetum typicum* and *Pinus-Laniastrum*) and disease threat to natural tree regeneration. Phytopathol. Pol., 17: 109-110.
- Tyszkiewicz Z., 2001. Zbiorowiska grzybów glebowych i ich wpływ na kształtowanie się zdrowotności naturalnych odnowień dwóch różnych grądów. Zesz. Nauk. Politechniki Białostockiej, 12: 121-141.
- Walczak M., Radziejowski J., Smogorzewska M., Sienkiewicz J., Gacka-Grzesikiewicz E., Pisarski Z., 2001. Obszary Chronione w Polsce. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Warcup J.H., 1950. The soil plate method for isolation of fungi from soil. Nature, 166: 117-118.
- Van Loon G.W., Duffy S. J., 2007. Chemia środowiska. PWN, Warszawa.
- Wiackowski S., 2008. Ekologia ogólna. Oficyna Wydaw. Branta, Bydgoszcz-Kielce.

14 Porosty Choroszczy w województwie podlaskim

Anna **Matwiejuk***

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Ekologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

* email: matwiej@uwb.edu.pl

Streszczenie: Celem pracy jest przedstawienie dokumentacji lichenologicznej obrazującej bioróżnorodność bioty porostów na terenie Choroszczy, z uwzględnieniem uwarunkowań siedliskowych poszczególnych gatunków. Praca przedstawia listę 74 gatunków porostów odnotowanych w mieście. Porosty rosną na korze drzew i krzewów (39 gatunków), kamieniach i betonie (33), martwym drewnie (22), metalu (10), glebie (5), mszakach (3) i eternicie (1). Wśród nich, 8 gatunków umieszczonych jest na *Czerwonej liście porostów w Polsce* i 6 objętych jest ochroną prawną.

Słowa kluczowe: grzyby zlichenizowane, miasto, zagrożenia

1. Wstęp

Miasta stanowią interesujący obiekt badań, o czym świadczą liczne publikacje dotyczące porostów w wielu miejscowościach w Europie (np. Skye 1968; Nimis i in. 1988; Munzi i in. 2007; Gottas 2002) i w Polsce (np. Fałtynowicz i in. 1991; Kepel 1999; Izydorek 2005; Kubiak 2005; Matwiejuk 2007; Kubiak, Kukwa 2008; Łubek 2010; Adamska 2012; Juźwin i in. 2012). Na terenie województwa podlaskiego zbadano biotę porostów wielu miast: Białegostoku (Matwiejuk 2007), Ciechanowca (Matwiejuk, Kolanko 2007), Drohiczyna (Matwiejuk 2009b), Sokółki (Matwiejuk, Kałuska 2014), Supraśla (Matwiejuk 2015a), Łomży (Matwiejuk, Chojnowska 2016) i wsi: Mielnika (Matwiejuk 2008), Bociek (Matwiejuk 2009a), Białowieży (Matwiejuk 2011), Narwi (Matwiejuk, Korobkiewicz 2012), Klewinowa (Kiercul 2013a), Krynickie (Kiercul 2013b), Tryczówki (Kiercul 2014), Nowosady (Kiercul 2015a), Hermanówki (Kiercul 2015b), Janowicze (Kiercul 2015c).

Miasto Choroszcz, położone w województwie podlaskim, niedaleko od Narwiańskiego Parku Narodowego, stanowi interesujący obszar badawczy. Od 2015 roku na obszarze Choroszczy prowadzone są badania lichenologiczne. Biota porostów Choroszczy nie posiada dotychczas całościowego opracowania. Jedynie Matwiejuk (2015b) wymienia kilkadziesiąt gatunków porostów z parku pałacowego w Choroszczy.

Celem pracy jest przedstawienie dokumentacji lichenologicznej obrazującej bioróżnorodność bioty porostów na terenie Choroszczy, z uwzględnieniem warunków siedliskowych poszczególnych gatunków. W trakcie realizacji głównego celu, dokonano analizy następujących zagadnień: zróżnicowania gatunkowego grzybów zlichenizowanych, udziału poszczególnych grup ekologicznych, udziału gatunków specjalnej troski oraz przedstawiono udział porostów w różnych rejonach miasta.

2. Teren badań

Miasto Choroszcz (53°08'35"N 22°59'20"E) jest położone w środkowej części województwa podlaskiego, na Nizinie Północnopodlaskiej, na terenie Wysoczyzny Białostockiej (Kondracki 2011). Badany teren, pod względem geobotanicznym, usytuowany jest w Dziale Północno Mazursko-Białoruskim, w Krainie Północnopodlaskiej, w Podkrajnie Białostocko-Wołkowyskiej, w Okręgu Puszczy Knyszyńskiej (Matuszkiewicz 2008). Przez miasto przepływa rzeka Horodnianka, prawy

dopływ Narwi. Obszar, na którym rozpościera się miasto, cechuje się elementami klimatu kontynentalnego umiarkowanego ciepłego i klimatu umiarkowanego wilgotnego (Górniak 2000). Miasto Choroszcz zajmuje powierzchnię 16,79 km² i zamieszkuje ją 5 795 mieszkańców. Współczesna infrastruktura miasta składa się z zabudowań domów jednorodzinnych oraz bloków. W centrum miasta obecne są zabudowania drewniane, jednak dominują zabudowania murowane. Zieleń miejska Choroszczy zajmuje powierzchnię ok. 1,39 ha (Danowski 2004). Na tereny zielone miasta składają się: park pałacowy Jana Klemensa i Izabeli Branickich, skwery, cmentarz żydowski, cmentarz miejski i drzewa przydrożne.

3. Materiał i metody

Badania terenowe przeprowadzono w latach 2015-2016 na terenie miasta Choroszcz, na 41 stanowiskach. Spisy lichenologiczne i materiał zbierane były przy użyciu metody marszrutowej.

Porosty oznaczono stosowanymi w lichenologii metodami standardowymi, na podstawie analizy morfologiczno-anatomicznej oraz testów barwnych. Taksony krytyczne poddano chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (Orange i in. 2001) w celu identyfikacji wtórnych metabolitów porostowych i były to rodzaje: *Lepraria* i *Rhizocarpon* oraz porosty z grupy *Cladonia chlorophaea* – *pyxidata*. Nomenklaturę gatunków przyjęto według Diedericha i in. (2016), z wyjątkiem następujących taksonów: *Circinaria calcarea* (Nordin i in. 2010), *Calogaya decipiens*, *C. pusilla*, *Flavoplaca citrina*, *F. oasis*, *Polycauliona polycarpa*, *Rusavskia elegans* (Arup i in. 2013) oraz *Myriolecis albescens*, *M. dispersa*, *M. hagenii* (Zhao Xin i in. 2015). Znajdujący się w omówieniu wyników wykaz gatunków zagrożonych wraz ze statusem ich zagrożenia, został sporządzony na podstawie Czerwonej listy porostów w Polsce (Cieśliński i in. 2006), natomiast wykaz gatunków podlegających ochronie prawnej, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska (Rozporządzenie 2014).

Niezbędny do identyfikacji materiał zielnikowy znajduje się w Zielniku Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku.

4. Wyniki

W wyniku przeprowadzonych badań na terenie miasta Choroszcz, stwierdzono 74 gatunki porostów, należące do 39 rodzajów. Najliczniej reprezentowane są rodzaje: *Lecanora* (11 gatunków), *Physcia* (6), *Cladonia* (4).

WYKAZ GATUNKÓW:

- Acarospora fuscata* (Schrad.) Th. Fr. – konstrukcje kamienne
Bilimbia sabuletorum (Schreb.) Arnold – mszaki
Buellia punctata (Hoffm.) A. Massal. – kora *Fraxinus excelsior*
Calogaya decipiens (Arnold) Arup, Frödén & Søchting – konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane
Calogaya pusilla (A. Massal.) Arup, Frödén & Søchting – konstrukcje betonowe
Candelariella aurella (Hoffm.) Zahlbr. – konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe
Candelariella vitellina (Hoffm.) Müll. Arg. – konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe
Candelariella xanthostigma (Ach.) Lettau – kora *Betula pendula*, *Crataegus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Salix alba*, *Sorbus aucuparia*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*
Circinaria calcarea (L.) A. Nordin, Savić & Tibell – konstrukcje: betonowe, kamienne
Cladonia coniocraea (Flörke) Spreng., nom. cons. – konstrukcje drewniane, gleba
Cladonia fimbriata (L.) Fr. – kora *Tilia cordata*, gleba
Cladonia chlorophaea (Sommerf.) Spreng. – konstrukcje drewniane, gleba
Cladonia glauca Flörke – gleba
Evernia prunastri (L.) Ach. – kora *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Populus nigra*, *Tilia cordata*, konstrukcje drewniane
Flavoparmelia caperata (L.) Hale – kora *Fraxinus excelsior*
Flavoplaca citrina (Hoffm.) Arup, Frödén & Søchting – konstrukcje betonowe
Flavoplaca oasis (A. Massal.) Arup, Frödén & Søchting – konstrukcje: betonowe, drewniane
Hypocenomyce scalaris (Ach.) M. Choisy – kora *Betula pendula*, *Pinus sylvestris*, konstrukcje drewniane
Hypogymnia physodes (L.) Nyl. – kora *Betula pendula*, *Larix decidua*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, konstrukcje drewniane, mszaki
Hypogymnia tubulosa (Schaer.) Hav. – kora *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*
Lecanora allophana Nyl. – kora *Fraxinus excelsior*
Lecanora carpinea (L.) Vain. – kora *Crataegus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Salix caprea*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*
Lecanora chlorotera Nyl. – kora *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior*

Lecanora conizaeoides Cromb. – kora *Pinus sylvestris*
Lecanora crenulata Hook. – konstrukcje betonowe
Lecanora expallens Ach. – kora *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior*
Lecanora polytropa (Hoffm.) Rabenh. – konstrukcje: betonowe, drewniane
Lecanora pulicaris (Pers.) Ach. – kora *Fraxinus excelsior*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*
Lecanora rupicola (L.) Zahlbr. subsp. *rupicola* – konstrukcje kamienne
Lecanora symmicta (Ach.) Ach. – kora *Fraxinus excelsior*
Lecanora varia (Hoffm.) Ach. – konstrukcje drewniane
Lecidella elaeochroma (Ach.) M. Choisy – kora *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Salix caprea*
Lecidella stigmathea (Ach.) Hertel & Leuckert – konstrukcje betonowe
Lepraria elobata Tønsberg – kora *Fraxinus excelsior*, *Tilia platyphyllos*
Lepraria incana (L.) Ach. – kora *Acer platanoides*, *Alnus glutinosa*, *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior*, *Pinus sylvestris*, *Salix caprea*, *Tilia cordata*
Melanelixia fuliginosa (Duby) O. Blanco & al. – konstrukcje kamienne
Melanelixia glabrata (Lamy) Sandler & Arup – kora *Larix decidua*, *Tilia cordata*
Melanohalea exasperatula (Nyl.) O. Blanco & al. – kora *Carpinus betulus*, konstrukcje betonowe
Micarea denigrata (Fr.) Hedl. – konstrukcje drewniane
Myriolecis albescens (Hoffm.) Śliwa, Zhao Xin & Lumbsch – konstrukcje betonowe
Myriolecis dispersa (Pers.) Śliwa, Zhao Xin & Lumbsch – konstrukcje: betonowe, drewniane, metalowe
Myriolecis hagenii (Ach.) Śliwa, Zhao Xin & Lumbsch – kora *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Salix caprea*
Parmelia sulcata Taylor – kora *Acer pseudoplatanus*, *Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Crataegus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Padus avium*, *Quercus robur*, *Salix alba*, *S. caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*, konstrukcje drewniane
Parmelina tiliacea (Hoffm.) Ach. – kora *Fraxinus excelsior*
Peltigera rufescens (Weiss) Humb. – mszaki
Pertusaria coccodes (Ach.) Nyl. – kora *Tilia cordata*
Phaeophyscia nigricans (Flörke) Moberg – konstrukcje betonowe
Phaeophyscia orbicularis (Neck.) Moberg – kora *Acer pseudoplatanus*, *Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Cerasus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Picea pungens*, *Populus tremula*, *Prunus padus*, *Quercus robur*, *Robinia pseudacacia*, *Salix caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Syringa vulgaris*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*, konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe, kamienie, suche gałęzie i martwe pnie drzew
Phlyctis argena (Spreng.) Flot. – kora *Acer platanoides*, *Fraxinus excelsior*, *Padus avium*, *Populus nigra*, *Salix caprea*, *Tilia cordata*, konstrukcje kamienne

Physcia adscendens H. Olivier – kora *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Pinus sylvestris*, *Populus tremula*, *Prunus domestica*, *Rhus typhina*, *Salix alba*, *S. caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe, kamienie, suche gałęzie i martwe pnie drzew

Physcia aipolia (Humb.) Fűrnr. – kora *Acer pseudoplatanus*

Physcia caesia (Hoffm.) Fűrnr. – konstrukcje: betonowe, metalowe, kamienne

Physcia dubia (Hoffm.) Lettau var. ***dubia*** – kora *Acer pseudoplatanus*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Crataegus* sp., *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Prunus padus*, *Salix caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Syringa vulgaris*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*, konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe

Physcia stellaris (L.) Nyl. – kora *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Sorbus aucuparia*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, konstrukcje drewniane

Physcia tenella (Scop.) DC. – kora *Betula pendula*, *Larix decidua*, *Padus avium*

Physconia enteroxantha (Nyl.) Poelt – kora *Acer platanoides*, *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, *Tilia cordata*

Physconia grisea (Lam.) Poelt – kora: *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Robinia pseudacacia*, *Salix alba*, *Sorbus aucuparia*, *Tilia cordata*

Polycauliona polycarpa (Hoffm.) Frödén, Arup & Söchting – kora *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Picea pungens*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, konstrukcje: drewniane, metalowe, suche gałęzie i martwe pnie drzew

Porpidia crustulata (Ach.) Hertel & Knoph – konstrukcje kamienne

Protoparmeliopsis muralis (Schreb.) M. Choisy – konstrukcje: betonowe, kamienne, drewniane, metalowe, eternit

Ramalina farinacea (L.) Ach. – kora *Fraxinus excelsior*, *Salix caprea*, *Tilia cordata*

Ramalina fraxinea (L.) Ach. – kora *Salix caprea*, *Tilia cordata*

Ramalina pollinaria (Westr.) Ach. – kora *Tilia cordata*, konstrukcje kamienne

Rusavskia elegans (Link) S.Y. Kondr. & Kärnefelt – konstrukcje betonowe

Rhizocarpon distinctum Th. Fr. – konstrukcje kamienne

Sarcogyne regularis Körb. – konstrukcje betonowe

Scoliciosporum chlorococcum (Stenh.) Vězda – kora *Alnus glutinosa*, *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior*, *F. pennsylvanica*, *Populus tremula*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*, *Ulmus laevis*, *U. minor*

Trapeliopsis flexuosa (Fr.) Coppins & P. James – konstrukcje drewniane

Trapeliopsis granulosa (Hoffm.) Lumbsch – gleba

Verrucaria muralis Ach. – konstrukcje betonowe

Verrucaria nigrescens Pers. – konstrukcje: betonowe, kamienie

Xanthoparmelia conspersa (Ach.) Hale – konstrukcje kamienne

Xanthoparmelia loxodes (Nyl.) O. Blanco & al. – konstrukcje kamienne

Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. – kora *Acer pseudoplatanus*, *Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Cerasus* sp, *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Ligustrum vulgare*, *Picea pungens*, *Populus tremula*, *Prunus domestica*, *P. padus*, *Quercus robur*,

Rhus typhina, *Robinia pseudacacia*, *Salix alba*, *S. caprea*, *Sorbus aucuparia*, *Syringa vulgaris*, *Thuja occidentalis*, *Tilia cordata*, *T. platyphyllos*, konstrukcje: betonowe, drewniane, kamienne, metalowe, kamienie, suche gałęzie i martwe pnie drzew.

Porosty nadrzewne. Epifity są dominującą grupą siedliskową na terenie Choroszczy. Znaczne zróżnicowanie gatunkowe drzew i krzewów (32 gatunków) jest przyczyną dużego zróżnicowania porostów nadrzewnych (39 gatunków), z czego 25 to epifity wyłącznie zasiedlające to podłoże. Ich notowania pochodzą z kory drzew rosnących w parku pałacowym, na skwerach, cmentarzach, przy drogach, w obrębie zabudowań. Biota porostów drzew liściastych (38 gatunków) jest bardziej zróżnicowana pod względem ilościowym niż forofitów iglastych (16). Wspólnych gatunków wyłącznych, występujących zarówno na korze drzew liściastych i iglastych, jest 4. Są to: *Hypogymnia tubulosa*, *Lecanora pulicaris*, *Melanelixia glabrata* i *Physcia tenella*. Porostów epifitycznych rosnących wyłącznie na korze drzew liściastych jest 18 gatunków, między innymi: *Candelariella xanthostigma*, *Flavoparmelia caperata*, *Physcia aipolia*, *Physconia enteroxantha*, *P. grisea*, *Ramalina farinacea* i *R. fraxinea*.

Najbogatszą biotą porostów charakteryzują się: *Fraxinus excelsior* (28 gatunków) oraz *Tilia cordata* (22). Wśród drzew iglastych dominuje *Larix decidua*, na korze którego wykazano obecność 9 gatunków.

Porosty naskalne. Podłoże skalne kolonizują 33 gatunki, 17 z nich wyłącznie. Dominują porosty zasiedlające antropogeniczne podłoża, zasobne w węglan wapnia (24 gatunki). Sztuczne substraty skalne, jak betonowe konstrukcje (słupy, mury, ogrodzenia, krawężniki) są wszechobecne na terenach zurbanizowanych. Na podłożach naturalnych, którymi są kamienie znajdujące na peryferiach miasta lub wykorzystywane do budowy ogrodzeń, nagrobków, występuje 20 gatunków. Dwa gatunki (*Circinaria calcarea*, *Verrucaria nigrescens*) odnotowano na obu typach podłoża.

Porosty martwego drewna. W trakcie badań stwierdzono występowanie 22 gatunków zasiedlających martwe drewno, w tym tylko trzy gatunki wyłącznie dla tego substratu. Są to: *Lecanora varia*, *Micarea denigrata* i *Trapeliopsis flexuosa*. Na terenie miasta porosty epiksyliczne zasiedlają podłoża pochodzenia naturalnego (suche gałęzie, obumierające pnie drzew, próchniejące pniaki) i antropogenicznego (ławki, poręcze, płoty, krzyże). Na podłożach naturalnego pochodzenia stwierdzono tylko cztery gatunki, a na konstrukcjach drewnianych – 22. Większość gatunków to porosty pospolite, notowane również na innych podłożach, głównie na korze drzew, jak i podłożu skalnym. Są to: *Flavoplaca oasis*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *Xanthoria parietina* i inne. Na martwym drewnie stwier-

dzono występowanie porostów naskalnych: *Calogaya decipiens*, *Myriolecis dispersa*, *Protoparmeliopsis muralis*.

Porosty naziemne. Na terenie miasta odnotowano pięć gatunków zasiedlających glebę. Wśród nich dominują gatunki z rodzaju *Cladonia*. Rosną one na terenie otwartym na murawie piaskowej, w peryferyjnej części miasta.

Porosty rosnące na mszakach. Na mszakach odnotowano trzy gatunki porostów, w tym dwa wyłączne *Bilimbia sabuletorum* i *Peltigera rufescens*.

Porosty nietypowych podłoży. Na badanym terenie odnotowano 10 gatunków porostów rosnących na nietypowych podłożach, w tym na konstrukcjach metalowych, np. płotach, krzyżach (10) i eternicie (1). Często tworzą one populacje złożone z kilku gatunków. Są wśród nich pospolite gatunki, jak: *Candelariella aurella*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *P. caesia*, *P. dubia*, *Polycauliona polycarpa*, *Protoparmeliopsis muralis*. Wiele z nich zasiedla również inne podłoża, takie jak: beton, korę drzew i martwe drewno.

Udział porostów w różnych rejonach miasta. Stwierdzono różnice w rozmieszczeniu porostów w różnych rejonach miasta. Największe zróżnicowanie gatunkowe porostów odnotowano na terenach zielonych – 54 gatunki, a najmniejsze w centrum – 27. Swoistą enklawę porostów w Choroszczy stanowi park pałacowy Letniej Rezydencji Branickich. Na jego terenie zaobserwowano 53 gatunki porostów. W parku najczęstszymi podłożami dla porostów są kora drzew liściastych oraz betonowe konstrukcje (Matwiejuk 2015b).

Udział porostów specjalnej troski. Wartość przyrodniczą miasta Choroszcz podkreśla obecność sześciu gatunków porostów objętych ochroną prawną, w tym dwóch objętych ochroną ścisłą – *Parmelina tiliacea*, *Ramalina fraxinea* i czterech ochroną częściową – *Flavoparmelia caperata*, *Hypogymnia tubulosa*, *Ramalina farinacea*, *R. pollinaria* (Rozporządzenie 2014). Większość z nich zasiedla korę drzew liściastych (*Fraxinus excelsior*, *Tilia cordata* i *Salix caprea*). Jeden gatunek stwierdzono na podłożu skalnym. Jest to krzaczkowata plecha *Ramalina pollinaria*. Porosty chronione rosną najczęściej w postaci pojedynczych plech, których kondycja jest dobra. Enklawami występowania tych porostów na terenie Choroszczy są park pałacowy oraz cmentarz. Mniej licznie porosty specjalnej troski występują w peryferyjnych częściach miasta i na drzewach przydrożnych. Wśród porostów chronionych dominują porosty krzaczkowate z rodzaju *Ramalina* oraz porosty listkowate: *Hypogymnia tubulosa*, *Flavoparmelia caperata* i *Parmelina tiliacea*.

Na badanym terenie odnotowano osiem gatunków porostów umieszczonych na Czerwonej liście porostów w Polsce (Cieśliński i in. 2006), w tym dwa gatunki w kategorii wymierające (EN) – *Flavoparmelia caperata* i *Ramalina fraxinea*, trzy

w kategorii narażone (VU) – *Parmelina tiliacea*, *Ramalina farinacea* i *R. pollinaria* oraz trzy w kategorii bliskie zagrożenia (NT) – *Evernia prunastri*, *Pertusaria cocco-des* i *Physcia aipolia*. Najbardziej zagrożoną grupą porostów są epifity. Zasiedlają one 6 gatunków drzew (*Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Larix decidua*, *Populus nigra*, *Salix caprea*, *Tilia cordata*) oraz martwe drewno, np. suche gałęzie i konstrukcje kamienne, np. nagrobki.

5. Dyskusja i wnioski

Miarą różnorodności biologicznej lichenobioty jest liczba gatunków porostów stwierdzonych na badanym terenie. Lista gatunków grzybów zlichenizowanych Choroszczy obejmuje 74 gatunki. Na tle innych, porównywalnych obiektów w województwie podlaskim, zróżnicowanie gatunkowe porostów miasta należy uznać za niskie. Ogólna liczba gatunków (74) jest mniejsza do stwierdzonych w podobnych badanych miejscowościach na Podlasiu, gdzie stwierdzono odpowiednio: w Drohiczyń (Matwiejuk 2009b) – 86 gatunków, w Supraślu (Matwiejuk 2015a) – 89, w Mielniku (Matwiejuk 2008) – 91, w Narwi (Matwiejuk, Korobkiewicz 2012) – 97, w Ciechanowcu (Matwiejuk, Kolanko 2007) – 114, w Boćkach (Matwiejuk 2009a) – 118. W porównaniu do wyników inwentaryzacji przeprowadzonej na terenie dziewięciu miast polskiego wybrzeża (Izydorek 2005), liczba gatunków porostów występujących w Choroszczy jest wyższa niż w Międzyzdrojach – 68, Kołobrzegu – 66, Władysławowie – 59, Darłowie-DarłóWKu – 52 oraz Helu – 46.

Biota porostów dużych aglomeracji miejskich w Europie szacowana jest na 100 do 200 gatunków, np. Sztokholmu (Skye 1968), Rzymu (Nimis i in. 1988, Munzi i in. 2007), Salzburga (Gottas 2002). Największą liczbę gatunków tych organizmów wśród miast Polski podali: Kubiak (2005) oraz Kubiak, Kukwa (2008) z Olsztyna – 294, Łubek (2010) z Kielc – 240, Adamska (2012) z Torunia – 195, Kepel (1999) z Poznania – 178, Matwiejuk (2007) z Białegostoku – 154.

Porosty w Choroszczy odnotowano na różnorodnych typach podłoża. Dostępność i różnorodność tych substratów jest wyznacznikiem różnorodności składu gatunkowego. W lichenobiocie miasta dominującą grupę stanowią porosty nadrzewne (39 gatunków); podobnie jak w innych miejscowościach w województwie podlaskim, gdzie na korze drzew odnotowano, odpowiednio: w Białowieży (Matwiejuk 2011) – 68 gatunków, w Boćkach (Matwiejuk 2009a) – 57, w Ciechanowcu (Matwiejuk, Kolanko 2007) – 55, Mielniku (Matwiejuk 2008) – 47, Narwi (Mat-

wiejuk, Korobkiewicz 2012) – 46, Drohiczyń (Matwiejuk 2009b) – 43, w Krynickich – 39 (Kiercul 2013b), Nowosadach (Kiercul 2015a) – 27, Hermanówce (Kiercul 2015b) – 26. Tak znaczna różnorodność gatunkowa tych roślin oraz obfitość występowania wynika ze zróżnicowanych warunków siedliskowych, dużego zagęszczenia i zróżnicowania gatunkowego forofitów w miastach. Wieloletnie badania prowadzone w miastach na polskim wybrzeżu Bałtyku (Izydorek 2005) oraz w Karpaczu (Juźwin i in. 2012) udokumentowały również znaczny udział porostów epifitycznych. Należy zwrócić uwagę, że trzon epifitycznej bioty w miastach położonych w różnych rejonach Polski stanowią pospolite gatunki porostów pyło- i azotolubnych, o plechach listkowatych, np. *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *P. tenella*, *Polycauliona polycarpa* i *Xanthoria parietina*.

Wśród porostów naskalnych, najliczniej reprezentowaną grupą siedliskową, są porosty wapieniolubne, związane z betonem. Są one rozpowszechnione, zwłaszcza w strefie miejskiej. Do najpospolitszych należą: *Calogaya decipiens*, *C. pusilla*, *Candelariella aurella*, *Myriolecis albescens*, *M. dispersa*, *Phaeophyscia orbicularis* i *Xanthoria parietina*. Często pokrywają duże powierzchnie, zwłaszcza na tynkach starzych domów, murach i słupach.

Lichenobiota epigeiczna Choroszczy jest uboga (tylko 5 gatunków) z powodu braku siedlisk dla rozwoju porostów naziemnych. Dla porównania, w Toruniu (Adamska 2012), na obszarach leśnych i w licznych murawach napiaskowych, stwierdzono 53 gatunki. Największe zróżnicowanie gatunkowe porostów naziemnych w miejscowościach na Podlasiu stwierdzono w Boćkach (Matwiejuk 2009a) – 31 gatunków i w Ciechanowcu (Matwiejuk, Kolanko 2007) – 22.

Wiele miast w Polsce charakteryzuje duży udział zieleni wysokiej, w tym obszarów leśnych, co wyraźnie zwiększa udział ogólnej liczby gatunków porostów miasta. Tereny zielone w Choroszczy to głównie park pałacowy, skwery i cmentarze, brak jest na terenie miasta kompleksów leśnych. Dla porównania, wyłącznie na terenach leśnych w Toruniu (Adamska 2012) wystąpiły 44 gatunki, a w Olsztynie (Kubiak 2005) – 39. Lasy w tych miastach są siedliskiem występowania gatunków uznanych za wskaźniki niżowych lasów puszczańskich w Polsce.

Na terenie Choroszczy największe zróżnicowanie gatunkowe porostów zaobserwowano w parku pałacowym (Matwiejuk 2015b). Parki, szczególnie te stare, zabytkowe, ze względu na wiekowe drzewostany, skalne mury budynków, konstrukcje betonowe są również miejscem występowania rzadkich i zagrożonych gatunków porostów. Mimo niewielkich powierzchniowo obszarów, różnorodności siedlisk i forofitów, biota porostów parków jest duża (Czarnota 1994, Kolanko, Matwiejuk 2007, Matwiejuk 2015b).

Obszary miejskie charakteryzuje znaczący udział gatunków uznanych za lokalnie bardzo rzadkie i rzadkie, w tym występujące na terenie badań na pojedynczych stanowiskach. Fakt ten odnotowano nie tylko w Choroszczy, ale także w innych miastach Podlasia i Polski. Według Kepela (1999), w Poznaniu gatunki stwierdzone tylko na jednym stanowisku stanowią 30% bioty porostów, podobnie jak w Białymstoku (Matwiejuk 2007) i w Choroszczy, a także w Toruniu (Adamska 2012) – 38%. Porostami najczęściej notowanymi na terenie Choroszczy są gatunki określane jako lokalnie pospolite i są to: *Flavoplaca citrina*, *Myriolecis dispersa*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *Xanthoria parietina*. W Toruniu do grupy gatunków pospolitych Adamska (2012) zaliczyła również *Hypogymnia physodes*, *Lecanora conizaeoides*, *Physcia tenella*. Podobnie Kepel (1999), w Poznaniu, wśród gatunków pospolitych, wymienił głównie kalcyfilne porosty epilityczne, między innymi: *Calogaya decipiens*, *Candelariella aurella*, *Flavoplaca citrina*.

Bardzo cenną wskazówką na temat jakości środowiska przyrodniczego jest udział gatunków zagrożonych, które znalazły się na *Czerwonej liście porostów w Polsce* (Cieśliński i in. 2006). Jest to grupa, która stanowi najcenniejszy element bioty porostów analizowanego obszaru. Terenem o szczególnych walorach przyrodniczych w Choroszczy jest park pałacowy, gdzie odnotowano ok. 90% wszystkich gatunków zagrożonych w mieście (Matwiejuk 2015b).

Wydaje się, iż uzyskane wyniki są w znacznej mierze reprezentatywne i dają wymierny obraz stanu zachowania tej grupy organizmów na obszarze Choroszczy.

Literatura

- Adamska E., 2012. Biota porostów Torunia na tle warunków siedliskowych miasta. Wyd. Nauk. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.
- Arup U., Søchting U., Frödén P., 2013. A new taxonomy of the family Teloschistaceae. *Nordic J. Bot.*, 31.1: 16-83.
- Cieśliński S., Czyżewska K., Fabiszewski J., 2006. Red list of the lichens in Poland. [W:] Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szeląg Z.W. (red.), *Red List of Plants and Fungi in Poland*. Szafer Institute of Biology, PAS, Krakow, 71-90.
- Czarnota P., 1994. Porosty zabytkowego parku dworskiego w Porębie Wielkiej w Górze. *Fragm. Flor. Geobot. Ser. Polonica*, 1: 91-95.
- Danowski K., 2004. Program ochrony środowiska miasta i gminy Choroszcz na lata 2004-2012. http://choroszcz.pl/files/program_os.pdf (23.06.2016).
- Diederich P., Ertz D., Stapper N., Sérusiaux E., Van den Broeck D., van den Boom P., Ries C., 2016. The lichens and lichenicolous fungi of Belgium, Luxembourg and northern France. URL: <http://www.lichenology.info> (20.06.2016).

- Fałtynowicz W., Izydorek I., Budzbon E., 1991. The lichen flora as bioindicator of air pollution of Gdańsk, Sopot and Gdynia. *Monogr. Bot.*, 73: 3-52.
- Gottas H., 2002. Die Flechten der Stadt Salzburg. Die Universität Salzburg – plus 3, April 2002. http://www.sbg.ac.at/plus/plus_3_2002/rubriken/flechten.htm (23.06.2016).
- Górniak A., 2000. Klimat województwa podlaskiego. IMiGW, Białystok.
- Izydorek I., 2005. Porosty wybranych miast na polskim wybrzeżu Bałtyku. *Acta Bot. Casub.*, 5: 173-178.
- Jużwin A., Kossowska M., Pietrzykowska K., 2012. Porosty epifityczne miasta Karpacza (Karkonosze, SW Polska). *Acta Bot. Siles.*, 8: 53-70.
- Kepel A., 1999. Porosty Poznania jako wskaźniki zanieczyszczenia atmosfery. Praca doktorska (manuskrypt). Zakład Taksonomii Roślin Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań, 1-237.
- Kiercul S., 2013a. Zróżnicowanie gatunkowe porostów (*Fungi lichenisati*) wsi Klewinowo i okolic (Polska Północno-Wschodnia). *Parki nar. Rez. przyr.*, 32: 77-94.
- Kiercul S., 2013b. Materiały do bioty porostów Podlasia. I. Wieś Krynickie, gmina Zabłudów (Polska północno-wschodnia). [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), *Różnorodność biologiczna od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*. PTB, Białystok, 307-318.
- Kiercul S., 2014. Materiały do bioty porostów Podlasia. II. Wieś Tryczówka, gmina Juchnowiec Kościelny (Polska północno-wschodnia). [W:] Łaska G. (red.), *Różnorodność biologiczna od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów*. PTB Białystok, 61-70.
- Kiercul S., 2015a. Notes on the distribution of lichen biota of Podlasie I. Nowosady village, Podlaskie province (north-eastern Poland). *Acta Mycol.*, 50.1: 1053.
- Kiercul S., 2015b. Bogactwo gatunkowe porostów wsi Hermanówka. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 71.2: 116-121.
- Kiercul S., 2015c. Materiały do bioty porostów Podlasia. III. Wieś Janowicze, gmina Juchnowiec Kościelny (Polska północno-wschodnia). [W:] Bajguz A., Ciereszko I. (red.), *Różnorodność biologiczna od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja*. PTB Białystok, 213-224.
- Kolanko K., Matwiejuk A., 2007. Porosty zabytkowego parku krajobrazowego przy Muzeum Rolnictwa im. Krzysztofa Kluka w Ciechanowcu. *Parki nar. Rez. przyr.*, 26(3): 125-133.
- Kondracki J., 2011. *Geografia regionalna Polski*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kubiak D., 2005. Lichens and lichenicolous fungi of Olsztyn town (NE) Poland. *Acta Mycol.*, 40(2): 293-332.
- Kubiak D., Kukwa M., 2008. Uzupełnienia do bioty porostowej miasta Olsztyna (NE Polska). *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 15(1): 107-115.

- Łubek A., 2010. Ocena stanu środowiska przyrodniczego Kielc na podstawie bioty porostów epifitycznych. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 17(1): 149-163.
- Matuszkiewicz J., 2008. Geobotanical regionalization of Poland (Regionalizacja geobotaniczna Polski). IGiPZ PAN, Warszawa. URL: <https://www.igipz.pan.pl/Regiony-geobotaniczne/gik.html> (26.06.2016).
- Matwiejuk A., 2007. Porosty Białegostoku. Analiza florystyczno-ekologiczna. Tom I. Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok.
- Matwiejuk A., 2008. Lichens of Mielnik on river Bug (Podlasie, Eastern Poland). *Nature J.*, 41: 5-18.
- Matwiejuk A., 2009a. Lichens of the Boćki and its surroundings in Podlasie (NE Poland), *Nature J.*, 42: 49-61.
- Matwiejuk A., 2009b. Lichens of Drohiczyn on the Bug river (Podlasie, Eastern Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 13(8): 57-62.
- Matwiejuk A., 2011. Anthropogenic changes of lichen biota of the Białowieża town (Podlasie, Eastern Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 15(15): 129-138.
- Matwiejuk A., 2015a. Lichens of Supraśl town (Podlasie, North-Eastern Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 19(3): 133-142.
- Matwiejuk A., 2015b. Porosty zabytkowego Parku w Choroszczu (Podlasie, Polska Północno-Wschodnia). *Parki nar. Rez. przyr.*, 4(34): 3-14.
- Matwiejuk A., Chojnowska P., 2016. Lichens of Łomża town (Podlasie, North-Eastern Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 20(2): 53-62.
- Matwiejuk A., Kałuska A., 2014. Lichens of Sokółka (Podlasie, NE Poland) as indicators of the state of air pollution. *Ochr. Środ. i Zasob. Natur.*, 25.2(60): 1-4.
- Matwiejuk A., Kolanko K., 2007. Lichens of Ciechanowiec and its environs (Eastern Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 11(15): 85-93.
- Matwiejuk A., Korobkiewicz K., 2012. Lichens of Narew and its surroundings (Podlasie, North-Eastren Poland). *Rocz. AR Pozn., Botanica-Steciana*, 16(11): 93-100.
- Munzi S., Ravera S., Caneva G., 2007. Epiphytic lichens as indicators of environmental quality in Rome. *Environ. Poll.*, 146: 350-356.
- Nimis P.L., Monte M., Treatach M., 1988. Epilithic lichens vegetation in archeological sites in Rome area. 31 International Symposium "Spontaneous vegetation in settlements" Frascati, 11-15.04.1988.
- Nordin A., Savić S., Tibell L., 2010. Phylogeny and taxonomy of *Aspicilia* and *Megasporaceae*. *Mycologia*, 102(6): 1339-1349.
- Orange A., James P.W., White F.J., 2001. Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society, London.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie gatunków dziko występujących grzybów objętych ochroną 2014: Dz.U. z 2014, poz. 408, z późn. zm.

Skye E., 1968. Lichens and air pollution. *Acta Phytogeogr. Suec.*, 52: 1-23.

Zhao Xin, Leavitt S.D., Zhao Z.T., Zhang L.L., Arup U., Grube M., Pérez-Ortega S., Printzen Ch., Śliwa L., Kraichak E., Divakar P.K., Crespo A. Lumbsch H.T., 2015. Towards a revised generic classification of lecanoroid lichens (Lecanoraceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Fungal Diversity*: DOI 10.1007/s13225-015-0354-5.

15 Inwazyjne rośliny zielne w Suwalskim Parku Krajobrazowym

Izabela Tałałaj* / Ada Wróblewska / Beata Ostrowiecka
/ Edyta Jermakowicz / Paweł Mirski / Emilia Brzosko

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Ekologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

* e-mail: izagry@uwb.edu.pl

Streszczenie: W latach 2014-2015 na terenie Suwalskiego Parku Krajobrazowego (SPK) oraz w pasie 500 m od jego granic przeprowadzono inwentaryzację stanowisk obcych inwazyjnych roślin zielnych: kolczurki klapowanej *Echinocystis lobata*, słonecznika bulwiastego *Helianthus tuberosus*, barszczu Sosnowskiego *Heracleum sosnowskyi*, niecierpka gruczołowatego *Impatiens glandulifera* i drobnokwiatowego *I. parviflora*, łubinu trwałego *Lupinus polyphyllus*, rdestowca ostrokończystego *Reynoutria japonica* oraz nawłoci kanadyjskiej i późnej *Solidago canadensis* i *S. gigantea*. Badania prowadzono w miejscowościach oraz wzdłuż szlaków komunikacyjnych, uznawanych za istotne źródła rozprzestrzeniania się roślin inwazyjnych. W wyniku badań wykazano 102 stanowiska inwazyjnych roślin zielnych, przy czym najczęściej na terenie SPK spotykane są nawłocie (39 stanowisk), a najrzadziej kolczurka klapowana (2 stanowiska). 84% stanowisk stwierdzono na siedliskach suchych. Największą liczbę stanowisk – 46% zanotowano na siedliskach otwartych, 36% na terenie prywatnych posesji, a najmniej – 18% w zbiorowiskach leśnych i za-drzewieniach. Rośliny inwazyjne tworzyły najczęściej małe płyty o powierzchni < 10 m² (60% wszystkich stanowisk). W przypadku 44% stanowisk płyty składały się z ponad 50 pędów, a w 42% stanowisk udział roślin inwazyjnych przewyższał 75%. Za wyjątkiem jednego stanowiska, wszystkie rośliny inwazyjne realizowały reprodukcję generatywną lub wegetatywną, lub oba typy jednocześnie. W porównaniu z wynikami wcześniejszych inwentaryzacji inwazyjnych roślin zielnych, na obszarze SPK zwiększyła się liczba zajmowanych przez nie stanowisk, wielkość zajmowanych płątów i liczba pędów w płacie. Odnotowano też nowe typy siedlisk opanowanych przez rośliny inwazyjne, szczególnie o charakterze naturalnym.

Słowa kluczowe: proces inwazji, rośliny obce, siedliska antropogeniczne

1. Wstęp

Rozprzestrzenianie się gatunków inwazyjnych jest obecnie jednym z najważniejszych globalnych zagrożeń bioróżnorodności. Jego skutki mają charakter wielopłaszczyznowy i dotyczą aspektów ekologicznych, ekonomicznych i socjologicznych (Pimentel 2011; Tokarska-Guzik i in. 2012). Proces inwazji biologicznych najczęściej rozpoczyna się na siedliskach zmienionych przez człowieka, ponieważ obszary o zaburzonej strukturze ekologicznej są łatwiej kolonizowane przez nowych przybyszy (Mooney i in. 2005). Po opanowaniu siedlisk o charakterze antropogenicznym, inwazyjne gatunki obcego pochodzenia zaczynają przenikać do siedlisk półnaturalnych, a następnie naturalnych. Obecnie, gatunki inwazyjne coraz częściej obserwuje się nawet na obszarach o unikalnych walorach przyrodniczych (Foxcroft i in. 2013), a ich liczba na terenach chronionych jest ściśle skorelowana z intensywnością ruchu turystycznego (Usher 1988). W polskich parkach narodowych i krajobrazowych najwięcej gatunków obcych stanowią rośliny naczyniowe, a obszary chronione, położone na północy kraju, odznaczają się wyższym ich udziałem we florach parków niż w części południowej. Wydaje się również, że ze względu na niższy reżim ochronny, udział inwazyjnych gatunków obcego pochodzenia na obszarze parków krajobrazowych jest wyższy niż w parkach narodowych (Najberek, Solarz 2011).

Obowiązujące Polskę liczne dokumenty międzynarodowe, dotyczące konieczności zwalczania gatunków inwazyjnych (w tym Konwencja o różnorodności biologicznej, sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r. i Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1143/2014 z dnia 22 października 2014 r. w sprawie działań zapobiegawczych i zaradczych w odniesieniu do wprowadzania i rozprzestrzeniania inwazyjnych gatunków obcych), nakładają na Polskę obowiązek szczegółowego rozpoznania obecności i obfitości gatunków inwazyjnych. Jednak w przypadku wielu polskich parków krajobrazowych, najczęściej brak jest danych o występowaniu gatunków obcych na ich obszarze (Najberek, Solarz 2011). Na terenie Suwalskiego Parku Krajobrazowego (SPK) pierwsza analiza zagrożenia parku przez inwazyjne rośliny została wykonana w 2009 roku. Jej efektem było stwierdzenie 13 gatunków roślin inwazyjnych (Śliwiński i in. 2009). Następne badania (Zajac i in. 2015) wykazały obecność 10 taksonów inwazyjnych roślin naczyniowych. Z kolei przy okazji inwentaryzacji w ramach projektu *„Inwazyjne gatunki drzew i krzewów zagrożeniem dla bioróżnorodności Biebrzańskiego Parku Narodowego i Suwalskiego Parku Krajobrazowego”* (Brzosko i in. 2016) wykazano obecność licznych stanowisk 9 taksonów inwazyjnych roślin zielnych oraz podjęto próbę oceny stopnia ich inwazyjności na terenie parku. Celem niniejszej pracy jest szcze-

główne omówienie występowania inwazyjnych roślin zielnych obcego pochodzenia na terenie SPK.

2. Teren badań

Badania przeprowadzono na obszarze Suwalskiego Parku Krajobrazowego, który jest najstarszym parkiem krajobrazowym w Polsce, powołanym w 1976 r. Obejmuje on obszar 6284 ha i jest otoczony strefą otuliny zajmującej 2333 ha (Górniak i in. 2007). Współczesny krajobraz parku, charakteryzujący się zróżnicowaną rzeźbą terenu, jest zdominowany przez obszary użytkowane rolniczo, głównie łąki i pastwiska, które stanowią 60% powierzchni SPK. Rolnictwo ma tu charakter ekstensywny, jest małoobszarowe, z dominującym wypasem bydła. Pozostałe 24% powierzchni parku zajmują lasy, 10% wody i 4% bagna (Świerubska i in. 2015). Niewielką część powierzchni parku stanowią zabudowania, choć w ostatnich latach ich udział zwiększył się z powodu wzrostu aktywności turystycznej.

3. Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 2014-2015 i obejmowały obszar SPK oraz pas 500 m od jego granic, który stanowi istotne źródło zagrożenia gatunkami obcymi dla ekosystemów naturalnych parku. Inwentaryzacją objęto 9 taksonów roślin zielnych obcego pochodzenia: kolczurkę klapowaną *Echinocystis lobata* (F. Michx.) Torr. & A. Gray, słonecznika bulwiastego *Helianthus tuberosus* L., barszcz Sosnowskiego *Heracleum sosnowskyi* Manden., niecierpka gruczołowatego *Impatiens glandulifera* Royle i drobnokwiatowego *I. parviflora* DC., łąbin trwały *Lupinus polyphyllus* Lindl., rdestowca ostrokończystego *Reynoutria japonica* Houtt. oraz nawłóć kanadyjską *Solidago canadensis* L. i późną *S. gigantea* Aiton., ujęte w jeden takson *Solidago* spp. Wszystkie badane gatunki są kenofitami (gatunkami, które przybyły i zadomowiły się w Europie po odkryciu Ameryki w 1492 r.). W Polsce zajmują one siedliska naturalne, półnaturalne i antropogeniczne. Posiadają status zadomowionych gatunków inwazyjnych (Tokarska-Guzik i in. 2012). Większość z nich posiada najwyższą, IV kategorię inwazyjności w Polsce, co oznacza, że ich występowanie na obszarze kraju ma bardzo istotny wpływ na rodzime ekosystemy. Większość z nich nadal zwiększa liczbę stanowisk lub/i zajmowany obszar. Jedynie łąbin trwały należy do III kategorii inwazyjności (czyli gatunków, które występują na niewielu

stanowiskach z dużą ilościowością lub w rozproszeniu na niewielu stanowiskach, o znaczącym zagrożeniu ekologicznym, ekonomicznym lub społecznym), a słonecznik bulwiasty należy do II kategorii inwazyjności (reprezentuje gatunki, które już ujawniły właściwości inwazyjne w niektórych regionach kraju i zwiększają swój potencjał inwazyjny) (Tokarska-Guzik i in. 2012).

Inwentaryzację gatunków inwazyjnych przeprowadzono w miejscowościach i przy szlakach komunikacyjnych, do których zaliczono drogi krajowe, drogi lokalne, drogi prowadzące z osad do pól uprawnych i użytków zielonych oraz szlaki turystyczne. Miejsca te potraktowano jako najistotniejsze, potencjalne źródła rozprzestrzeniania się gatunków inwazyjnych do ekosystemów naturalnych. W miejscowościach rejestrowano obecność badanych gatunków zielnych wzdłuż ulic i na prywatnych posesjach, przy czym analiza na posesjach była wykonywana „z ulicy” lub przy użyciu lornetki. Podczas inwentaryzacji szlaków komunikacyjnych, obserwowano również przylegające do nich obszary będące w zasięgu wzroku i pola widzenia lornetki. Sumaryczna długość zinwentaryzowanych szlaków komunikacyjnych wyniosła 131 km. Stanowiska inwentaryzowanych gatunków lokalizowano odbiornikiem GPS, notowano typ zajmowanego siedliska z uwzględnieniem stopnia jego wilgotności oraz charakteryzowano typ realizowanej reprodukcji (rozmnażanie generatywne i/lub pomnażanie wegetatywne). Stopień inwazyjności poszczególnych gatunków oceniano na podstawie następujących parametrów, przypisując im wartości w skali od 1 do 5:

1. Liczba pędów: 1-5 (1), 6-10 (2), 11-20 (3), 21-50 (4), >50 (5);
2. Wielkość płatu: < 10 m² (1), 10-100 m² (2), 101-200 m² (3), 201-1000 m² (4), > 1000 m² (5);
3. Udział w płacie: < 25% (1), 25-50% (2), 51-75% (3), > 75% (4).

4. Wyniki

Na badanym obszarze zinwentaryzowano 102 stanowiska inwazyjnych roślin zielnych obcego pochodzenia (tab. 1). Najczęściej na badanym terenie występują nawłocie, które stwierdzono na 39 stanowiskach, a najrzadziej spotykana jest koleczurka kłapowana, stwierdzona tylko na 2 stanowiskach (tab. 1). Największą liczbę stanowisk inwazyjnych roślin zielnych zanotowano na siedliskach otwartych (46% wszystkich stanowisk), z czego 35% stanowiły przydroża i rowy odwadniające, 33% – nieużytki, 24% – łąki i pastwiska, a 8% – zręby i nasadzenia leśne. 36% wszystkich stanowisk znajdowało się na terenie prywatnych posesji. Badane taksony notowano

najrzadziej w zbiorowiskach leśnych i zadrzewieniach (18% wszystkich stanowisk), z czego 35% stanowiły bory i tyle samo zadrzewienia śródpolne nad brzegami jezior i cieków wodnych, 25% stanowiły grądy, a 5% – olsy i łęgi (ryc. 1, tab. 1). Aż 84% stanowisk znajdowało się na siedliskach suchych (ryc. 2). Najczęściej rośliny inwazyjne występowały w małych płatach o powierzchni < 10 m² (60% wszystkich stanowisk; ryc. 3). Analizowane płaty w 44% stanowisk składały się z ponad 50 pędów, a w 42% stanowisk udział pędów w płacie przewyższał 75%. Najrzadziej stwierdzano płaty składające się z 1-5 pędów (9% wszystkich stanowisk) oraz płaty, w których udział pędów w płacie dochodził do 25% (17% wszystkich stanowisk) (ryc. 4, ryc. 5). Za wyjątkiem jednego stanowiska, na wszystkich rośliny inwazyjne realizowały reprodukcję generatywną lub wegetatywną, lub oba typy jednocześnie (ryc. 6).

Tabela 1. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk inwazyjnych roślin zielnych SPK

Gatunek	Szerokość (N) / Długość (E) geo- graficzna	Liczba pędów	Wielkość platu	Udział w płacie	Generatywnie	Wegetatywnie	Siedlisko	Wilgotność
<i>E. lobata</i>	54,2233/22,8844	1	1	1	+	-	posesja	w
<i>E. lobata</i>	22,7956/54,2427	2	1	1	+	-	nieużytek	s
<i>H. tuberosus</i>	22,7915/54,2587	5	3	4	+	+	posesja	s
<i>H. tuberosus</i>	22,7915/54,2587	5	4	4	+	+	posesja	s
<i>H. tuberosus</i>	22,8678/54,2418	5	4	3	+	+	nieużytek	s
<i>H. tuberosus</i>	22,8732/54,2695	5	3	1	+	+	poletko łowieckie	s
<i>H. tuberosus</i>	22,8721/54,2600	5	1	1	+	+	posesja	s
<i>H. tuberosus</i>	22,8919/54,2472	3	2	2	+	+	posesja	s
<i>H. tuberosus</i>	22,8154/54,2829	5	3	4	+	+	nieużytek	s
<i>H. sosnowskyi</i>	22,9073/54,2650	5	2	3	+	-	brzeg jeziora	w
<i>H. sosnowskyi</i>	22,9080/54,2806	1	1	4	-	-	pobocze drogi	s
<i>H. sosnowskyi</i>	22,8942/54,2836	2	1	3	+	-	nieużytek	s
<i>H. sosnowskyi</i>	22,9084/54,2794	3	1	3	+	-	wilgotna łąka	w
<i>I. glandulifera</i>	22,8196/54,2547	5	2	4	+	-	brzeg jeziora	w
<i>I. glandulifera</i>	22,7910/54,2483	4	1	3	+	-	rów/posesja	w
<i>I. glandulifera</i>	22,7804/54,2587	5	1	4	+	-	posesja	s

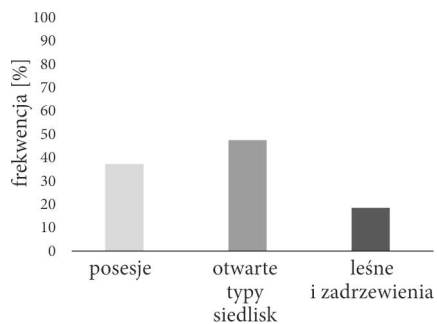
<i>I. glandulifera</i>	22,7762/54,2306	4	1	3	+	-	posesja	s
<i>I. glandulifera</i>	22,8345/54,2568	5	1	3	+	-	posesja	w
<i>I. glandulifera</i>	22,8137/54,2531	5	3	3	+	-	rów melioracyjny	w
<i>I. glandulifera</i>	22,8075/54,2498	5	1	4	+	-	posesja	s
<i>I. glandulifera</i>	22,8721/54,2852	5	1	4	+	-	posesja	s
<i>I. glandulifera</i>	22,9099/54,2705	5	2	4	+	-	rów/posesja	w/s
<i>I. glandulifera</i>	54,2549/22,8940	5	4	3	+	-	ciek wodny	w
<i>I. glandulifera</i>	22,9263/54,2877	5	3	4	+	-	ciek wodny	w
<i>I. glandulifera</i>	22,9311/54,2898	5	4	4	+	-	rów	w
<i>I. glandulifera</i>	22,8801/54,2582	1	1	4	+	-	nieużytek	s
<i>I. glandulifera</i>	22,9391/54,3007	5	2	4	+	-	rów	w
<i>I. glandulifera</i>	22,8904/54,2787	2	1	3	+	-	posesja	s
<i>I. glandulifera</i>	22,9047/54,2774	5	2	3	+	-	posesja	s
<i>I. glandulifera</i>	22,8206/54,2558	5	2	4	+	-	nieużytek	w
<i>I. glandulifera</i>	brak danych	5	1	4	+	-	posesja	s
<i>I. parviflora</i>	22,9099/54,2705	4	2	2	+	-	rów/posesja	w/s
<i>I. parviflora</i>	22,8812/54,2871	5	5	2	+	-	rów/nieużytek	w/s
<i>I. parviflora</i>	22,9434/54,2781	3	1	1	+	-	bór	s
<i>I. parviflora</i>	22,8826/54,2872	2	1	1	+	-	posesja	s
<i>I. parviflora</i>	54,2868/22,8805	5	3	1	+	-	nieużytek	w
<i>I. parviflora</i>	22,8903/54,2869	4	1	2	+	-	pobocze drogi/bór	s
<i>I. parviflora</i>	22,8920/54,2882	5	5	3	+	-	zrąb w borze	s
<i>I. parviflora</i>	22,8567/54,2833	4	1	1	+	-	pobocze drogi/bór	s
<i>I. parviflora</i>	22,8618/54,2839	4	1	1	+	-	pobocze drogi/ bór	s
<i>I. parviflora</i>	54,2761/22,9355	3	3	1	+	-	pobocze drogi/bór	s
<i>I. parviflora</i>	22,8889/54,2641	5	2	4	+	-	grąd	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,7944/54,2432	5	3	1	+	+	pobocze drogi	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,7927/54,2451	5	5	2	+	+	pobocze drogi/ pastwisko	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,8046/54,2395	1	1	1	+	+	pobocze drogi/ pastwisko	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,8235/54,2353	5	2	4	+	+	pastwisko	s

<i>L. polyphyllus</i>	22,7821/54,2582	5	2	2	+	+	nieużytek	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,7680/54,2433	5	4	3	+	+	nieużytek	w/s
<i>L. polyphyllus</i>	22,7680/54,2433	5	3	2	+	+	nieużytek/ nasadzenia sosnowe	s
<i>L. polyphyllus</i>	22,7816/54,2582	5	5	1	+	+	łąka wilgotna	w
<i>R. japonica</i>	22,9045/54,2780	3	1	4	-	+	pobocze drogi/ pastwisko	s
<i>R. japonica</i>	22,9052/54,2882	5	2	4	+	+	nieużytek	s
<i>R. japonica</i>	22,9082/54,2818	4	1	4	+	+	skraj olsu	w
<i>R. japonica</i>	22,9082/54,2818	4	1	4	+	+	porzucona posesja	s
<i>R. japonica</i>	22,8951/54,2843	4	1	4	+	+	posesja	s
<i>R. japonica</i>	22,8462/54,2846	5	2	4	-	+	grąd	s
<i>R. japonica</i>	22,8470/54,2838	5	4	4	+	+	grąd	s
<i>R. japonica</i>	22,8478/54,2816	5	4	4	+	+	grąd	s
<i>R. japonica</i>	22,8486/54,2804	5	1	4	+	+	grąd	s
<i>R. japonica</i>	22,8648/54,2844	5	3	4	+	+	pastwisko	s
<i>R. japonica</i>	22,9372/54,2947	1	1	4	+	+	pobocze drogi/ pastwisko	s
<i>R. japonica</i>	22,8998/54,2828	1	1	4	+	+	nieużytek	s
<i>R. japonica</i>	22,7802/54,2633	5	2	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8666/54,2859	2	1	2	+	+	pastwisko	s
<i>Solidago spp.</i>	22,9470/54,3043	3	1	1	+	+	pobocze drogi	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8663/54,2856	1	1	1	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8662/54,2856	4	1	3	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8557/54,2603	1	1	2	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8904/54,2787	5	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	54,2609/22,8601	3	1	2	+	+	pobocze drogi	s
<i>Solidago spp.</i>	54,2609/22,8601	3	1	2	+	+	nieużytek	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8647/54,2601	3	1	2	+	+	nieużytek	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8614/54,2526	5	2	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago spp.</i>	22,9410/54,2805	2	1	2	+	+	bór	s
<i>Solidago spp.</i>	22,9398/54,2783	3	1	2	+	+	bór	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8942/54,2474	1	1	1	+	+	zadrzewienie na pastwisku	s
<i>Solidago spp.</i>	22,8919/54,2472	3	1	3	+	+	posesja	s

<i>Solidago</i> spp.	22,8775/54,2493	2	1	2	+	+	zadrzewienie na polu uprawnym	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9047/54,2817	3	1	3	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9047/54,2774	5	2	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9047/54,2761	5	1	2	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9018/54,2700	2	1	1	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8918/54,2657	4	2	2	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8294/54,2651	2	1	2	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8202/54,2556	3	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,7964/54,2436	3	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9190/54,2422	3	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8177/54,2309	2	1	4	+	+	pobocze drogi/ pastwisko	s
<i>Solidago</i> spp.	22,7951/54,2428	2	1	3	+	+	pobocze drogi/ posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,7915/54,2587	5	2	3	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,7703/54,2428	5	2	4	+	+	nieużytek/ pastwisko/łąka	s
<i>Solidago</i> spp.	22,7834/54,2320	2	1	3	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8170/54,2206	3	1	4	+	+	pobocze drogi/łąg	w
<i>Solidago</i> spp.	22,8507/54,2202	3	1	3	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8653/54,2160	3	1	4	+	+	pastwisko	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9048/54,2215	2	1	3	+	+	nieużytek	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9264/54,2696	4	2	3	+	+	nieużytek	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8920/54,2882	2	1	3	+	+	zrąb w borze	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9182/54,2704	4	1	4	+	+	łąka	s
<i>Solidago</i> spp.	22,9179/54,2591	3	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8345/54,2568	3	1	4	+	+	posesja	s
<i>Solidago</i> spp.	22,8721/54,2852	3	1	2	+	+	posesja	s

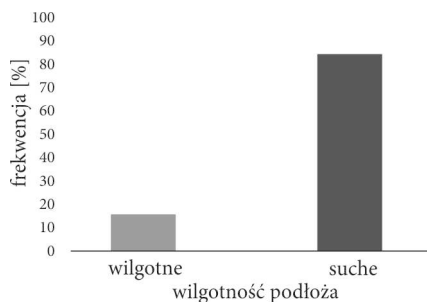
Objaśnienia: Wartość parametrów podano w skali 1-5 (Rozdz. 3). Rozmnażanie generatywne i wegetatywne: + obecne, – brak. Wilgotność siedliska: w – wilgotne, s – suche

Źródło: badania własne



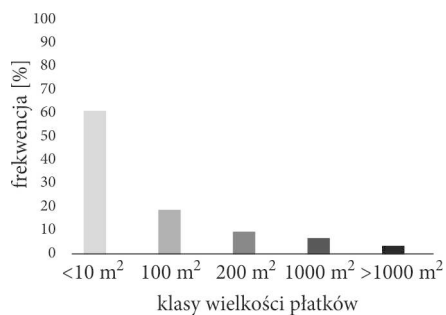
Rycina 1. Typy siedlisk, na których występują inwazyjne rośliny zielne w SPK

Źródło: badania własne.



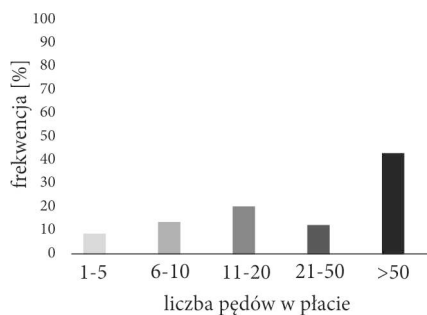
Rycina 2. Warunki wilgotnościowe siedlisk, na których występują inwazyjne rośliny zielne w SPK

Źródło: badania własne.



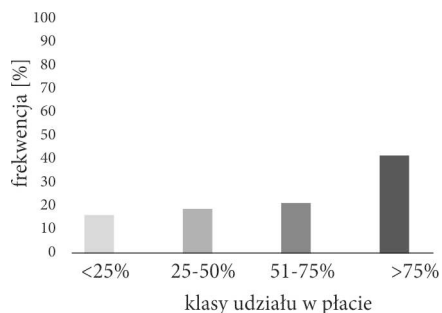
Rycina 3. Wielkość płatów tworzonych przez inwazyjne rośliny zielne w SPK

Źródło: badania własne.



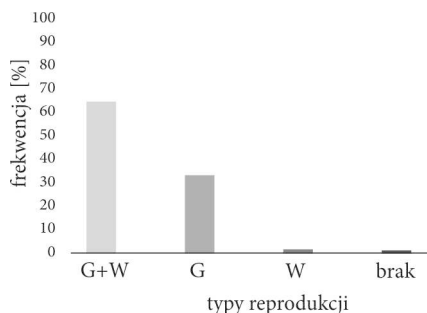
Rycina 4. Liczba pędów w płatach inwazyjnych roślin zielnych w SPK

Źródło: badania własne.



Rycina 5. Udział inwazyjnych roślin zielnych w zajmowanych płatach na terenie SPK

Źródło: badania własne.



Rycina 6. Typy reprodukcji realizowanej na stanowiskach inwazyjnych roślin zielnych w SPK. G – reprodukcja generatywna, W – reprodukcja wegetatywna

Źródło: badania własne.

Echinocystis lobata zlokalizowano na 2 małych stanowiskach: nad prywatnym stawem w Szurpiłach, niedaleko jez. Szurpiły oraz na nieużytku w okolicach Błaskowizny. Bardzo małe płyty tej rośliny w pierwszej lokalizacji obejmują 5 osobników, a w drugiej ok. 10 osobników. W obu lokalizacjach ich pokrycie jest niewielkie i nie przekracza 25%. W obu miejscach kolczurka intensywnie kwitnie i wykształca liczne owoce (tab. 1).

Helianthus tuberosus zanotowano na 7 stanowiskach, które występują w nasadzeniu na poletku łowieckim, nieużytkach i prywatnych posesjach. Na 5 stanowiskach gatunek ten tworzy duże płyty, o powierzchni do 200 m², a nawet do 1000 m², a na 2 stanowiskach do 100 m² i < 10 m². Na większości stanowisk liczba pędów topinamburu przewyższa 50, a ich pokrycie w zajętym płacie jest bardzo zróżnicowane i obejmuje wszystkie wyróżnione kategorie. Na każdym z zajmowanych stanowisk słonecznik bulwiasty kwitnie i pomnaża się wegetatywnie (tab. 1).

Heracleum sosnowskyi stwierdzono na 4 stanowiskach w północnej części parku, w otoczeniu miejscowości Kleszczówek, z czego 2 stanowiska na siedliskach suchych, a 2 na wilgotnych. Największe stanowisko tworzące płat o powierzchni ok. 100 m² i składające się z ponad 50 pędów i pokryciu powyżej 75%, znajduje się nad brzegiem jeziora Okrągłego. W pozostałych lokalizacjach barszcz tworzy płyty do 10 m², z liczbą pędów w płacie wahającą się od 1 do 20 i pokryciem do 75%. Za wyjątkiem stanowiska przydrożnego, w pozostałych lokalizacjach gatunek ten intensywnie kwitnie i owocuje (tab. 1).

Impatiens glandulifera zanotowano na 18 stanowiskach, w połowie na siedliskach suchych i w połowie na wilgotnych, głównie na posesjach (50% stanowisk) i w miejscach otwartych (35% stanowisk), wśród których dominują przydrożne rowy odwadniające. Niecierpek gruczołowaty najczęściej tworzy małe płyty, o powierzchni do 10 m² (50% stanowisk) lub do 100 m² (28% stanowisk). Dominująca część płatów (75% stanowisk) jest utworzona przez ponad 50 pędów, występujących z pokryciem powyżej 75% (61% stanowisk) lub w granicach 50-75% (39% stanowisk). Niecierpek wszędzie intensywnie kwitnie i owocuje (tab. 1).

Impatiens parviflora wykazano na 11 stanowiskach w północnej części parku, w przeważającej większości znajdujących się na siedliskach suchych (77% stanowisk). 54,5% wszystkich stanowisk występuje na siedliskach borowych, a 45% na siedliskach otwartych: nieużytkach, rowach i posesjach. W 5 lokalizacjach niecierpek drobnokwiatowy tworzy małe płyty o powierzchni do 10 m². Stwierdzono również taką samą liczbę płatów w kategoriach 100 m², 200 m² i powyżej 1000 m². Większość stanowisk charakteryzuje się znaczną liczbą pędów w płacie, dochodzącą do 50 pędów (4 stanowiska) lub przewyższającą 50 pędów (4 stanowiska). Pokrycie niecierpka w płacie jest jednak najczęściej niewielkie i nie przekracza 25% (6 sta-

nowisk) lub waha się w granicach 25-50% (3 stanowiska). We wszystkich lokalizacjach *I. parviflora* intensywnie kwitnie i owocuje (tab. 1).

Lupinus polyphyllus stwierdzono na 8 stanowiskach w zachodniej części parku, gdzie występuje wyłącznie na siedliskach otwartych, głównie przydrożach, nieużytkach i pastwiskach, z których większość jest sucha (78% stanowisk). Wielkość płatów tworzonych przez łubin jest bardzo zróżnicowana i z podobnym udziałem obserwowano wszystkie wyróżnione kategorie wielkości. Bez względu na wielkość płatów, większość z nich jest tworzona przez ponad 50 pędów (7 stanowisk). Udział pędów w płacie jest najczęściej niewielki i dochodzi do 25% (3 stanowiska) lub do 50% (3 stanowiska). We wszystkich lokalizacjach *L. polyphyllus* rozmnaża się generatywnie i rozrasta wegetatywnie (tab. 1).

Reynoutria japonica zanotowano na 13 stanowiskach, głównie na siedliskach suchych, znajdujących się w północnej części parku. Większość stanowisk znajduje się na siedliskach otwartych – nieużytkach i pastwiskach (5 lokalizacji) oraz w lasach (5 lokalizacji), głównie w grądach. Na 54% stanowisk rdestowiec tworzy płyty małe, o powierzchni do 10 m², a na 23% do 100 m². Dwa największe płyty dochodzące do 1000 m² znajdują się w grądzie niedaleko miejscowości Dzierwany. Liczba pędów nadziemnych jest zazwyczaj bardzo duża i znacznie przekracza najwyższą kategorię 50 pędów (54% stanowisk) lub waha się od 20 do 50 (23% stanowisk). Tylko w dwóch lokalizacjach zaobserwowano małe skupienia tego gatunku. Na wszystkich stanowiskach *R. japonica* występuje z bardzo dużym pokryciem, dochodzącym do 100%, ponieważ intensywnie pomnaża się wegetatywnie poprzez mocne kłącza. Na 85% stanowisk rdestowiec intensywnie kwitnie, ale nie wytwarza nasion, podobnie jak w innych częściach Polski (tab. 1).

Solidago spp. wykazano na 39 stanowiskach, które za wyjątkiem jednego charakteryzują się podłożem suchym i są zlokalizowane głównie na posesjach (55% stanowisk) i siedliskach otwartych (33% stanowisk). Większość płatów jest bardzo mała, o powierzchni poniżej 10 m² (85% stanowisk) lub dochodzącej do 100 m² (15% stanowisk). Liczba pędów w płacie jest zróżnicowana, ale najczęściej są one tworzone przez 11-20 pędów (41% stanowisk) lub 6-10 pędów (26% stanowisk). Pokrycie nawłoci w płatach jest również zróżnicowane, a jej udział dochodzi do 50% (31% stanowisk), do 75% (26% stanowisk) i do 100% (33% stanowisk). We wszystkich lokalizacjach *Solidago* kwitnie i owocuje oraz pomnaża się wegetatywnie (tab. 1).

5. Dyskusja

Przeprowadzone badania dowodzą, że zielne rośliny inwazyjne są coraz poważniejszym problemem na obszarze Suwalskiego Parku Krajobrazowego. Liczba 102 stanowisk stwierdzonych po zinwentaryzowaniu 131 km szlaków komunikacyjnych wskazuje, że statystycznie co 1,28 km można napotkać na tym obszarze płat zielnej rośliny inwazyjnej. W porównaniu z badaniami prowadzonymi analogiczną metodą w latach poprzednich, choć tylko w granicach parku, liczba ta jest dwukrotnie wyższa w stosunku do 55 stanowisk zielnych roślin inwazyjnych wykazanych przez Śliwińskiego i in. (2009) i 47 stanowisk tychże roślin zanotowanych przez Zajęc i in. (2015). Mimo, że sposób klasyfikacji siedlisk w obu opracowaniach jest odmienny niż w niniejszej pracy i autorzy ujmują w nich również stanowiska inwazyjnych drzew i krzewów, to podobnie jak w obu opracowaniach, większość inwazyjnych roślin skupia się na posesjach i siedliskach otwartych, które są typowym elementem krajobrazu parku. Niepokoi jednak fakt, że po raz pierwszy stwierdzono wyraźną tendencję do wchodzenia tych roślin do naturalnych zbiorowisk leśnych, co dotyczy głównie *R. japonica* i *I. parviflora* oraz pojawiania się ich w ekosystemach mokradłowych, jak *H. sosnowskyi* nad jez. Okrągłe, gdzie bardziej niż w przypadku innych typów ekosystemów, zakłócają one funkcje ekosystemu, zaburzają jego usługi ekologiczne i są bardzo trudne do usunięcia (Dajdok, Pawlaczek 2009).

W porównaniu do danych Śliwińskiego i in. (2009), większość badanych gatunków (*H. tuberosus*, *I. glandulifera*, *I. parviflora*, *R. japonica* i *Solidago* spp.) zwiększyła liczbę stanowisk. Z kolei w przypadku *E. lobata* i *L. polyphyllus*, stwierdzono mniejszą liczbę stanowisk, a liczba stanowisk *H. sosnowskyi* nie zmieniła się. Spadek liczby stanowisk *E. lobata* i *L. polyphyllus* wynika z niemal całkowitego ich wyeliminowania z ogródków przydomowych. Może to być wymiernym efektem akcji edukacyjnych prowadzonych przez pracowników SPK we współpracy ze szkołami i lokalnymi samorządami (Świerubska, inf. ustna). W ogrodach nadal chętnie sadzone są nawłocie. Liczba ich stanowisk na posesjach podwoiła się w krótkim czasie. Wyniki obserwacji wskazują również, że stanowiska przydomowe stały się źródłem dyspersji wszystkich uprawianych gatunków. Obecnie opanowały one zarówno siedliska otwarte (przydroża, rowy odwadniające, nieużytki, łąki i pastwiska), jak i ekosystemy leśne. *I. parviflora* z zagajników i miejsc ruderalnych rozprzestrzenił się głównie do borów. Natomiast *H. sosnowskyi* całkowicie zmienił lokalizację swoich stanowisk. Stanowiska tego gatunku położone pierwotnie w centralnej części parku zostały skutecznie wyeliminowane w latach 2011-2013

(Świerubska, inf. ustna), ale powstały kolejne w otoczeniu miejscowości Kleszczówek.

W porównaniu do badań Śliwińskiego i in. (2009), zmieniała się również wielkość stanowisk roślin inwazyjnych w SPK. Śliwiński i współautorzy (2009) określili je w większości jako niewielkie, tworzone przez 1-10 osobników i zajmujące powierzchnię nieprzekraczającą 10 m². Kilka lat później Zajac i in. (2015) zaobserwowali, że na większości stanowisk wzrosła liczba osobników (do 50 osobników). Nasze badania wykazały, że powierzchnia zajmowanych płatów przez inwazyjne rośliny zielne jest w dalszym ciągu w ponad połowie przypadków niewielka (do 10 m²), jednak pojawiają się stanowiska większe, szczególnie w przypadku *I. parviflora* i *L. polyphyllus*. Liczba pędów na notowanych stanowiskach również zwiększyła się, ponieważ aż 44% stanowisk jest tworzona przez ponad 50 pędów. Tak liczne stanowiska, z różną częstotliwością, stwierdzono dla wszystkich badanych gatunków, najczęściej jednak w przypadku *H. tuberosus*, *L. polyphyllus*, *I. glandulifera* i *R. japonica*.

Obserwacje wskazują na postępujący proces inwazji roślin zielnych na obszarze SPK. Świadczy o tym zwiększanie liczby zajmowanych stanowisk oraz ich wielkości, wzrost zagęszczania pędów w płacie (aż w 42% stanowisk zagęszczenie przekracza 75%) oraz zajmowanie nowych typów siedlisk, szczególnie o charakterze naturalnym. W dużej mierze przyczyniają się do tego różne formy aktywności ludzkiej. Ogromną rolę w intensyfikacji procesu inwazji na terenie SPK odgrywają właściwości biologiczne roślin inwazyjnych, głównie zdolność do reprodukcji generatywnej i pomnażania wegetatywnego.

Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania dyrektor Suwalskiego Parku Krajobrazowego Teresie Świerubskiej za wsparcie merytoryczne oraz pracownikom parku za pomoc w udostępnieniu źródeł bibliograficznych.

Literatura

- Brzosko E., Jermakowicz E., Mirski P., Ostrowiecka B., Tałałaj I., Wróblewska A., 2016. Inwazyjne drzewa i krzewy w Biebrzańskim Parku Narodowym i Suwalskim Parku Krajobrazowym. Wyd. Stowarzyszenie „Uroczysko”, Białystok.
- Dajdok Z., Pawlaczyk P., (red.), 2009. Inwazyjne gatunki roślin ekosystemów mokradłowych Polski. Wyd. Klubu Przyrodników, Świebodzin.
- Foxcroft L.C., Pyšek P., Richardson D.M., Genovesi P., 2013. Plant Invasions in Protected Areas: Patterns, Problems and Challenges. Springer, Dordrecht.

- Górniak A., Reszczyński K., Siwak P., Świerubska T., 2007. Suwalski Park Krajobrazowy. [W:] XXX lat Suwalskiego Parku Krajobrazowego. Materiały konferencyjne „Parki krajobrazowe w krajowym systemie ochrony obszarowej”. Stowarzyszenie Miłośników Suwalskiego Parku Krajobrazowego „Kraina Hańczy”. Turtul.
- Konwencja o różnorodności biologicznej, sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r. Dziennik Ustaw z 2002 r. Nr 184 poz. 1532.
- Mooney H., Mack R., McNeely J., Neville L., Schei P., Waage J., 2005. Invasive alien species: A new synthesis. Scientific Committee on Problems of the Environment. SCOPE Series 63. Island Press, Washington D.C.
- Najberek K., Solarz W., 2011. Inwazje biologiczne w polskich parkach narodowych i krajobrazowych. [W:] Głowaciński Z., Okarma H., Pawłowski J., Solarz W. (red.), Księga gatunków obcych inwazyjnych w faunie Polski. IOP, Kraków: 624-639.
- Pimentel D., 2011. Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Plant, Animal and Microbe Species. Second edition. CRC Press, Boca Raton.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego u Rady (UE) nr 1143/2014 z dnia 22 października 2014 r. w sprawie działań zapobiegawczych i zaradczych w odniesieniu do wprowadzania i rozprzestrzeniania inwazyjnych gatunków obcych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 317 z 4.11.2014, s. 35-55.
- Śliwiński M., Borowiec M., Popławska M., Świerszcz S., Posyniak E., Zaboińska M., 2009. Rośliny inwazyjne Suwalskiego Parku Krajobrazowego. Malesowizna-Turtul, Manuskrypt.
- Świerubska T., Maciejewski S., Racis S., 2015. Szlakami Suwalskiego Parku Krajobrazowego. Stowarzyszenie Miłośników Suwalskiego Parku Krajobrazowego „Kraina Hańczy”. Malesowizna-Turtul.
- Tokarska-Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C., 2012. Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych. Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Usher M.B., 1988. Biological invasions of nature reserves: a search for generalization. Biol. Conserv. 44: 119-135.
- Zając I., Jaśkiewicz K., Jędrzejewska E., 2015. Rozmieszczenie stanowisk inwazyjnych gatunków roślin naczyniowych w Suwalskim Parku Krajobrazowym. Fragm. Florist. Geobot. Polon. 22: 65-78.

Wpływ czynników abiotycznych środowiska przyrodniczego na stan zachowania populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej

Grażyna Łaska* / Aneta Sienkiewicz**

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok

* e-mail: g.laska@pb.edu.pl; ** email: a.sienkiewicz@pb.edu.pl

Streszczenie: Poznanie oddziaływania czynników abiotycznych na gatunki zagrożone roślin stanowi podstawę do oceny ryzyka ich wyginięcia w najbliższym czasie. Celem pracy jest ocena wpływu wybranych czynników abiotycznych środowiska przyrodniczego (natężenia promieniowania słonecznego, temperatury powietrza atmosferycznego i temperatury gleby) na strukturę populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. na stanowisku w okolicach wsi Berżniki, w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej. Badania populacji prowadzono w sezonie wegetacyjnym 2014 roku, na powierzchni badawczej o łącznej wielkości 3447 m². Miejsce występowania badanej populacji zlokalizowano na podstawie danych uzyskanych od Pawlikowskiego.

W badanej populacji największą liczbę osobników (19,3%) odnotowano w odległości 5 m od drogi, przy natężeniu promieniowania słonecznego z zakresu 18-20 klx. Największe skupiska osobników generatywnych sasanki otwartej lokują się w odległości 5 m od drogi (3,8%), a osobników wegetatywnych w odległości do 8 m (74,6%). Największą liczbę pędów generatywnych (21,7%) i wegetatywnych (17,9%) stwierdzono u osobników w odległości 5 m od drogi, a pędów juwenilnych w odległości 6 m (29,2%). Obecność największej liczby osobników (68,1%) określono przy temperaturze powietrza powyżej 20°C i temperaturze gleby powyżej 10°C. Przy podanych wartościach temperatury, osobniki osiągają wysokość od 35 cm do 53 cm (przy średniej w populacji 19,4 cm) i rozpiętość przyziemnej rozety od 10 cm do 30 cm (przy średniej w populacji 8,1 cm).

Analiza wpływu czynników abiotycznych wykazała, że na analizowanym stanowisku panują korzystne warunki do wzrostu i rozwoju osobników w badanej populacji. Najwięcej osobników sasanki otwartej stwierdzono w miejscach, do których dociera duża ilość ciepła pochodzącego z nasłonecznienia, oraz odznaczających się najbardziej korzystnymi warunkami termicznymi dla funkcjonowania badanej populacji.

Słowa kluczowe: gatunek zagrożony, natężenie promieniowania słonecznego, temperatura powietrza atmosferycznego, temperatura gleby, północno-wschodnia Polska

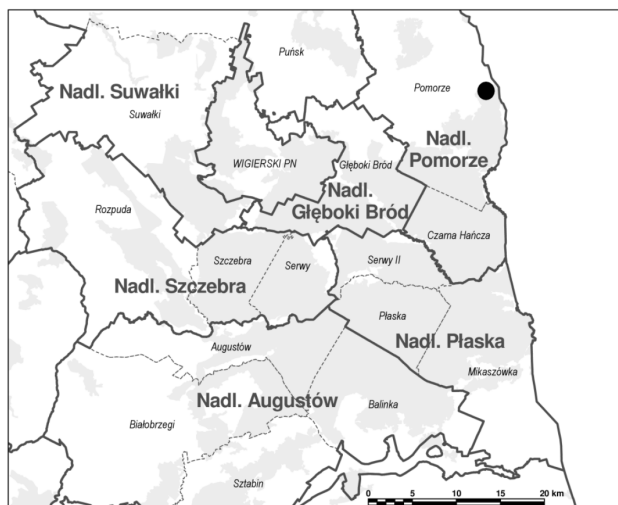
1. Wstęp

W procesach wzrostu i rozwoju gatunków roślin, jak podkreślają Larcher (2003), Schulze (2005), Hopkins i Hüner (2009), Nobel (2009), Hodson i Bryant (2012), zasadnicze znaczenie odgrywają czynniki środowiska przyrodniczego. Określenie wpływu czynników środowiskowych na gatunki zagrożone roślin nie tylko wnosi wiele danych do poznania prawidłowości ich rozwoju, ale także pozwala na ocenę ryzyka wyginięcia danego taksonu w najbliższym czasie. Szczególną rolę odgrywa również poszukiwanie optymalnych zakresów oddziaływania czynników środowiskowych do zachowania dalszej egzystencji zagrożonych wyginięciem taksonów. Celem pracy jest ocena wpływu wybranych czynników abiotycznych środowiska (natężenia promieniowania słonecznego, temperatury powietrza atmosferycznego i temperatury gleby) na strukturę populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. na stanowisku w okolicach wsi Berżniki, w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej. Sasanka otwarta jest to takson zagrożony w skali europejskiej i notowany w Załączniku II Dyrektywy Siedliskowej (92/43/EWG) oraz w Załączniku I Konwencji Berneńskiej. W Polsce podlega ścisłej ochronie gatunkowej i wymaga ochrony czynnej (Dz.U. z 2014 r., poz. 1409) oraz ochrony w formie wyznaczania obszarów Natura 2000 (Dz.U. z 2005 r., nr 94, poz. 795). Najlepiej zachowane i najliczniejsze populacje występują w północno-wschodniej części kraju. W miarę zbliżania się w kierunku zachodniej granicy zasięgu tego taksonu, jego stanowiska są coraz bardziej rozproszone i liczą pojedyncze osobniki (Wójtowicz 2000; Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003). W ramach prowadzonego monitoringu, odnotowuje się ciągły spadek liczby stanowisk i zmniejszanie się liczby osobników na stanowiskach występowania sasanki otwartej (Monitoring GIOŚ, 2010-2011). Wstępne obserwacje wykazały, że o możliwości zachowania i przetrwania tego gatunku w dużej mierze decydują warunki środowiskowe (Łaska, Sienkiewicz 2013). Analiza wpływu zmiennych warunków siedliska na populację pozwoliła na dokonanie oceny stanu zachowania i ogólnej kondycji osobników. Określenie w badaniach cech demograficznych, rozmieszczenia osobników i struktury przestrzennej populacji oraz struktury faz rozwojowych i struktury wielkości osobników, umożliwiło także ocenę stopnia zagrożenia gatunku w aspekcie opracowania skutecznych kierunków ochrony istniejących populacji (Łaska, Sienkiewicz 2014, 2015). Obecny stopień zagrożenia sasanki otwartej, obok określanych przez wielu autorów przyczyn zagrożenia tego gatunku (Żukowski, Jackowiak 1995; Parusel 1996; Nowak 1997; Tokarska-Guzik, Chmura 1998; Wójtowicz 2000; 2004; Nowak, Spałek 2002; Kącki 2003; Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008) wymaga identyfikacji

optymalnych warunków siedliskowych, w tym abiotycznych, do dalszej egzystencji populacji sasanki otwartej w północno-wschodniej części kraju.

2. Teren badań

Badania populacji sasanki otwartej prowadzono w północno-wschodniej Polsce, na obszarze Nadleśnictwa Pomorze w Puszczy Augustowskiej, na stanowisku w okolicach miejscowości Berżniki (ryc. 1). Jest to teren należący do sieci obszarów Natura 2000 jako Specjalny Obszar Ochrony Siedlisk „Ostoja Augustowska” PLH 200005 i Obszar Specjalnej Ochrony Ptaków „Puszcza Augustowska” PLB200002 (www.natura2000.gdos.gov.pl). Teren nadleśnictwa obejmuje kompleks leśny o powierzchni 15 864,4 ha, położony w północno-wschodniej części Puszczy Augustowskiej, z którego 6364 ha zajmują Obszary Chronionego Krajobrazu „Pojezierze Sejneńskie” oraz „Puszcza i Jeziora Augustowskie” (RDPL, Białystok). Teren ten odznacza się chłodnym klimatem, z cechami kontynentalizmu i z dużą liczbą dni mroźnych. Średnia temperatura roczna wynosi 6,6°C. Okres wegetacyjny jest krótki i trwa od 190 do 195 dni. Usłonecznienie wynosi średnio rocznie 1632 godziny. Liczba dni pogodnych z pełnym nasłonecznieniem jest niewielka i wynosi od 30 do 50 dni (Sokołowski 2010).



Rycina 1. Lokalizacja stanowiska sasanki otwartej na obszarze Puszczy Augustowskiej

Źródło: Opracowanie własne na podstawie danych z RDLP Białystok (2016)

3. Materiały i metody badań

Badania terenowe prowadzono w sezonie wegetacyjnym 2014 roku. Miejsce występowania badanej populacji sasanki otwartej zlokalizowano na podstawie informacji uzyskanych od Pawlikowskiego (dane niepubl.). Stanowisko występowania tego gatunku o łącznej powierzchni 3447 m² podzielono na mniejsze poletka podstawowe o wielkości 1 m². W trakcie prac terenowych odnotowano liczebność osobników na poszczególnych poletkach badawczych, z uwzględnieniem faz rozwojowych osobników (juwenilnej, wegetatywnej i generatywnej). Określono również wysokość osobników, średnicę przyziemnej rozety i liczbę pędów. Dodatkowo na stanowisku, w odstępach co 1 m od krawędzi drogi (przyjęto jako 0 m) w kierunku zwartego okapu lasu (do 23 m), wykonywano jednokrotny pomiar natężenia promieniowania słonecznego (na wysokości 1-2 cm nad powierzchnią ziemi), temperatury powietrza atmosferycznego (na wysokości 5 cm nad powierzchnią ziemi) i temperatury gleby (na głębokości 10 cm). Pomiaru temperatury powietrza atmosferycznego i temperatury gleby dokonywano przy użyciu wodoszczelnego pH-metru Elmetron CP401 (zakres od -50°C do 199,9°C), a natężenia światła słonecznego z wykorzystaniem wielofunkcyjnego urządzenia do pomiarów środowiskowych Voltcraft DT8820 (zakres od 20 do 20000 lx). Wartości natężenia promieniowania słonecznego podano w kiloluxach (klx=10⁻³ lx).

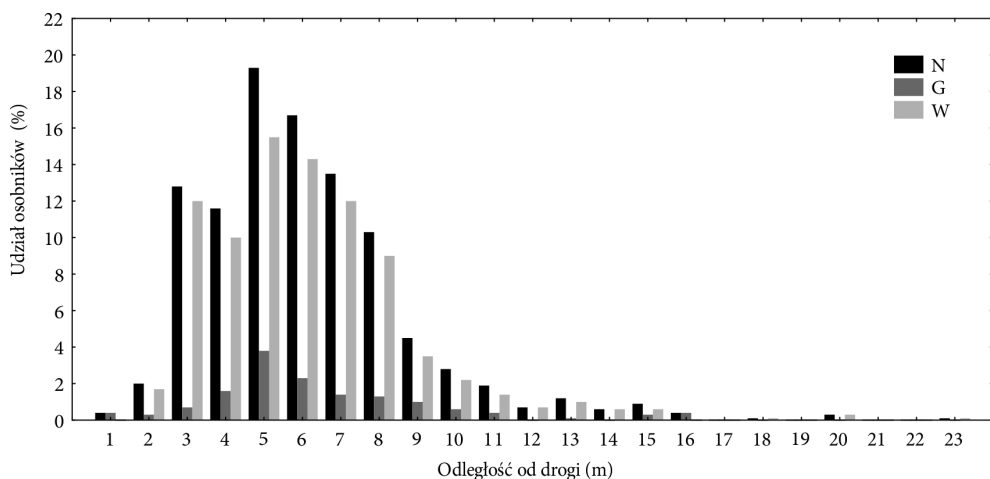
4. Wyniki badań

4.1. Liczebność i rozmieszczenie osobników oraz struktura faz rozwojowych a wpływ natężenia promieniowania słonecznego

W badaniach stwierdzono, że w populacji sasanki otwartej liczebność i rozmieszczenie osobników związane jest z natężeniem promieniowania słonecznego. Zaobserwowano, że istnieje zależność pomiędzy rozmieszczeniem osobników w badanej populacji a panującymi warunkami świetlnymi. W analizowanej populacji określono występowanie 690 osobników w odległości od 1 m do maksymalnie 23 m w kierunku zwartego okapu lasu. Największą liczbę osobników sasanki otwartej (19,3%) odnotowano w odległości 5 m od drogi, przy natężeniu promieniowania słonecznego z zakresu 18-20 klx. Mniejszą liczbę osobników tego gatunku (16,7%) obserwowano w odległości 6 m od drogi. Najmniejszą liczbę osobników (1%) odnotowano powyżej 15 m od drogi, przy natężeniu promieniowania słonecznego poniżej 10 klx.

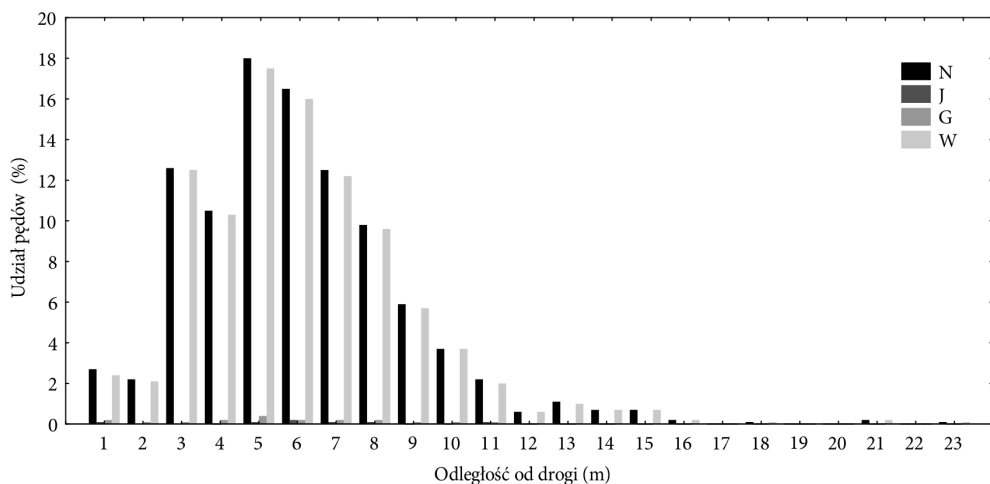
Badania wykazały, że wraz ze zwiększającą się odległością od drogi i malejącym natężeniem promieniowania słonecznego, zmniejsza się liczba osobników saskanki otwartej w poszczególnych fazach rozwoju. W badanej populacji obecność osobników generatywnych stwierdzono maksymalnie w odległości do 16 m od drogi (0,7%), ale największe ich skupiska lokują się bliżej drogi w warunkach dobrego nasłonecznienia, w odległości 5 m od drogi (3,8%). Odległość do 23 m stanowi granicę występowania osobników wegetatywnych (0,2%), a w odległości 5 m od drogi odnotowano największą liczbę osobników w tej fazie rozwoju (16,4%). Istotna liczba osobników wegetatywnych lokuje się w odległości nie większej niż do 8 m (74,6%) (ryc. 2). W miarę zbliżania się do zwartego okapu lasu, liczba osobników w poszczególnych fazach rozwoju maleje.

W badaniach stwierdzono również zależność pomiędzy liczbą pędów a natężeniem promieniowania słonecznego. Największą liczbę pędów generatywnych (21,7%) i pędów wegetatywnych (17,9%) zaobserwowano u osobników w odległości 5 m od drogi. Największą liczbę pędów juvenilnych odnotowano u osobników w odległości 6 m od drogi (29,2%). U osobników występujących przy największych wartościach promieniowania słonecznego, określono do 13 pędów kwiatowych, przy przewadze 1 pędowych osobników generatywnych (ryc. 3).



Rycina 2. Udział całkowitej liczby osobników (N), liczby osobników generatywnych (G) i wegetatywnych (W) w badanej populacji w zależności od odległości od drogi

Źródło: opracowanie własne.

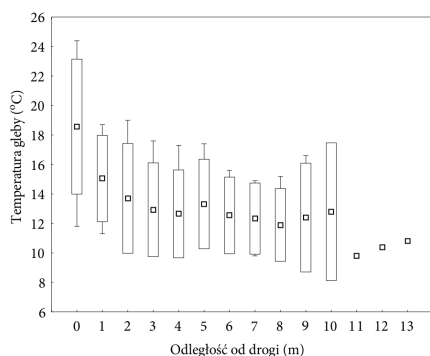
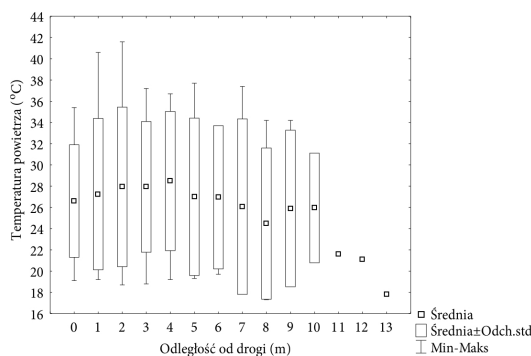


Rycina 3. Udział całkowitej liczby pędów (N), liczby pędów juwenilnych (J), generatywnych (G) i wegetatywnych (W) w badanej populacji w zależności od odległości od drogi

Źródło: opracowanie własne.

4.2. Liczebność i rozmieszczenie osobników oraz struktura wielkości a wpływ temperatury powietrza atmosferycznego i temperatury gleby

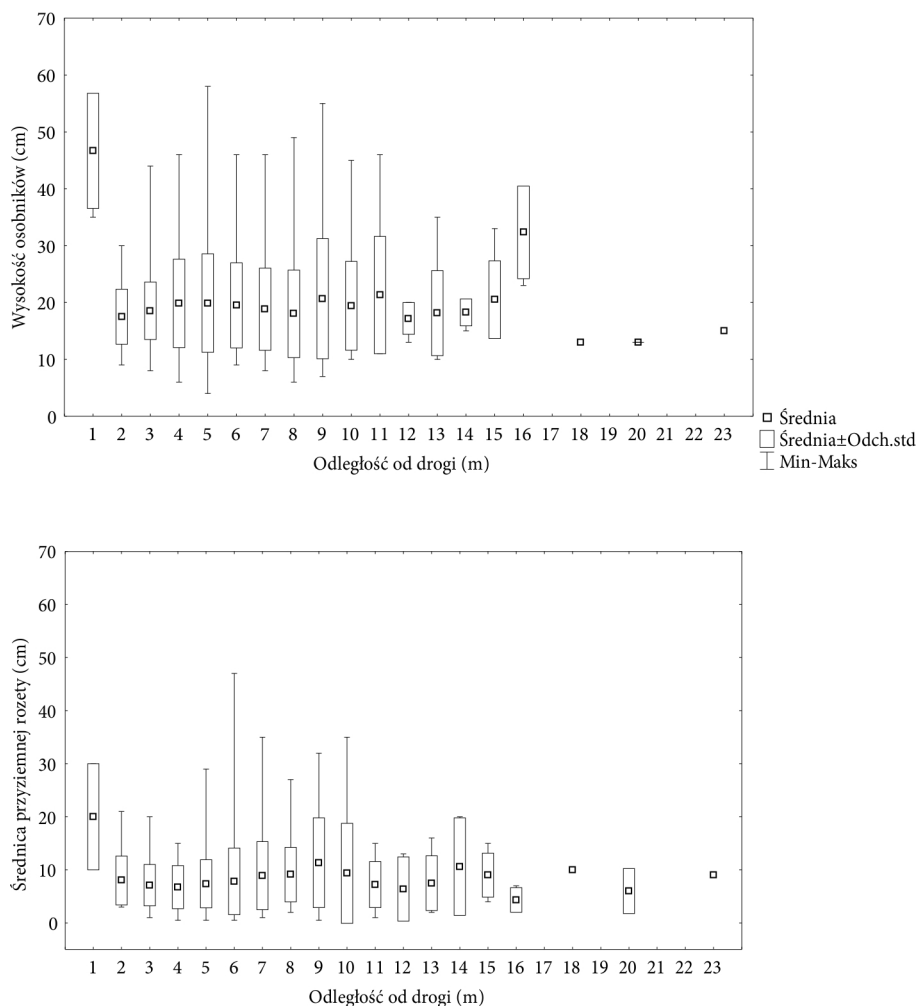
W badaniach zaobserwowano, że istnieje zależność pomiędzy odległością od drogi a wartościami temperatury powietrza atmosferycznego i temperatury gleby. Wraz z oddalaniem się od drogi w kierunku zwartego okapu lasu, badane wartości maleją. Badania wykazały, że średnia temperatura powietrza, określona w odległości 1 m od drogi, osiąga większe wartości ($27,25 \pm 7,13$) niż średnia temperatura odnotowana w odległości 10 m od drogi ($25,95 \pm 5,16$). W odległości 13 m od drogi odnotowano temperaturę powietrza na poziomie $17,8^\circ\text{C}$. Wraz ze wzrostem odległości od drogi w kierunku zwartego okapu lasu, temperatura powietrza maleje o 10°C . Badania wykazały także większą średnią temperaturę gleby bliżej drogi ($18,57 \pm 4,58$) niż w odległości 10 m od krawędzi drogi ($12,80 \pm 4,67$). Wraz z malejącą odległością od drogi, temperatura gleby wzrasta o 8°C (ryc. 4).



Rycina 4. Zmienność temperatury powietrza i temperatury gleby w odległości od drogi do wnętrza lasu w badanej populacji na obszarze Puszczy Augustowskiej

Źródło: opracowanie własne.

W badanej populacji sasanki otwartej określono związek pomiędzy wielkością osobników a panującymi warunkami termicznymi. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się wysokość i rozpiętość przyziemnej rozety osobników tego gatunku w populacji. Przy temperaturze powietrza powyżej 20°C i temperaturze gleby powyżej 10°C, określono obecność 470 osobników, w tym 77 osobników generatywnych i 393 osobników wegetatywnych. Przy temperaturze powietrza powyżej 20°C i temperaturze gleby poniżej 10°C, w badanej populacji odnotowano obecność 45 osobników, w tym 5 osobników generatywnych i 40 osobników wegetatywnych. Przy temperaturze powietrza poniżej 20°C i temperaturze gleby poniżej 10°C, określono występowanie 175 osobników sasanki otwartej, w tym 20 osobników generatywnych i 155 osobników wegetatywnych. Osobniki tego gatunku, występujące w odległości 1 m od drogi, osiągają wysokość od 35 cm do 53 cm, w odległości 5 m od drogi – od 4 cm do 58 cm, a w odległości 10 m od drogi charakteryzują się wysokością od 10 cm do 45 cm, przy średniej wysokości osobników w badanej populacji sasanki otwartej wynoszącej 19,4 cm. Osobniki występujące w odległości 1 m od drogi osiągają wielkość średnicy przyziemnej rozety od 10 cm do 30 cm, w odległości 5 m od drogi – od 0,5 cm do 29 cm, a w odległości 10 m od drogi charakteryzują się rozpiętością przyziemnej rozety od 0,5 cm do 35 cm, przy średniej wartości tej cechy w badanej populacji wynoszącej 8,1 cm (ryc. 5).



Rycina 5. Wysokość i rozpiętość przyziemnej rozety osobników sasanki otwartej w zależności od odległości od drogi w badanej populacji na obszarze Puszczy Augustowskiej

Źródło: opracowanie własne.

5. Dyskusja

Na procesy wzrostu i rozwoju osobników sasanki otwartej na badanym stanowisku mają wpływ abiotyczne czynniki środowiska przyrodniczego. Stwierdzono, że osiągnięcie przez osobniki kolejnych etapów cyklu życiowego, związane jest z obecnością korzystnych wartości insolacji świetlnej, temperatury powietrza i temperatury gleby. W badanej populacji największą liczbę osobników sasanki

otwartej odnotowano przy natężeniu promieniowania słonecznego z zakresu 18-20 klx, temperaturze powietrza powyżej 20°C i temperaturze gleby powyżej 10°C. Podobne różnice w liczbie osobników, w zależności od wartości analizowanych czynników abiotycznych, określono w Nadleśnictwie Supraśl w Puszczy Knyszyńskiej (Sienkiewicz 2012) i w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej (Sienkiewicz 2014). Osobniki bytujące w warunkach środowiska zaspokajających w pełni ich wymagania życiowe wytwarzają większe nasiona, z których rozwija się przeważnie większe potomstwo. Świadczy to o większych możliwościach reprodukcyjnych populacji. Zapewnia także populacji większą zdolność owocowania, a w konsekwencji tego, większą liczbę nasion, większe zagęszczenie osobników na 1 m² i większą liczbę skupisk oraz zagęszczenie osobników w skupiskach (Falińska 2004). Mała wielkość populacji prowadzi do „genetycznej erozji”, co może znacznie ograniczać zakwitanie, produkcję nasion czy też w konsekwencji – wpływać na przetrwanie osobników w populacji (Dudach, Fenster 2000; Oostermeijer i in. 2000).

W badaniach określono, że liczebność i rozmieszczenie osobników sasanki otwartej związane jest z panującymi warunkami świetlnymi. Analiza miejsc występowania taksonu, w zależności od intensywności promieniowania słonecznego wykazała, że najwięcej osobników zlokalizowanych jest w miejscach prześwietlonych oraz słabo ocienionych. Podobnie, badania prowadzone w Estonii (Pilt, Kukk 2002) wykazały zależność pomiędzy liczbą osobników a natężeniem światła słonecznego. Stwierdzono, że najliczniejsze populacje sasanki otwartej (liczące do 10000 osobników) zlokalizowane są na otwartych i półotwartych siedliskach o dużym natężeniu insolacji świetlnej. W badaniach prowadzonych w Myszynieckich Borach Sasankowych i na Poligonie Orzysz odnotowano większą liczbę osobników, w tym większą liczbę osobników kwitnących i owocujących oraz większą liczbę kwiatów na pojedynczym osobniku na stanowiskach nieleśnych (Juśkiewicz-Swaczyna, Grzybowski 2013). Dlatego też wielu autorów podkreśla istotny wpływ pokrycia przez poszczególne warstwy roślinności na strukturę i dynamikę populacji tego gatunku (Uotila 1969; Kalliovirta i in. 2003, 2006; Röder, Kiehl 2006; Juśkiewicz-Swaczyna 2010; Juśkiewicz-Swaczyna, Choszcz 2012; Łaska, Sienkiewicz 2013). Kalamees i in. (2005) wskazują, że kiełkowanie i wzrost osobników sasanki otwartej przebiega najkorzystniej w miejscach wypalanych oraz charakteryzujących się wczesną fazą sukcesji. Najbardziej odpowiednie populacje tego taksonu w północno-wschodniej Polsce, na terenie Puszczy Augustowskiej rozwijają się w sąsiedztwie linii kolejowej, gdzie pasy roślinności przy torach oraz runo w brzeżnej części lasu ulegają często pożarom. Znaczna liczebność populacji określona na stanowisku zlokalizowanym w pobliżu miejscowości Berżniki w Nadleśnictwie Pomorze wystę-

puje w miejscu wielkoobszarowego pożaru z początku lat 80. XX wieku (Pawlikowski, dane niepubl.; Monitoring GIOŚ 2010-2011).

Analiza miejsc występowania populacji wykazała także związek wielkości osobników sasanki otwartej z panującymi warunkami termicznymi. W badaniach określono, że osobniki występujące przy drodze, w warunkach najbardziej korzystnych pod względem termicznym, osiągają dwukrotnie większą wielkość w porównaniu z osobnikami obecnymi bliżej zwartego okapu lasu. Warunki termiczne panujące w miejscu występowania populacji sasanki otwartej mogą być także wyznacznikiem możliwości kiełkowania nasion (Baskin, Baskin 2014). Badania prowadzone w Finlandii wykazały, że przy temperaturze powietrza mniejszej średnio o 1,4-3,0°C i przy średnich opadach w zakresie od 40% do 60%, nie odnotowano obecności nowych osobników tego gatunku w populacjach. Natomiast w wyniku badań prowadzonych w tym samym czasie w warunkach laboratoryjnych, większość nasion wykiełkowała (Kalliovirta, dane niepubl.). Autorzy twierdzą zatem, że wszystkie odnotowane osobniki juwenilne sasanki otwartej w badanych populacjach wykiełkowały w roku ubiegłym, w warunkach klimatu bardziej korzystnych dla tego taksonu (Kalliovirta i in. 2006).

Ocena wpływu czynników abiotycznych wykazała, że na analizowanym stanowisku panują korzystne warunki do wzrostu i rozwoju osobników w badanej populacji. Najwięcej osobników sasanki otwartej stwierdzono w miejscach, do których dociera duża ilość ciepła pochodzącego z nasłonecznienia oraz odznaczających się najbardziej korzystnymi warunkami termicznymi dla funkcjonowania badanej populacji. W ocenie oddziaływania czynników abiotycznych środowiska na stan zachowania badanej populacji, należy uwzględnić również wpływ innych czynników klimatycznych, takich jak: grubość pokrywy śnieżnej, temperaturę zimą czy wysokość opadów. Poznanie poziomów czynników abiotycznych środowiska, wpływających pozytywnie na stan zachowania badanej populacji, umożliwia ocenę ryzyka wyginięcia tego taksonu. Jest to szczególnie ważne, ponieważ liczba populacji oraz liczebność osobników w poszczególnych populacjach mogą podlegać w kolejnych latach znacznym wahaniom, co uniemożliwia prawidłową ocenę ryzyka wyginięcia tego gatunku (Wójtowicz 2000; Pilt, Kukk 2002; Kalliovirta i in. 2006; Juśkiewicz-Swaczyna 2010).

Literatura

Baskin C.C., Baskin J.M., 2014. *Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. 2th edn. Academic Press, San Diego, California.

- Dudash M.R., Fenster C.B., 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. [W:] Young A.G., Clarke G.M. (red.), Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge University Press, Cambridge, 35-53.
- Falińska K., 2004. Ekologia roślin. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Hodson M.J., Bryant J.A., 2012. Functional biology of plants. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Hopkins W.G., Hüner N.P.A., 2009. Introduction to plant physiology. 4th edn. The University of Western Ontario, Wiley&Sons, New Jersey.
- Juśkiewicz-Swaczyna B., 2010. Population structure of *Pulsatilla patens* in relation to the habitat quality. Tuexenia, 30: 457-466.
- Juśkiewicz-Swaczyna B., Choszcz D., 2012. Effect of habitat quality on the structure of populations of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*) – rare and endangered species in European flora. Pol. J. Ecol., 60(3): 565-574.
- Juśkiewicz-Swaczyna B., Grzybowski M., 2013. Effect of environmental factors on the structure of populations of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Pol. J. Natur. Sci., 28(3): 349-362.
- Kalamees R., Püssa K., Vanha-Majamaa I., Zobel K., 2005. The effects of fire and stand age on seedling establishment of *Pulsatilla patens* in a pine dominated boreal forest. Can. J. Bot., 83: 688-693.
- Kalliovirta M., Kukk Ü., Rytteri T., 2003. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. [W:] Rytteri T., Kukk Ü., Kull T., Jäkäläniemi A., Reitalu M. (red.), Monitoring of threatened vascular plants in Estonia and Finland – methods and experiences. Finn. Environ., 659: 37-47.
- Kalliovirta M., Rytteri T., Heikkinen R.K., 2006. Population structure of a threatened plant, *Pulsatilla patens*, in boreal forests: modelling relationships to overgrowth and site closure. Biodiv. Cons., 15: 3095-3108.
- Kącki Z., (red.) 2003. Zagrożone gatunki flory naczyniowej Dolnego Śląska. Instytut Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Tow. Przyjaciół Przyrody „Pro Natura”, Wrocław.
- Larcher W., 2003. Physiological plant ecology. 4th edn. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Łaska G., Sienkiewicz A., 2013. Stan zachowania i zagrożenie populacji *Pulsatilla patens* (L.) Mill. pod wpływem zmiennych warunków środowiska przyrodniczego w Puszczy Knyszyńskiej. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska. Wyd. PTB, Białystok, 143-154.
- Łaska G., Sienkiewicz A., 2014. Stan zachowania i zagrożenie populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej. [W:] Łaska G. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów. Wyd. PTB, Białystok, 143-152.
- Łaska G., Sienkiewicz A., 2015. Stan zachowania i zagrożenie populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosyste-

- mu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja. Wyd. PTB, Białystok, 117-128.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., (red.) 2008. Czerwona Księga Karpat Polskich. Rośliny naczyniowe. Inst. Bot. im. W. Szafera, PAN, Kraków.
- Nobel P.S., 2009. Physicochemical and environmental plant physiology. 4th edn. CA Academic Press, Elsevier.
- Nowak A., 1997. Nowe stanowisko sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w okolicach Bolesławia we wschodniej części Garbu Tarnogórskiego. Acta Biol. Sil., 30(47): 161-164.
- Nowak A., Spałek K., 2002. Czerwona Księga Roślin Województwa Opolskiego. Rośliny naczyniowe wymarłe, zagrożone i rzadkie. Polskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, Opole.
- Oostermeijer J.G.B., 2000. Population viability analysis of the rare *Gentiana pneumonanthe*: the importance of genetics, demography and reproductive biology. [W:] Young A.G., Clarke G.M. (red.), Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge University Press, Cambridge.
- Parusel J.B., (red.) 1996. Czerwona lista roślin naczyniowych Górnego Śląska. Centrum Dziedzictwa Przyrodniczego Górnego Śląska. Raporty, opinie 1: 8-42.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z., 2003. Flora Polski – atlas roślin chronionych. MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa.
- Pilt I., Kukk Ü., 2002. *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) in Estonia: distribution and ecology. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol., 51: 242-256.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz.U. z 2014 r., poz. 1409).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 maja 2005 roku w sprawie typów siedlisk przyrodniczych oraz gatunków roślin i zwierząt, wymagających ochrony w formie wyznaczania obszarów Natura 2000 (Dz.U. z 2005 r., Nr 94, poz. 795).
- Röder D., Kiehl K., 2006. Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. Flora, 201: 499-507.
- Schulze E.D., Beck E., Müller-Hohenstein K., 2005. Plant ecology. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Sienkiewicz A., 2012. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in the Knyszyńska Forest on background of abiotic disorders. [W:] Łaska G. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu, Wyd. PTB, Białystok, 103-116.
- Sienkiewicz A., 2014. Wpływ czynników abiotycznych na strukturę populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej. [W:] Łaska G. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów. Wyd. PTB, Białystok, 251-260.

- Sokołowski A.W., 2010. Puszcza Augustowska. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa.
- Tokarska-Guzik B., Chmura D., 1998. Stanowisko sasanki otwartej na „Górze Sodowej” w Jaworznie. Przyroda Górnego Śląska, 14.
- Uotila P., 1969. Ecology and area of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in Finland. Ann. Bot. Fenn., 6: 105-111.
- Wójtowicz W., 2000. Biologia, wymagania siedliskowe i możliwości uprawy zachowawczej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Biul. Ogr. Bot., 9: 45-54.
- Wójtowicz W., 2004. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Sasanka otwarta. [W:] Werblan-Jakubiec H., Sudnik-Wójcikowska B. (red.), Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000, 9: 168-171.
- Żukowski W., Jackowiak B., 1995. Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Zachodniego i Wielkopolski. Prace Zakładu Taksonomii Roślin UAM nr 3.

Holocenna sukcesja roślinności przybrzeżnej jeziora humusowego Suchar Zachodni (Wigierski Park Narodowy)

Danuta Drzymulska*

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Paleobotaniki

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

* e-mail: drzym@uwb.edu.pl

Streszczenie: Jeziora humusowe to specyficzne zbiorniki wodne, charakteryzujące się między innymi, brązowym zabarwieniem wody, jej niskim pH, zatorfioną zlewnią oraz płem torfowcowym nasuwającym się na lustro wody. W krajobrazie młodoglacjalnym Wigierskiego Parku Narodowego (WPN) odnotowano obecność kilkunastu tego typu obiektów. Jednym z nich jest Suchar Zachodni. W celu poznania historii roślinności subfossylnej jego przybrzeża, pobrano rdzeń osadu, a uzyskany materiał poddano analizie roślinnych szczątków makroskopowych oraz badaniom stopnia rozkładu torfu. Data radiowęglowa próby spągowej wskazała na okres preborealny holocenu jako czas powstania torfowiska przybrzeżnego Suchara Zachodniego. Rozwój roślinności następował tam w zmiennych warunkach hydrologicznych, o czym świadczą liczne wstawki osadu limnicznego typu dy w profilu. Roślinność torfowiskowa przybrzeża początkowo oscylowała wokół zbiorowisk torfowisk mszarnych przejściowych z torfowcami z sekcji *Palustria*, *Cuspidata* i *Subsecunda*, później zaś, w najmłodszym okresie funkcjonowania jeziora, rozwinął się mszar wysokotorfowiskowy ze *Sphagnum magellanicum* i *Sphagnum fallax* oraz krzewinkami z rodziny Ericaceae.

Słowa kluczowe: Wigierski Park Narodowy, holocen, jezioro humusowe, makroszczątki roślinne, zbiorowisko subfossylne

1. Wstęp

Jeziora humusowe (dystroficzne) to zbiorniki wodne posiadające szereg specyficznych cech, takich jak brązowe zabarwienie wody, pło torfowcowe w strefie przybrzeżnej, zatorfiona porośnięta drzewami szpilkowymi zlewnia, niskie pH wody, mała zawartość jonów wapnia w wodzie i osadach, czy też niska bioróżnorodność (Hessen, Tranvik 1998; Gąbka, Owsiany 2006). Stan humotrofii jest determinowany głównie przez obecność roślinności szpilkowej porastającej zlewnię. Lasy szpilkowe są bowiem źródłem substancji humusowych, które, docierając w znacznych ilościach do jeziora, powodują zakwaszanie jego wód (De Haan 1992; Kullberg i in. 1993). Według Górniaka (2006), o stanie troficznym każdego jeziora można wnioskować na podstawie parametru zwanego hydrochemicznym wskaźnikiem dystrofii HDI (ang. *Hydrochemical Dystrophy Index*). Dla zbiorników dystroficznych, parametr ten przyjmuje wartość co najmniej 50.

Obszarem obfitującym w jeziora humusowe jest Wigierski Park Narodowy (WPN), gdzie zbiorniki te zwane są „sucharami”. Rozwój części z nich był przedmiotem badań prowadzonych przez Drzymulską i in. (2013, 2015) oraz Drzymulską i Zielińskiego (2013). Jeziorem, którego historia była do tej pory zupełnie nieznaną jest Suchar Zachodni. Za cel pracy postawiono odtworzenie subfosalnych zbiorowisk roślinnych jakie funkcjonowały w zatorfionej strefie przybrzeżnej tego zbiornika od początku jej funkcjonowania. Przewiduje się, że wyniki badań dadzą podstawy do rekonstrukcji warunków środowiskowych w jakich jezioro funkcjonowało w przeszłości.

2. Materiał i metody

Osad do badań został pobrany w strefie przybrzeżnej Suchara Zachodniego, przy użyciu świdra typu Instorf (puszka o długości 50 cm i średnicy 8 cm). Uzyskany rdzeń torfowy długości 700 cm został podzielony na odcinki o długości 10 cm. Próby torfu pobrane bezpośrednio z rdzenia poddawane były analizie stopnia rozkładu według Obidowicza (1990). W przypadku prób z pogranicza torfu i dy (ostatecznie zaliczonych do torfu), nie wykonywano tej analizy. Kolejne próby osadu (o objętości 50 cm³) pobierano do analizy makroskopowych szczątków roślinnych. Umieszczony w wodzie destylowanej materiał poddawano działaniu 10% roztworu KOH, co umożliwiało dokładną dyspersję grudek torfu. Tak przygotowaną zawiesinę gotowano, a po ostudzeniu, przemywano na sicie o gęstości 0,2 mm pod stru-

mieniem wody bieżącej, aż do pojawienia się całkowicie czystej wody. Zeszlamowana, pozbawiona humusu pozostałość torfu, była umieszczana na szalce Petriego.

Analizie roślinnych szczątków makroskopowych poddano 48 prób osadu (torfu i sapropelu). Przy użyciu mikroskopu stereoskopowego, w każdej z przygotowanych prób torfu wyszukiwano znaleziska pochodzenia generatywnego (owoce, nasiona, łuski owocowe). Znaleziska z danej próby torfu przenoszono do oddzielnej szalki Petriego wysłanej bibułą filtracyjną, nasączoną płynem konserwującym zawierającym tymol (Tobolski 2000). Z pozostałości torfowej wykonywane były preparaty mikroskopowe do analizy szczątków wegetatywnych, takich jak: liście, ryzoderma, epiderma, peryderma, kłącza, korzenie, łodyżki i gałązki mszaków, drewno i węgle drzewne. Do ustalania przynależności taksonomicznej znalezisk, posłużył mikroskop optyczny. Ocena ilościowa szczątków była wykonywana dla 10 pól widzenia z dokładnością do 5%. Uwzględniano jedynie szczątki z zachowaną strukturą komórkową. Taksony, których tkanki pojawiały się w ilościach śladowych, oznaczono za pomocą symbolu „+”. W przypadku mchów brunatnych (rozumianych jako przedstawiciele podklas prątników i płonników), zastosowano określenie „Bryales”.

Skład botaniczny torfu, będąc wskaźnikiem jego pochodzenia, posłużył za podstawę do określenia jednostek torfu. Kolejny etap pracy stanowiła rekonstrukcja roślinnych zbiorowisk subfosalnych. Informacji o wieku złoża dostarczyło datowanie radiowęglowe próby spągowej. Zostało ono wykonane w Laboratorium Radiowęglowym AMS w Gliwicach.

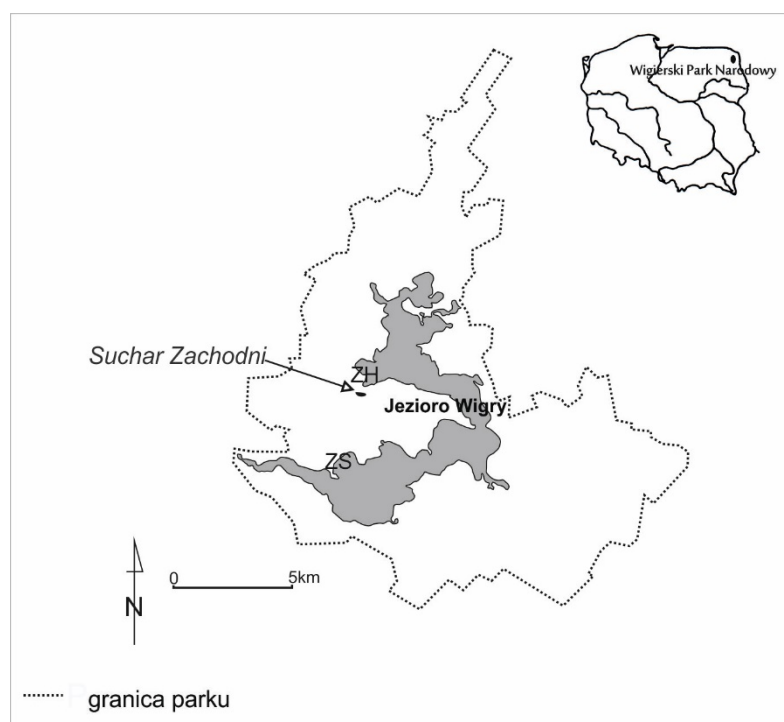
3. Teren badań

Wigierski Park Narodowy (WPN) położony jest w Polsce północno-wschodniej, na obszarze Pojezierza Wschodniosuwalskiego i Wyżyny Augustowskiej, które stanowią część Pojezierza Litewskiego (Kondracki 1994). Obszar ten został ukształtowany podczas fazy pomorskiej głównego stadiału zlodowacenia Wisły (Marks 2002). Młodoglacjalny charakter obszaru znajduje swoje odzwierciedlenie w licznych kemach, morenach czołowych i ozach obecnych w północnej części parku. Klimat WPN jest umiarkowany przejściowy, z tendencją w kierunku kontynentalizmu.

Suchar Zachodni jest jednym z kilkunastu zbiorników o rozwoju dysharmijnym, funkcjonujących w młodoglacjalnym krajobrazie Wigierskiego Parku Narodowego, w najbliższym otoczeniu Jeziora Wigry (Górniak 2006). Położony jest pomiędzy Zatoką Hańczańską Wigier na północy a Zatoką Słupiańską na południu

(Ryc. 1). Podobnie jak inne suchary wigierskie, jest to jezioro niewielkie, o powierzchni zaledwie 1,05 ha, i głębokości maksymalnej 2 m.

Suchar Zachodni posiada szeroki pas pła nasuwającego się na lustro wody (Ryc. 2). Tak, jak w większości pozostałych sucharów, w analizowanym przypadku odnotowano wyraźną strefowość przybrzeża (Pawlikowski i in. 2014). Pierwsza strefa, wyróżniana najbliżej lustra wody, to pło grzaskie z *Rhynchospora alba* (L.) Vahl, *Scheuchzeria palustris* L., *Carex limosa* L., *Carex rostrata* Stokes i *Carex lasiocarpa* Ehrh. oraz mchami torfowcami: *Sphagnum angustifolium* (Russ.) C. Jens. i *Sphagnum fallax* H. Klinggr. Następnie występuje pło stabilne z: *Eriophorum vaginatum* L., *Sphagnum magellanicum* Brid., *Andromeda polifolia* L., *Vaccinium oxycoccos* L. i *Drosera rotundifolia* L. Najbardziej oddalona od lustra wody jest strefa sosnowego boru bagiennego na torfie, z: *Pinus sylvestris* L., *Picea abies* (L.) Karsten, *Betula pubescens* Ehrh. oraz *Ledum palustre* L., *V. uliginosum* L., *Vaccinium oxycoccos* L., *Pleurozium schreberi* (Willd.) Mitten i *Dicranum polysetum* Sw.



Rycina 1. Lokalizacja Suchara Zachodniego w Wigierskim Parku Narodowym

Objaśnienia: ZH – Zatoka Hańczańska, ZS – Zatoka Słupiańska



Rycina 2. Suchar Zachodni z płem widocznym na pierwszym planie (Fot. D. Drzymulska)

4. Wyniki

W rezultacie badań, zidentyfikowano szczątki należące do 33 taksonów roślinnych różnej rangi: sekcje, gatunki, rodzaje, rodziny. Wyniki analiz makroszczątkowych prezentuje rycina 3. Rozpoznano taksony charakterystyczne dla czterech klas roślinności: *Potametea* – 8 (*Potamogeton natans*, *Potamogeton* cf. *filiformis*, *Potamogeton* sp., *Najas marina*, *Caulinia flexilis*, *Nymphaea alba*, *Nuphar lutea*, Nymphaeaceae), *Scheuchzerio-Cariceta nigrae* – 7 (*Scheuchzeria palustris*, *Menyanthes trifoliata*, *Sphagnum teres*, *Sphagnum* sec. *Subsecunda*, *Meesea triquetra*, *Drepanocladus* sp., *Calliergon* sp.), *Oxycocco-Sphagnetes* – 5 (*Eriophorum vaginatum*, Ericaceae, *Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum fallax*, *Sphagnum* sec. *Acutifolia*) i *Phragmitetea* – 1 (*Phragmites australis*).

Rośliny zidentyfikowane na podstawie szczątków pogrupowano także zgodnie z ich formami morfologicznymi i przynależnością systematyczną: drzewa i krzewy – 5 taksonów, krzewinki – 1, rośliny kwiatowe zielne – 15, mchy torfowce – 8, mchy brunatne – 4.

W badanym profilu wyznaczono trzy lokalne poziomy makroszczątkowe (SZ-1, SZ-2 i SZ-3) (Tab. 1; Ryc. 3). Na tej podstawie zidentyfikowano dwie jednostki torfu: torf wysoki, sfagnowy, słabo rozłożony (stopień rozkładu torfu wynosi 5%) i torf przejściowy, sfagnowy głównie średnio i silnie rozłożony. Torf wysoki sfa-

gnowy wyróżniono w obu stropowych podpoziomach makroszczątkowych (SZ-2 i SZ-3). Zatem ich wyróżnienie nie znalazło odzwierciedlenia w typologii osadu, bowiem torf wysoki sfagnowy rozpoznano zarówno w przypadku dominacji *Sphagnum fallax*, jak i *Sphagnum magellanicum* (Ryc. 3). Data radiowęglowa (GdA-2374: 9245 ± 35 ^{14}C BP, po kalibracji 10545-10270 cal BP) próby spągowej rdzenia wiąże powstanie osadu z okresem preborealnym holocenu.

Zrekonstruowano następujący ciąg sukcesyjny roślinnych zbiorowisk subfosalnych strefy przybrzeżnej Suchara Zachodniego: zbiorowiska mszarne torfowisk przejściowych (SZ-1) → zbiorowiska mszaru wysokotorfowiskowego (SZ-2 i SZ-3).

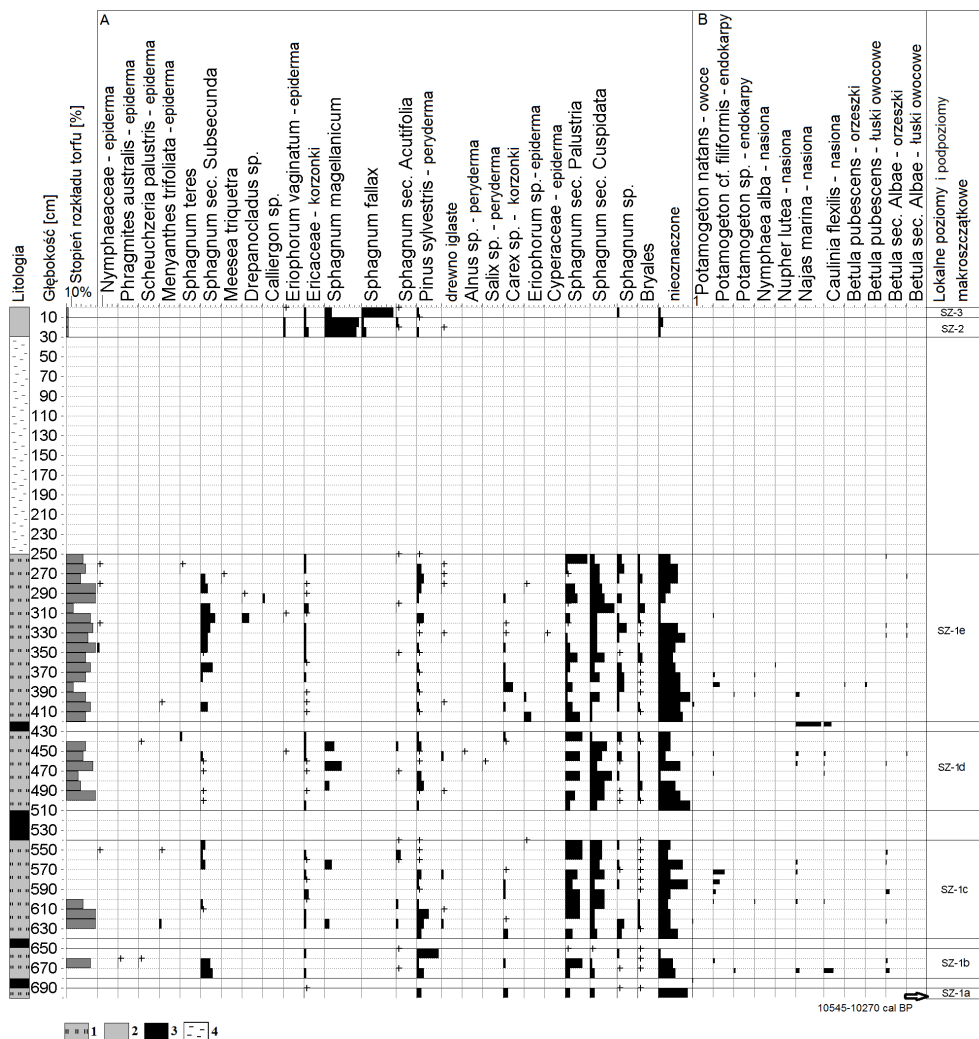
Tabela 1. Lokalne poziomy makroszczątkowe i jednostki torfu w profilu z Suchara Zachodniego

Poziom	Jednostka torfu	Głębokość (cm)	Opis lokalnego poziomu makroszczątkowego
SZ-1 (podpoziomy a-e)	sfagnowy przejściowy	700-250	Współdominacja szczątków torfowców z sekcji <i>Subsecunda</i> (maks. 30%), <i>Palustria</i> (maks. 45%) i <i>Cuspidata</i> (maks. 50%). Uzupełnienie stanowią szczątki sosny zwyczajnej <i>Pinus sylvestris</i> , korzonki wrzosowatych Ericaceae i mchów brunatnych Bryales.
SZ-2	wysoki sfagnowy	30-10	Dominacja szczątków <i>Sphagnum magellanicum</i> (maks. 70%). Towarzyszą im korzonki wrzosowatych Ericaceae, epiderma wełnianki pochwowatej <i>Eriophorum vaginatum</i> i szczątki <i>Sphagnum fallax</i> .
SZ-3		10-0	Liście i gałązki <i>Sphagnum fallax</i> stanowią 65% szczątków. W niewielkich ilościach występują też korzonki wrzosowatych Ericaceae, epiderma wełnianki pochwowatej <i>Eriophorum vaginatum</i> i szczątki <i>Sphagnum magellanicum</i> .

5. Dyskusja

Początek akumulacji biogenicznej w strefie przybrzeżnej Suchara Zachodniego sięga okresu preborealnego. Poziom wód gruntowych był wówczas na tyle wysoki, aby mogło rozwinąć się tam torfowisko o charakterze przejściowym. Jest to zgodne z danymi literaturowymi na temat poziomu wody w jeziorach i torfowiskach z terenu Polski północnej, w początkowym okresie holocenu (np. Ralska-Jasiewiczowa, Starkel 1988). Spośród sucharów wigierskich, podobny wiek najstarszych osadów biogenicznych w przybrzeżu odnotowano także w Jeziorze Ślepym, położonym przy południowym brzegu Wigier (Drzymulska i in. 2014). Natomiast mszar przejściowy, jako zbiorowisko inicjalne, odnotowano także w rejonie Suchara III (Drzymulska i in. 2013). Przy czym w tym ostatnim obiekcie wkroczyło ono na podłoże organiczne, czego dowodzi zaleganie torfu na warstwie dy (sapropel?; odnośnie typologii osadu patrz: Drzymulska i in. 2014), natomiast w Sucharze Zachodnim mszar pojawił się bezpośrednio na gruncie mineralnym. Torfowisko przejściowe funkcjonowało prawdopodobnie dość długo, o czym świadczyć może około czterometrowa miąższość torfu przejściowego sfagnowego, zawierającego szczątki torfowców, w tym z sekcji *Subsecunda*, mchów brunatnych, tkanki turzyc *Carex* sp., ale także perydermę sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris*. Subfossylne zbiorowiska mszarne torfowisk przejściowych wyróżniono także w rozwoju złóż torfowych wokół Suchara VI i Jeziora Widnego (Drzymulska i in. 2013). W każdej z lokalizacji swoim charakterem nawiązują one do współczesnych zbiorowisk z klasy *Scheuchzerietalia plaustris* i stanowią fitocenozę macierzystą torfu sfagnowego przejściowego.

Badane torfowisko nie rozwijało się w sposób stabilny. Świadczy o tym występowanie w rdzeniu aż czterech wstawek osadu typu dy, pojawiających się pomiędzy warstwami torfu sfagnowego przejściowego (Ryc. 3). Wynika z tego, że torfowisko przybrzeżne Suchara Zachodniego przez cały czas kształtowane było w warunkach pośrednich między *limnicum* i *terrestricum*. Wahania lustra wody znajdują swoje odzwierciedlenie w zmieniającej się typologii osadu przybrzeżnego. Przy czym ocena, czy mamy do czynienia z torfem, czy z osadem limnicznym w typie dy, możliwa jest jedynie z zastosowaniem mikroskopu optycznego, co pozwala na weryfikację osadu pod kątem obecności lub braku szczątków wegetatywnych typowych dla torfu (patrz Kowalewski, Barabach 2010). Znaleźiska karpologiczne takiej roli nie spełniają, o czym świadczy obecność endokarpów rdestic *Potamogeton*, czy też nasion nimfoidów w torfie (Ryc. 3).



Rycina 3. Suchar Zachodni. Diagram makroszczątkowy

1 – torf przejściowy sfagnowy, 2 – torf wysoki sfagnowy, 3 – osad typu dy, 4 – woda, A – szczątki wegetatywne, B – szczątki generatywne, + – ilość śladowa szczątków

Niestabilne warunki hydrologiczne w strefie przybrzeżnej jezior odnotowane zostały także w innych sucharach wigierskich, takich jak Suchar III i Suchar VI (Drzymulska i in. 2013), Suchar IV (Drzymulska, Zieliński 2013), Suchar II (Drzymulska i in. 2014, 2015) oraz Jezioro Ślepe (Drzymulska i in. 2014). Datowanie radiowęglowe osadów w tych profilach wskazało jednoznacznie, że wahania lustra wody, a w efekcie zastępowanie torfu osadem limnicznym i odwrotnie, mogły

następować w różnych odcinkach holocenu. Soczewka wody widoczna w profilu z Suchara Zachodniego (Ryc. 3) pojawiła się prawdopodobnie jako efekt wzrostu poziomu wody w okresie późniejszym (patrz Kowalewski, Barabach 2010). Podobne soczewki wody notowane były w wielu górnych odcinkach profili z przybrzeży sucharów wigierskich (Drzymulska i in. 2013, Drzymulska, Zieliński 2014, Drzymulska i in. 2014, Drzymulska i in. 2015).

Jeżeli chodzi o końcowe stadium sukcesji roślinnej, zbiorowisko odnotowane w Sucharze Zachodnim, czyli mszar wysokotorfowiskowy, zdaje się być typowym końcowym stadium sukcesji roślinnych zbiorowisk subfosalnych w strefach przybrzeżnych, także innych jezior humusowych Wigierskiego Parku Narodowego. W dziewięciu z dwunastu badanych do tej pory obiektach sukcesja zmierzała właśnie w kierunku mszaru wysokotorfowiskowego (Drzymulska 2011). Mszar ten jest jednocześnie fitocenozą macierzystą torfu wysokiego sfagnowego, który nawiązuje wyraźnie do gatunków torfów wysokich znanych z klasyfikacji Tołpy i in. (167), jak *Eusphagneti* oraz *Cuspidato-Sphagneti* i zawiera szczątki *Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum fallax*, wełnianki pochwowatej *Erophorum vaginatum* i krzewinek z rodziny Ericaceae. Jak się okazuje, rozwój złoża torfowego może następować w tym samym kierunku, nawet pomimo odmiennego charakteru osadów spągowych. Przykładem są tu Suchar Zachodni i pobliski Suchar Dembowski, w którego przybrzeżu stwierdzono, nienotowaną w tym pierwszym, niemal metrową warstwę kredy jeziornej (Żurek i in. 2009). Pomimo tej różnicy, zarówno w obu tych zbiornikach, jak i kilku innych jeziorach humusowych WPN (Suchar III, Suchar VI, Wądołek, Suchar Wielki, Jezioro Ślepe i Konopniak – Drzymulska 2011), torfowisko przybrzeżne rozwijało się według tego samego schematu: torfowisko przejściowe → torfowisko wysokie.

Podziękowania

W pracy wykorzystano wyniki badań prowadzonych w ramach realizacji projektu badawczego MNiSW nr N N305 085135 „Historia jezior dystroficznych (sucharów) Wigierskiego Parku Narodowego w świetle holocenińskiej sukcesji ich roślinności”.

Literatura

- De Haan H., 1992. Impacts of environmental changes on the biogeochemistry of aquatic humic substances. *Hydrobiologia*, 229: 59-71.
- Drzymulska D., 2011. Raport końcowy projektu badawczego MNiSW NR N N305 085135 „Historia jezior dystroficznych (sucharów) Wigierskiego Parku Narodowego w świetle

- holocenińskiej sukcesji ich roślinności”. Maszynopis. Uniwersytet w Białymstoku, Białystok.
- Drzymulska D., Kłosowski S., Pawlikowski P., Zieliński P., Jabłońska E., 2013. The historical development of vegetation of foreshore mires beside humic lakes; different successional pathways under various environmental conditions. *Hydrobiologia*, 703(1): 15-31.
- Drzymulska D., Zieliński P., 2013. Developmental changes in the historical and present-day trophic status of brown water lakes. Are humic water bodies a uniform aquatic ecosystem? *Wetlands*, 33(5): 909-919.
- Drzymulska D., Fiłoc M., Kupryjanowicz M., 2014. Reconstruction of landscape paleohydrology using the sediment archives of three dystrophic lakes in northeastern Poland. *J. Paleolimnol.*, 51(1): 45-62.
- Drzymulska D., Fiłoc M., Kupryjanowicz M., Szeroczyńska K., Zieliński P., 2015. Postglacial shifts in lake trophic status based on a multiproxy study of a humic lake. *The Holocene*, 25(3): 495-507.
- Gąbka M., Owsiany P., 2006. Shallow humic lakes of the Wielkopolska region – relation between dystrophy and eutrophy in lake ecosystems. *Limnol. Rev.*, 6: 95-102.
- Górniak A., 2006. Typologia i aktualna trofia jezior WPN. [W:] Górniak A. (red.), *Jeziora Wigierskiego Parku Narodowego*. Wyd. UwB, Białystok: 128-140.
- Hessen D.O., Tranvik L.J., (red.), 1998. Aquatic humic substances. Ecology and biogeochemistry. *Ecol. Stud.*, 133.
- Kondracki J., 1994. *Geografia Polski. Mezoregiony fizyczno-geograficzne*. PWN, Warszawa.
- Kowalewski G., Barabach J., 2010. Struktura osadów zbiornika jeziorno-torfowiskowego Dury V (Bory Tucholskie). *Stud. Lim. Tel.*, 4: 65-74.
- Kullberg A., Bishop K.H., Hargeby A., Jonson M., Petersen R.C., 1993. The ecological significance at dissolved organic carbon in acidified water. *Ambio*, 22: 331-337.
- Marks L., 2002. Last Glaciation maximum in Poland. *Quat. Sci. Rev.*, 21: 103-110.
- Obidowicz A., 1990. Eine Pollenanalytische und Moorkundliche Studie zur Vegetationsgeschichte des Podhale-Gebietes (West-Karpaten). *Acta Palaeobot.*, 30 (1,2): 147-219.
- Pawlikowski P., Rutkowska E., Kłosowski S., Jabłońska E., Drzymulska D., 2014. Development of bog-like vegetation during terrestrialization of polyhumic lakes in northeastern Poland is not accompanied by ecosystem ombrotrophication. *Hydrobiologia*, 737(1): 87-95.
- Ralska-Jasiewiczowa M., Starkel L. 1988. Record of the hydrological changes during the Holocene in the lake, mire and fluvial deposits of Poland. *Folia Quat.*, 57: 91-126.
- Tobolski K., 2000. *Vademecum Geobotanicum. Przewodnik do oznaczania torfów i osadów jeziornych*. PWN, Warszawa.

- Tołpa, S., Jasnowski M., Pałczyński A., 1967. System der genetischen Klassifizierung der Torfe Mitteleuropas (System of genetic classification of peats from Middle Europe). Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 79: 9-99.
- Żurek S., Bińka K., Drzymulska D., 2009. Torfowisko Sucharu Dembowskich. Pr. Kom. Paleogeogr. Czwart. PAU, T VII: 99-106.

18 Różnorodność biologiczna obszarów po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego w gminie Supraśl na terenie Puszczy Knyszyńskiej

Grażyna Łaska*

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok,

* e-mail: g.laska@pb.edu.pl

Streszczenie: W badaniach dokonano oceny różnorodności biologicznej obszarów po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego na terenie Puszczy Knyszyńskiej, w okolicach miejscowości Ogrodniczki, w gminie Supraśl. Na obszarze dawnej kopalni żwiru o powierzchni 1,07 km², w latach 2010-2012, wykonano 94 zdjęcia fitosocjologiczne, metodą Brauna-Blanqueta. Do identyfikacji i klasyfikacji hierarchicznej zbiorowisk roślinnych wykorzystano metody syntaksonomii numerycznej (Cluster Analysis, PCA).

Wyniki wykazały, że obecnie, na obszarach poeksploatacyjnych występują dwa sztuczne zbiorniki wodne i zbiorowiska nieleśne oraz inicjalne stadia formacji krzewiastych i zbiorowiska leśne. Zbiorowiska leśne osiągają większy udział powierzchniowy (81,5%) niż zbiorowiska nieleśne (5,5%). W badaniach zidentyfikowano 7 zbiorowisk roślinnych, w tym dwa cenne typy zbiorowisk roślinnych (*Salicetum albo-fragilis*, *Spergulo vernalis-Corynephorretum*) wymienione w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG. Na obszarach poeksploatacyjnych w Ogrodniczkach stwierdzono występowanie 10 taksonów objętych ochroną częściową, w tym: 3 gatunków roślin naczyniowych oraz 7 gatunków mchów. Analizy przestrzenne wykazały, że siedliska leśne Puszczy Knyszyńskiej pod wpływem wydobywania kruszywa naturalnego są zdegradowane na powierzchni 0,5 km² (46,9%). Obecnie, są to płaty roślinności rzeczywistej zbiorowisk nieleśnych – seminaturalnych i synantropijnych oraz sztucznie odnowionych młodnikowych i leśnych zbiorowisk zastępczych.

Słowa kluczowe: syntaksonomia zbiorowisk roślinnych, metody numeryczne, roślinność potencjalna, roślinność rzeczywista, ochrona gatunkowa

1. Wstęp

Obszary po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego są w dużym stopniu przekształcone antropogenicznie (Fudali 2009; Czortek 2011). Miąższość eksploatowanych złóż wynosi od kilku do dwudziestu kilku metrów. W zależności od usytuowania poziomu wody gruntowej względem stropu kopaliny, złoża kruszyw naturalnych dzielimy na suche, częściowo zawodnione i zawodnione (Ney 2003). Jeżeli są to złoża zawodnione, to powierzchnia odzyskana dla produkcji roślinnej osiąga około 20% obszaru odkrywkowego, a pozostałe 80% pozostaje w postaci głębokich i bezodpływowych basenów wodnych (Bedla, Petryk 2010; Kozioł, Machniak 2011). W wyniku stosowania różnych metod odkrywkowych, następują negatywne bezpośrednie, pośrednie oraz krótko- i długoterminowe oddziaływania. Są to straty w bioróżnorodności, wynikające ze zniszczenia terenu zajętego pod kopalnię i terenów sąsiednich przez zasypianie materiałem nadkładu, zniszczenie pokrywy roślinnej i degradacja siedlisk (Łaska 2010a, b, c). Pod wpływem działania leja depresyjnego powstającego w wyniku wydobywania kruszywa, następuje obniżenie poziomu wód gruntowych i zmniejszenie wilgotności siedlisk, czego skutkiem jest ubożenie składu gatunkowego zbiorowisk roślinnych (Woch 2007; Bzdon 2010). W pasie bezpośrednio przylegającym do wyrobiska, następuje również obniżenie liczebności populacji zwierząt, utrata siedlisk i zmniejszenie dostępności ich miejsc lęgowych, kryjówek i żerowisk poprzez zmniejszenie lub ograniczenie bazy pokarmowej (Łaska i in. 2011). Nakładanie się negatywnych oddziaływań wielu czynników funkcjonujących na obszarach po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego, może prowadzić do obniżenia wartości zasobów przyrody i walorów przyrodniczych krajobrazu oraz całkowitego zniszczenia niegdyś występujących ekosystemów (Świercz 2004; Kutyna i in. 2010). Jest to szczególnie istotne na terenach objętych ochroną prawną, a głównie na obszarach sieci Natura 2000, do których należy kompleks Puszczy Knyszyńskiej. Celem pracy jest ocena różnorodności biologicznej obszarów pod wpływem wydobywania kruszyw naturalnych i zmian w sposobie użytkowania zbiorowisk leśnych na terenie Puszczy Knyszyńskiej.

2. Teren badań

Obszar dawnej kopalni żwiru o powierzchni 1,07 km², jest położony w okolicach miejscowości Ogródniczki, w gminie Supraśl powiatu białostockiego, w województwie podlaskim. Teren ten, od strony wschodniej graniczy z Rezerwatem

Krasne i jeziorem Komosa, od strony zachodniej – z zabudową mieszkaniową wsi Ogrodniczki, a od północnej i południowej – z kompleksem leśnym Puszczy Knyszyńskiej, który znajduje się w zasięgu Nadleśnictwa Supraśl i Obrębu Supraśl (www.geoportal.gov.pl).

Obszar po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego zajmują dwa sztuczne zbiorniki o powierzchni 0,037 km² i 0,016 km². Teren ten w części wschodniej należy do Parku Krajobrazowego Puszczy Knyszyńskiej i zajmuje areał 0,2 km², co stanowi 19% badanej powierzchni (www.geoportal.gov.pl). Wyróżnia się tutaj również Obszar Specjalnej Ochrony Ptaków (OSO) „Puszcza Knyszyńska” PLB 200003 i Specjalny Obszar Ochrony Siedlisk (SOO) „Ostoja Knyszyńska” PLH 200006 (www.natura2000.gdos.gov.pl). Jest to także teren ochronnej strefy uzdrowiskowej „C” o powierzchni 0,82 km², co stanowi 76,6% całkowitej powierzchni badawczej. W celu zachowania walorów uzdrowiskowych miasta na badanym terenie obowiązuje zakaz „pozyskiwania surowców mineralnych innych niż naturalne surowce lecznicze i prowadzenia działań mających negatywny wpływ na fizjografię uzdrowiska i właściwości lecznicze klimatu” (Uchwała Nr XIV/119/2011 Rady Miejskiej w Supraślu z dnia 29 grudnia 2011 r. w sprawie uchwalenia Statutu Uzdrowiska Supraśl).

3. Materiały i metody

Na wstępnym etapie prac, przygotowano kartograficzny podkład mapy w skali 1:2000, przeznaczony do szczegółowych badań geobotanicznych w terenie. W tym celu wykorzystano jeden arkusz „Mapy sytuacyjno-wysokościowej do celów planistycznych – Ogrodniczki”, w skali 1:2000 (Podlaskie Biuro Planowania Przestrzennego w Białymstoku). Wśród innych materiałów źródłowych analizowano dane z dokumentacji leśnej w postaci jednego arkusza „Mapy Przeglądowej Nadleśnictwa Supraśl i Obrębu Supraśl” w skali 1:25000 (Plan Urządzania Gospodarstwa Leśnego Nadleśnictwa Supraśl na okres 01.01.2006-31.12.2015), dane orograficzne na podstawie dwóch arkuszy map topograficznych „Karakule” w skali 1:25000 (245.24) i w skali 1:10000 (245.241) oraz trzy arkusze map roślinności Puszczy Knyszyńskiej w skali 1:100000 (Łaska 2006). W opracowaniu danych analogowych wykorzystano również arkusz „Przeglądowej Mapy Geomorfologicznej Polski” w skali 1:500000 (Starkel 1980) i jeden arkusz „Szczegółowej Mapy Geologicznej Polski – Wasilków (300)”, w skali 1:25000, z Centralnego Archiwum Państwowego Instytutu Geologicznego w Warszawie. Na podstawie analizy map, dokonano rozpoznania typologii rzeźby terenu, głównych jednostek geomorfologicznych i budu-

jących je utworów geologicznych oraz identyfikacji siedliskowej i typów jednostek roślinności.

Badania terenowe prowadzono w latach 2010-2012. W badaniach zbiorowisk roślinnych wykonano 94 zdjęcia fitosocjologiczne, metodą Brauna-Blanqueta na powierzchniach o wielkości 100 m² w zbiorowiskach nieleśnych, 400 m² w zbiorowiskach leśnych i 200 m² w leśnych zbiorowiskach zastępczych. Wśród nich, na potencjalnych typach siedlisk leśnych *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978 – wykonano 58 zdjęć fitosocjologicznych, na siedliskach *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973 – 30 zdjęć, i na siedliskach *Querco-Piceetum* (W. Mat. 1952) W. Mat. et Pol. 195 – 6 zdjęć. Do oceny zachodzących przemian antropogenicznych zbiorowisk roślinnych w badaniach wykorzystano również 39 zdjęć z wymienionych wyżej typów zbiorowisk naturalnych (Łaska 2006).

W celu identyfikacji i klasyfikacji hierarchicznej zbioru zdjęć fitosocjologicznych, wykorzystano metody syntaksonomii numerycznej programu MVSP Plus ver. 3.1., w tym klasyfikacji hierarchicznej kumulacji (*Cluster Analysis*) i ordynacji (PCA). Wśród algorytmów klasyfikacyjnych wykorzystano metody aglomeracyjne (Kovach 1986-1993). Podobieństwo florystyczne między zdjęciami wyrażono w skali procentowej (*Percent Similarity*). Do grupowania wykorzystano metodę nieważonej pary-grupy z użyciem średnich arytmetycznych. Hierarchię klasyfikacyjną przedstawiono w postaci dendrogramu.

Zdjęcia fitosocjologiczne zbiorowisk roślinnych opracowano w postaci analitycznych i syntetycznych tabel zbiorowisk. W tabelach syntetycznych policzono średnią ilościowość, określając w ten sposób 29 jednostek roślinności rzeczywistej. W tabelach, przynależność gatunków do poszczególnych jednostek roślinności, ustalono za Matuszkiewiczem (2001). Nazwy gatunków roślin naczyniowych przyjęto za Mirkiem i in. (2002), a nazwy mszaków za Ochryą i in. (2003). Do kodowania siedlisk przyrodniczych oraz gatunków roślin i zwierząt z Załączników I i II Dyrektywy Siedliskowej zastosowano ujęcie Herbicha (2004).

4. Wyniki badań

4.1. Zróżnicowanie florystyczne badanych zbiorowisk roślinnych

W badaniach, na obszarze po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego, zidentyfikowano 7 zbiorowisk roślinnych, w tym dwa cenne typy zbiorowisk roślinnych wymienione w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG. Jest to nadrzeczny łęg wierzbowy *Salicetum albo-fragilis* R.Tx. 1955 (kod 91E0-1) zlokalizowany wokół

obu zbiorników wodnych i murawy szczytlichowe *Spergulo vernalis-Corynephorum* (R.Tx. 1928) Libb. 1933 (kod 2330) zajmujące centralną część badanego obszaru, na terenach piaszczystych pomiędzy dwoma zbiornikami wodnymi. Badane jednostki roślinności zidentyfikowano następująco:

Klasa: *Salicetea purpureae* Moor 1958

Rząd: *Salicetalia purpureae* Moor 1958

Związek: *Salicion albae* R. Tx. 1955

Zespół: *Salicetum albo-fragilis* R.Tx. 1955 (kod 91E0-1)

Klasa: *Phragmitetea* R.Tx. et Prsg 1942

Rząd: *Phragmitetalia* W. Koch 1926

Związek: *Phragmition* W. Koch 1926

Grupa szuwarów typowych z pojawem gatunków z *Magnocaricion*

Zespół: *Phragmitetum australis* (Gams 1927) Schmale 1939

Klasa: *Epilobietea angustifolii* R.Tx. et Prsg 1950

Rząd: *Atropetalia* Vlieg 1937

Związek: *Epilobion angustifolii* (Rübel 1933) Soó 1933

Zespół: *Calamagrostietum epigeji* Juraszek 1928

Klasa: *Koelerio glaucae-Corynephoretea canescentis* Klika in Klika et. Nowak 1941

Rząd: *Corynephorotalia canescentis* R.Tx. 1937

Związek: *Corynephorion canescentis* Klika 1934

Zespół: *Spergulo vernalis-Corynephorum* (R.Tx. 1928) Libb. 1933 (kod 2330)

Klasa: *Vaccinio-Piceetea* Br.-Bl. 1939

Rząd: *Cladonio-Vaccinietalia* Kiell.-Lund. 1967

Związek: *Dicrano-Pinion* Libb. 1933

Podzwiązek: *Dicrano-Pinenion* Seibert in Oberd. (ed.) 1992

Grupa borów sosnowych na glebach mineralnych

Zespół: *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973

Rząd: *Vaccinio-Piceeta* Br.-Bl. 1939

Związek: *Vaccinio-Piceetalia* Br.-Bl. 1939

Podzwiązek: *Vaccinio-Piceenion* Oberd. 1957

Grupa borealnych zespołów niżowych

Zespół: *Querco-Piceetum* (W. Mat. 1952) W. Mat. et Pol.195

Zespół: *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978

Zbiorowisko zastępcze młodnikowe *Pinus-Pleurozium* Łaska (2006)

Leśne zbiorowiska zastępcze z kręgu *Serratulo-Piceetum*

Zbiorowisko: *Pinus sylvestris*-*Calamagrostis arundinacea* Łaska (2006)

Zbiorowisko: *Picea abies*-*Calamagrostis arundinacea* Łaska (2006)

Na obszarach poeksploatacyjnych w Ogrodniczkach stwierdzono występowanie 10 taksonów objętych ochroną częściową (Dz.U. z 2014 r., poz. 1409), w tym 3 gatunki roślin naczyniowych (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Hierochloë australis* (Schrad.) Roem. & Schult. i *Carex arenaria* L.) oraz 7 gatunków mchów (*Diranum scoparium* Hedw., *Dicranum polysetum* Sw. ex anon., *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp., *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt., *Ptilium crista-castrensis* (Hedw.) De Not., *Polytrichum commune* Hedw. i *Eurhynchium angustirete* (Broth.) T.J. Kop.) (tab. 1).

Tabela 1. Wykaz gatunków objętych ochroną częściową, występujących w poszczególnych zbiorowiskach roślinnych badanego obszaru

Nazwa taksonu	Zbiorowiska roślinne					
	<i>Carici digitatae-Piceetum</i>	<i>Quercopiceetum</i>	<i>Peucedano-Pinetum</i>	<i>Salicetum albo-fragilis</i>	<i>Calamagrostietum epigeji</i>	<i>Spergulo vernalis-Corynephor.</i>
<i>Helichrysum arenarium</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Hierochloë australis</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Carex arenaria</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Diranum scoparium</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Dicranum polysetum</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Hylocomium splendens</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Pleurozium schreberi</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Ptilium crista-castrensis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Polytrichum commune</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Eurhynchium angustirete</i>	+	-	-	-	-	-

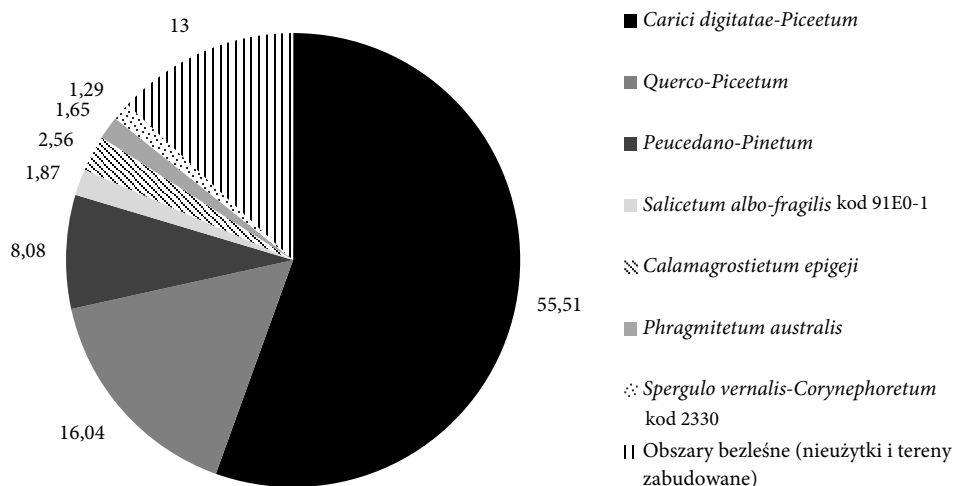
Źródło: opracowanie własne.

4.2. Analiza rozmieszczenia przestrzennego zbiorowisk roślinnych

W Ogrodnickach, na badanej powierzchni o wielkości 1,07 km², wśród zbiorowisk leśnych, największy areal (0,59 km²) zajmują potencjalne siedliska boru mieszanego świeżego *Carici digitatae-Piceetum*, osiągając 55,5% całkowitej powierzchni (ryc. 1). Występują one w środkowej części badanego obszaru i rozciągają się z kierunku zachodniego i południowo-zachodniego w stronę północną i północno-wschodnią (ryc. 2). Na terenie Ogrodniczek reprezentują je zbiorowiska zastępcze młodnikowe *Pinus-Pleurozium* ze sztucznie nasadzoną sosną zwyczajną *Pinus sylvestris* L. Preferują one lekko pochyłe stożki piasków wodnolodowcowych, występując na glebach rdzawych peryglacialnych, wytworzonych z piasków słabo gliniastych zalegających na piaskach luźnych i żwirach akumulacji wodnolodowcowej.

W oddaleniu od obszarów poeksploatacyjnych, a w pobliżu zwartego kompleksu leśnego Puszczy Knyszyńskiej, od strony północnej, siedliska boru mieszanego świeżego zasiedlają zniekształcone postacie antropogenicznie ukształtowanych leśnych zbiorowisk zastępczych *Pinus sylvestris-Calamagrostis arundinacea* i *Picea abies-Calamagrostis arundinacea* zidentyfikowane w klasyfikacji hierarchicznej dla potencjalnych siedlisk *Serratulo-Piceetum*. Lokują się one znacznie wyżej niż pozostałe zespoły borowe i zajmują stanowiska bardziej wzniesione, preferując wyraźnie urzeźbione i faliste zbocza stoków z glebami wytworzonymi na zwirowatych piaskach fluwioglacjalnych.

Bór mieszany wilgotny *Querco-Piceetum* na badanym obszarze zajmuje areal 0,17 km², co stanowi 16,04% całkowitej powierzchni (ryc. 1). Jego występowanie w południowej części związane jest z krajobrazem moreny dennej i zagłębieniami wytopiskowymi (ryc. 2). Zespół *Querco-Piceetum* preferuje gleby wilgotne z płytko zalegającym poziomem wody gruntowej, wykształcone z drobnoziarnistych piasków, zalegających na utworach gliniastych. Subkontynentalny bór świeży *Peucedano-Pinetum* na badanym obszarze zajmuje areal 0,08 km², co stanowi 8,08% całkowitej powierzchni (ryc. 1). Jego płaty zlokalizowane w północno-zachodniej i wschodniej części reprezentują typową postać *Peucedano-Pinetum typicum* z drzewostanem w fazie drągowin i starodrzewów (ryc. 2). Występuje on na ubogich, piaszczystych glebach bielcowych, z głęboko zalegającym poziomem wód gruntowych.

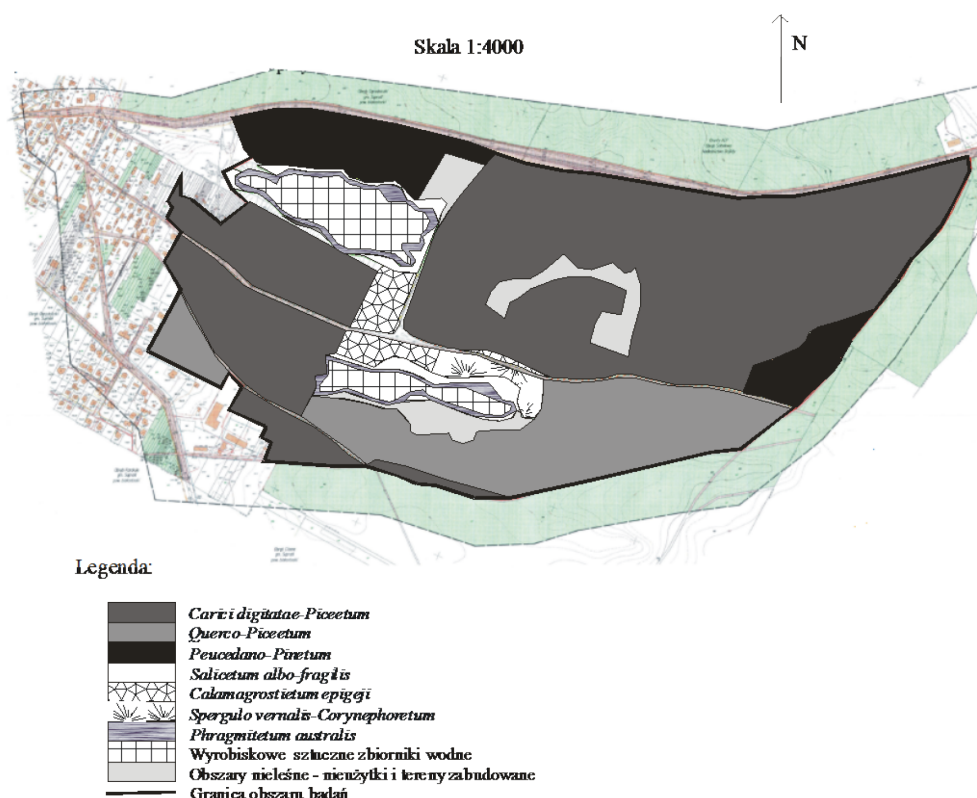


Rycina 1. Udział powierzchniowy zbiorowisk roślinnych zidentyfikowanych na badanym obszarze po eksploatacji złóż kruszywa naturalnego (Ogrodniczki, gm. Supraśl, woj. podlaskie)

Źródło: opracowanie własne.

Inicjalne postacie nadrzecznego łągu wierzbowego *Salicetum albo-fragilis* wykształciły się po zakończonej eksploatacji kruszywa naturalnego i na badanym terenie lokują się wokół obu zbiorników wodnych (ryc. 2). Zajmują one areal 0,02 km², co stanowi 1,87% całkowitej powierzchni (ryc. 1). W Ogrodniczkach, w miejscu dawnych wyrobisk żwirowych, zasiedlają one utwory piaszczysto-żwirowe.

Wśród zbiorowisk nieleśnych, zespół trzcinnika piaskowego *Calamagrostietum epigeji* zajmuje obszar w centralnej części pomiędzy dwoma zbiornikami wodnymi, na terenach piaszczystych (ryc. 2). Jego areal to 0,02 km², co stanowi 2,56% całkowitej powierzchni (ryc. 1). Zbiorowisko szuwarów trzcinowych *Phragmitetum australis* w Ogrodniczkach występuje nad brzegami obu zbiorników wodnych (ryc. 2). Zajmuje ono niewielką powierzchnię 0,017 km², co stanowi 1,56% badanego obszaru (ryc. 1). Murawy szczytliche *Spergulo vernalis-Corynephorum* występują w centralnej części, na terenach piaszczystych pomiędzy dwoma zbiornikami wodnymi (ryc. 2). Zajmują one najmniejszą powierzchnię (0,013 km²) wśród zidentyfikowanych zbiorowisk roślinnych, o udziale powierzchniowym 1,29% badanego obszaru (ryc. 1).



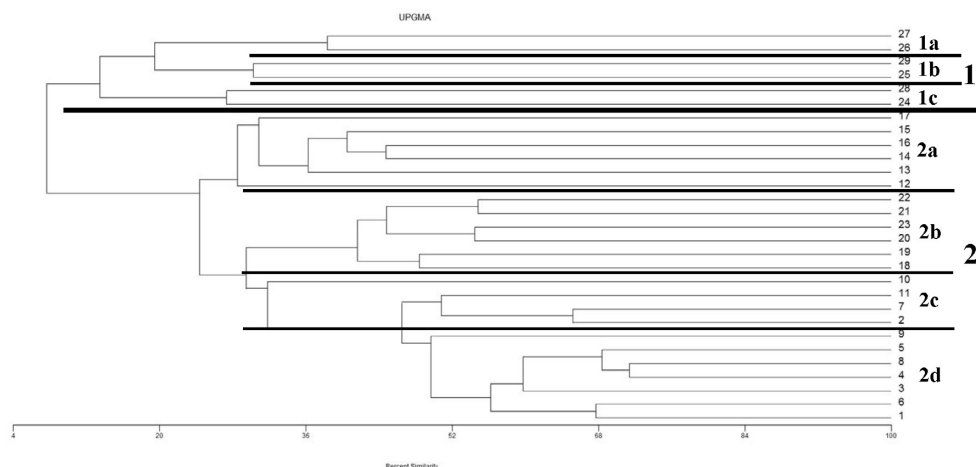
Rycina 2. Zróżnicowanie roślinności na obszarach po eksploatacji kruszywa naturalnego w Ogrodnickach (gm. Supraśl, woj. podlaskie).

Źródło: opracowanie własne.

4.3. Klasyfikacja numeryczna zbiorowisk roślinnych

Wyniki klasyfikacji numerycznej potwierdziły identyfikację terenową syntaksonów, które różnicują się na dwie odrębne grupy: zbiorowiska leśne i nieleśne (ryc. 3). Pierwsza grupa (1; zdjęcia 24-27) reprezentuje zbiorowiska nieleśne (1), w tym: zespół trzcinnika piaskowego *Calamagrostietum epigaei* (1a), szuwały trzcinowe *Phragmites australis* (1b) i murawy szczotlichowe *Spargano angustifolium-Corynephoretum* (1c). Druga grupa (2; zdjęcia 1-17) reprezentuje zbiorowiska leśne, w tym: starodrzewy, drągowiny i zbiorowiska młodnikowe na siedliskach *Serratulo-Piceetum* (2a), *Peucedano-Pinetum* (2b), *Quercus-Piceetum* (2c) i *Carici digitatae-Piceetum* (2d).

W analizie ordynacji PCA stwierdzono zróżnicowanie płatów roślinnych, w zależności od żyzności, struktury i składu gatunkowego badanych zbiorowisk oraz różnych stadiów rozwojowych drzewostanów (ryc. 4). Pierwsza oś PCA wyjaśnia 31,4% zmienności, a druga 9,1% zmienności zbiorowisk roślinnych. Gradient środowiskowy reprezentowany przez pierwszą oś wskazuje na znaczne wewnętrzne zróżnicowanie badanych płatów roślinnych, uzależnione od różnych stadiów rozwoju zbiorowisk, struktury zespołów i ich kompozycji florystycznej. Na dole osi skupiają się zbiorowiska nieleśne i inicjalne stadia rozwojowe zbiorowisk. Na górze osi znajdują się drągowiny i starodrzewy na siedliskach borowych. Gradient środowiskowy reprezentowany przez drugą oś ordynacyjną zinterpretowano jako gradient różnej żyzności siedlisk (ryc. 4).



Legenda:

1. Zbiorowiska nieleśne

1a Ass. *Calamagrostietum epigeji* Juraszek 1928

1b Ass. *Phragmitetum australis* (Gams 1927) Schmale 1939

1c Ass. *Spergulo vernalis-Corynephorretum* (R.Tx. 1928) Libb. 1933

2. Zbiorowiska leśne

2a Leśne zbiorowiska zastępcze z kręgu *Serratulo-Piceetum*

2b Ass. *Peucedano-Pinetum* W.Mat. (1962) 1973

2c Ass. *Quercu-Piceetum* (W.Mat. 1952) W.Mat. et Pol.1955

2d Ass. *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978

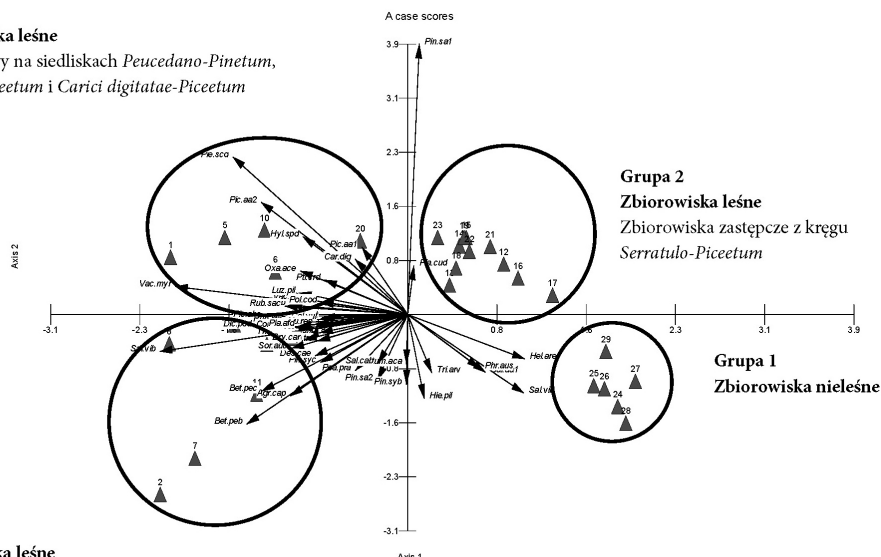
Rycina 3. Dendrogram hierarchicznej klasyfikacji numerycznej badanych zbiorowisk roślinnych na obszarach po eksploatacji kruszywa naturalnego w Ogrodniczkach (gm. Supraśl, woj. podlaskie)

Źródło: opracowanie własne.

Grupa 3

Zbiorowiska leśne

Starodrzewy na siedliskach *Peucedano-Pinetum*,
Quercu-Piceetum i *Carici digitatae-Piceetum*



Grupa 4

Zbiorowiska leśne

Inicjalne fazy rozwojowe zbiorowisk zastępczych
na siedliskach borowych i łągu wierzbowego z kręgu
Salicetum albo-fragilis

Rycina 4. Ordynacja PCA badanych zbiorowisk roślinnych na obszarach po eksploatacji kruszywa naturalnego w Ogrodniczkach (gm. Supraśl, woj. podlaskie).

Źródło: opracowanie własne.

5. Dyskusja

W polskim prawodawstwie ocenę oddziaływania planowanej inwestycji na środowisko reguluje Ustawa z dnia 3 października 2008 r. o udostępnianiu informacji o środowisku i jego ochronie (Dz.U. Nr 199, poz. 1227). Procedując zgodnie z art. 66 tej ustawy, często definiuje się negatywne oddziaływanie planowanego przedsięwzięcia, polegające na eksploatacji złóż kruszywa naturalnego na stan obszaru Natura 2000, w tym chronione siedliska przyrodnicze, gatunki roślin i zwierząt (Łaska 2010a, b, c, Łaska i in. 2011). Badania na obszarach poeksploatacyjnych w miejscowości Ogrodniczki (gm. Supraśl, woj. podlaskie) wykazały również, że siedliska leśne Puszczy Knyszyńskiej, pod wpływem wydobycia kruszywa naturalnego, są zdegradowane na powierzchni 0,5 km² (46,9%), głównie w centralnej części wokół zbiorników wodnych oraz na obszarze leśnych zbiorowisk roślinnych. Obecnie są to płaty roślinności rzeczywistej zbiorowisk nieleśnych – seminaturalnych i synantropijnych (*Calamagrostietum epigeji*, *Spergulo vernalis-Coryne-*

phoretum) oraz sztucznie odnowionych młodnikowych i leśnych zbiorowisk zastępczych na siedliskach *Carici digitatae-Piceetum* i *Serratulo-Piceetum*. Mniejsze przekształcenia siedlisk leśnych stwierdzono we wschodniej, południowej i północno-zachodniej części badanego obszaru, w miejscach występowania zbiorowisk leśnych *Quercu-Piceetum* i *Peucedano-Pinetum*, na powierzchni 0,57 km² (53,1%).

Na badanym obszarze dominują zbiorowiska leśne klasy *Vaccinio-Piceetea* Br.-Bl. 1939 (79,7%). Zbiorowiska nieleśne (5,5%) skupiają się głównie wokół zbiorników wodnych powstałych pod wpływem wydobywania kruszywa naturalnego. Należy podkreślić, że na powierzchni dawnych wyrobisk żwirowych, obecność zbiorowisk nieleśnych i inicjalnych postaci formacji krzewiastych często jest warunkowana występowaniem siedlisk wtórnych, silnie przekształconych przez człowieka (Woch 2007; Kutyna i in. 2010). W Ogrodniczkach, na siedliskach wtórnych, roślinność wokół wyrobiskowych zbiorników wodnych, posiada jednak duże walory przyrodnicze – kształtując cenne typy zbiorowisk o znaczeniu wspólnotowym, wymienione w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG, takie jak, nadrzeczne łągi wierzbowe *Salix fragilis* (kod 91E0-1) i murawy szczotlichowe *Spergulo vernalis-Corynephorum* (kod 2330). Stąd też, w obecnych planach zagospodarowania obszaru poeksploatacyjnego w Ogrodniczkach, należy rozważyć, czy rekultywować obszar Puszczy Knyszyńskiej jako Ostoi siedliskowej i obszaru sieci Natura 2000, czy też chronić obecnie wykształcone na wtórnych siedliskach – cenne typy zbiorowisk roślinnych o znaczeniu wspólnotowym.

Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach pracy statutowej Nr S/WBiŚ/5/2016 i sfinansowano ze środków na naukę MNiSW.

Literatura

- Bedla D., Petryk A., 2010. Funkcjonowanie wyrobiskowych zbiorników wody w Przegini pod Krakowem. Inżynieria Ekologiczna, 22: 83-89.
- Bzdon G., 2010. Gatunki zbiorowisk segetalnych we florze wybranych żwirowni wysoczyzny siedleckiej. Fragm. Agron., 27(3): 34-43.
- Czortek P., 2011. Udział antropofitów we florze wyrobisk poeksploatacyjnych okolic Świecia. [W:] Kącki Z., Stefańska-Krzaczek E. (red.), Synantropizacja w dobie zmian różnorodności biologicznej. Acta Botanica Silesiaca, 6: 171-184.
- Dyrektywa Rady 92/43/EWG z dnia 21 maja 1992 r. w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory, [online] natura2000.gdos.gov.pl [dostęp: 23.03.2016].

- Fudali E., 2009. Antropogeniczne zmiany w ekosystemach. Transformacje roślinności. Wyd. UWP, Wrocław.
- Herbich J., (red.) 2004. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręczniki metodyczne. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- Kovach L.W., 1986-1993. MVSP Plus, version 3.1. Users' Manual. Kovach Computing Services Pentraeth, Wales U.K.
- Kozioł W., Machniak Ł., 2011. Podwodne kopanie. Rozwój technologii wydobywania kruszywa zwirowo-piaskowych spod wody. Surowce i materiały budowlane 3.
- Kutyna I., Lachowicz G., Malinowska K., 2010. Zbiorowiska roślinne na obszarze wyrobiska „Krzyńka”. *Bad. Fizjogr. Pol. Zach., Ser. B Bot.*, 286 (18): 31-35.
- Łaska G., 2006. Tendencje dynamiczne zbiorowisk zastępczych w Puszczy Knyszyńskiej. Bogucki Wyd. Nauk. Białystok-Poznań. 3 Mapy roślinności.
- Łaska G., 2010a. Ekspertyza przyrodnicza z przeprowadzenia oceny oddziaływania pod względem skutków planowanej inwestycji polegającej na eksploatacji złoża kruszywa naturalnego „Bobrowniki V” w kat. C₁ w obrębie obszaru górniczego Bobrowniki V w gminie Gródek, Białystok.
- Łaska G., 2010b. Inwentaryzacja przyrodnicza na terenie planowanej inwestycji polegającej na eksploatacji złoża kruszywa naturalnego „Kołodno” w kat. C₁ w obrębie obszaru górniczego Kołodno, w gminie Gródek, Białystok.
- Łaska G., 2010c. Inwentaryzacja przyrodnicza na terenie planowanej inwestycji polegającej na eksploatacji złóż kruszywa naturalnego w obrębie obszaru górniczego Sofipol, w gminie Gródek, Białystok.
- Łaska G., Sobociński W., Stachów J., 2011. Raport oceny oddziaływania pod względem skutków planowanej inwestycji polegającej na eksploatacji złoża kruszywa naturalnego w obrębie obszaru górniczego Bobrowa, w gminie Zabłudów, Białystok.
- Matuszkiewicz W., 2001. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. PWN, Warszawa.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M., 2002. Flowering Plants and Pteridophytes of Poland. A Checklist. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Ney R., 2003. Surowce mineralne Polski. Surowce skalne. Kruszywa naturalne i piaski przemysłowe. GSMiE PAN, Kraków.
- Ochyra R., Żarnowiec J., Bednarek-Ochyra H., 2003. Census catalogue of Polish mosses. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Plany Urządzania Gospodarstwa Leśnego Nadleśnictwa Supraśl na okres 01.01.2006-31.12.2015. Elaboraty w sprawie urządzania (IV rewizji) gospodarstwa leśnego. Tom I-III. Opisanie ogólne i mapy; Opisy taksacyjne; Plan zagospodarowania lasu. RDLP, Białystok.

- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 roku w sprawie ochrony gatunkowej roślin. Internetowy System Aktów Prawnych, [online] Dz. U. z 2014 r., poz. 1409.
- Starkel L., (red.). 1980. Przeglądowa Mapa Geomorfologiczna Polski w skali 1:500000. Inst. Geogr. PAN, Warszawa.
- Świercz A., 2004. Rola biowskaźników w monitoringu zanieczyszczeń środowiska i rekultywacji terenów. [W:] Perspektywy rozwoju regionu w świetle badań krajobrazowych, Problemy Ekologii Krajobrazu, 235-241.
- Uchwała Nr XIV/119/2011 Rady Miejskiej w Supraślu z dnia 29 grudnia 2011 r. w sprawie uchwalenia Statutu Uzdrowiska Supraśl.
- Ustawa z dnia 3 października 2008 r. o udostępnianiu informacji o środowisku i jego ochronie, udziale społeczeństwa w ochronie środowiska oraz o ocenach oddziaływania na środowisko. Internetowy System Aktów Prawnych, [online] (Dz. U. Nr 199, poz. 1227).
- Woch M.W., 2007. Szata roślinna wyrobiska Kopalni Piasku Szczakowa S.A.. *Fragm. Flor. Geobot. Polonica*, 14(2): 281-309.
- www.geoportal.gov.pl [dostęp: 23.08.2016].
- www.natura2000.gdos.gov.pl [dostęp: 23.08.2016].

19 Rozmieszczenie i oddziaływanie nawłoci kanadyjskiej (*Solidago canadensis*) na stan zachowania muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej

Karolina Ruraż*

Uniwersytet Jana Kochanowskiego
Instytut Biologii, Zakład Botaniki

ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
* e-mail: roli170889@gmail.com

Streszczenie: Wyżyna Sandomierska stanowi mezoregion położony w południowo-wschodniej Polsce. Zajmuje powierzchnię około 1140 km². Dogodne warunki glebowe i klimatyczne sprawiają, że jest to obszar intensywnie wykorzystywany rolniczo, głównie pod sadownictwo, uprawy winorośli oraz warzyw. Taka forma użytkowania terenu przyczynia się do zmniejszenia powierzchni oraz większej podatności na zaburzenia siedlisk półnaturalnych, zwłaszcza muraw kserotermicznych. Obecny stan muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej kształtowany jest między innymi, przez nawłoc kanadyjską (*Solidago canadensis*). Zaliczana ona jest do grupy roślin inwazyjnych, które ograniczają występowanie innych gatunków.

Celem pracy jest przedstawienie występowania nawłoci kanadyjskiej w murawach kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej oraz określenie wpływu gatunku na badane siedlisko.

Badania florystyczne prowadzono w sezonach wegetacyjnych 2014-2015. Wykorzystano metodę kartogramu, zgodnie z założeniami metodycznymi dla ATPOL. Za podstawową jednostkę uznano kwadrat o boku 2,5 km. Otrzymano w ten sposób 234 jednostki. Za stanowisko przyjęto zwarty płat murawy. Wśród badanych stanowisk muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej odnotowano występowanie nawłoci kanadyjskiej, zarówno w postaci pojedynczych kęp, jak i łąnów. Z upływem czasu, nawłoc rozprzestrzeniła się na całą powierzchnię murawy, w wyniku czego dominuje w składzie gatunkowym siedliska zmieniając jego strukturę oraz charakter. Brak użytkowania siedlisk powoduje ubożenie składu florystycznego, co skutkuje ich zanikiem. Objęcie ochroną czynną najcenniejszych płatów muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej przyczyniłoby się do zachowania wielu gatunków oraz wpłynęłoby na zwiększanie liczby ich stanowisk.

Słowa kluczowe: nawłoc kanadyjska, rośliny inwazyjne, murawy kserotermiczne, Wyżyna Sandomierska

1. Wstęp

Nawłóć kanadyjska (*Solidago canadensis* L.) jest byliną należącą do rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Pochodzi ze wschodniej części Ameryki Północnej, gdzie występuje w dolinach rzek. Za datę jej zawleczenia do Polski uznaje się rok 1872 (Tokarska-Guzik i in. 2012). Nawłóć stanowi gatunek charakterystyczny zespołu *Rudbeckio-Solidaginetum* R. Tx. et Raabe 1950 (Matuszkiewicz 2014). Reprezentuje jeden z 5 gatunków nawłoci spotykanych na terenie kraju, obok nawłoci alpejskiej (*Solidago alpestris* WALDST. & KIT.), nawłoci późnej (*Solidago gigantea* AITON), nawłoci wąskolistnej (*Solidago graminifolia* (L.) ELLIOTT), nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea* L. s. STR.) (Mirek i in. 2002). Niektórzy, jako odrębny gatunek, wyróżniają jeszcze nawłóć najwyższą (*Solidago altissima* L.) (Rutkowski 2015). Nawłóć kanadyjska została sprowadzona ze względu na walory dekoracyjne oraz wartość miododajną i późny termin kwitnienia (Sudnik-Wójcikowska 2015). Nawłóć kanadyjska należy do roślin uznawanych za inwazyjne (Tokarska-Guzik i in. 2012). Z przydomowych ogródków i cmentarzy rozprzestrzeniła się na siedliska naturalne i półnaturalne. Gatunki nawłoci mogą być uznawane za biowskaźnik obecności odłogów na danym terenie, niezależnie od rodzaju gleby (Rola, Rola 2010). Obecnie spotykana jest na obszarze całej Polski, w różnorodnych typach siedlisk przyczyniając się, między innymi, do zmian w krajobrazie (Szymura, Wolski 2006). W krótkim okresie staje się byliną dominującą, wypierając rodzime składniki flory i powodując monotypizację fitocenozy. Intensywną ekspansję tego gatunku umożliwia: szybki wzrost, odporność na warunki środowiskowe, niskie wymagania siedliskowe, możliwość rozmnażania wegetatywnego i generatywnego, długowieczność klonów oraz intensywny wzrost klonalny (Kopeć i in. 2014). Kolonizacji siedlisk sprzyja duża liczba produkowanych nasion (pojedynczy pęd może wytworzyć od 1100 do 19 000 niełupek) rozprzestrzeniających się głównie anemochorycznie (Jezierska-Domaradzka, Domaradzki 2012). Opanowywanie nowych terenów zawdzięcza również zdolnościom allelopatycznym. W warunkach *in vitro* potwierdzono działanie hamujące rozwój innych roślin przez pochodne poliacetylenowe (DME – dehydromatricaria ester) (Butcko, Jensen 2002; Sun i in. 2006; Yang i in. 2007; Abhilasha i in. 2008). Wśród innych metabolitów wtórnych, mających działanie fitotoksyczne względem roślin wyższych, znalazły się także: diterpeny, saponiny oraz fenole (Sekutowski i in. 2012). Kolejną cechą świadczącą o inwazyjności nawłoci kanadyjskiej jest możliwość tworzenia mieszańców, w Europie np. pomiędzy *S. canadensis* a *S. virgaurea* (Pliszko 2013).

Gatunki nawłoci przyczyniają się również do zubożenia fauny. Zjawisko to jest widoczne w przypadku niektórych siedlisk, np. naturalnych i półnaturalnych łąk. Obecność gatunków inwazyjnych prowadzi do zmniejszenia bogactwa gatunkowego oraz liczebności osobników w populacjach ptaków (*Aves*), dzikich pszczoł (*Apiformes*), bzygów (*Syrphidae*), motyli (*Lepidoptera*), oraz mrówkowatych (*Formicidae*) (Moroń i in. 2009; Skórka i in. 2010; Lenda i in. 2013).

Pomimo licznych zagrożeń, jakie stwarza dla ekosystemów, jest to również gatunek leczniczy, wykorzystywany już przez Indian w Ameryce Północnej. Jako surowiec, stosuje się głównie ziele nawłoci (*Herba Solidaginis*), które posiada właściwości moczopędne oraz antybakteryjne. Wśród związków o działaniu prozdrowotnym należy wymienić między innymi: flawonoidy, saponiny, związki fenolowe i niewielkie ilości olejku eterycznego (Gudej, Owczarek 2012). Ziele nawłoci stosuje się zwłaszcza przy dolegliwościach związanych z infekcjami dróg moczowych oraz nadciśnieniu. Ponadto, znajduje zastosowanie w stanach zapalnych układu płciowego, przewodu pokarmowego, jamy ustnej, przy owrzodzeniach skóry czy trudno gojących się ranach (Jambor 2012; Trąba i in. 2012).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie rozmieszczenia nawłoci kanadyjskiej w płatach muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej oraz określenie jej oddziaływania w stosunku do liczby stwierdzonych gatunków roślin naczyniowych na stanowiskach badawczych.

2. Materiał i metody

Badania florystyczne na murawach kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej prowadzono w sezonie wegetacyjnym w 2014 i 2015 roku. W badaniach florystycznych zastosowano metodę kartogramu, zgodnie z założeniami metodycznymi dla ATPOL (Zajac 1978). Za podstawową jednostkę uznano kwadrat o boku 2,5 km. W sumie obserwacjami objęto 234 jednostki. Za stanowisko przyjęto zwarty płat murawy. Ze zgromadzonych list florystycznych wyodrębniono płaty muraw kserotermicznych, zawierających w składzie gatunkowym nawłoc kanadyjską.

W celu określenia oddziaływania gatunku inwazyjnego na siedlisko półnaturalne, przy każdym płacie murawy kserotermicznej podano liczbę wszystkich stwierdzonych gatunków oraz określono inwazyjność nawłoci kanadyjskiej według następującej skali:

- I – gatunek tworzy pojedyncze kępy, pokrywa do 25% powierzchni,
- II – gatunek tworzy pojedyncze kępy, pokrywa 25-50% powierzchni,
- III – gatunek tworzy porożrywane łąny, pokrywa 50-75% powierzchni,
- IV – gatunek tworzy jednolity łąn, pokrywa 75-100% powierzchni.

3. Teren badań

Wyżyna Sandomierska, pod względem podziału fizycznogeograficznego, stanowi mezoregion wschodniej części Wyżyny Kieleckiej. Zajmuje około 1140 km² (Kondracki 2011). Pod względem administracyjnym, obejmuje głównie trzy powiaty województwa świętokrzyskiego: sandomierski, opatowski oraz ostrowiecki. Krajobraz badanego terenu jest typowo rolniczy. Od lat gleba wykorzystywana jest pod sadownictwo, uprawy warzywnicze, zbóż oraz winorośli. Obecnie jest to jeden z największych regionów rolniczych Polski. Przyczyniły się do tego uwarunkowania edaficzne, jak i klimatyczne. Gleby żyzne, głównie czarnoziemy rozwijają się na skale macierzystej, jaką jest less. Ponadto, wyższa temperatura powietrza, jednostajne natężenie nasłonecznienia, długi okres bezprzymrozkowy prowadzą do uzyskania większych plonów niż w innych częściach kraju.

Notatki dotyczące flory oraz roślinności Wyżyny Sandomierskiej były publikowane począwszy od XIX wieku za sprawą Łapczyńskiego (1887). Późniejsze prace zapoczątkował Dziubałtowski (1918, 1922, 1923, 1925) oraz Kozłowska (1925). Znaczące w badaniach nad florą oraz roślinnością muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej były publikacje Głazka (1964, 1968a, b, 1978). Kolejnymi pracami są liczne materiały rodologiczne Popka (1967, 1983) z Gór Pieprzowych, a także Krzaczk (1967) z okolic Sandomierza, Opatowa i Ożarowa. Współcześnie ukazały się publikacje odnoszące się do rozmieszczenia nowych stanowisk rzadkich gatunków muraw kserotermicznych (Ruraż 2015, 2016), roślin inwazyjnych Wyżyny Sandomierskiej (Ruraż, Panek 2016) oraz flory Sandomierza (Panek 2016; Panek, Ruraż 2016).

Obiektem prowadzonych badań są poszczególne płaty muraw kserotermicznych. To siedliska półnaturalne, nieleśne zbiorowiska roślinne. Ich charakter uwarunkowany jest specyficznymi cechami klimatu – przewagą parowania nad opadami, wysokimi temperaturami w lecie, niskimi opadami, silnym suchym wiatrem i ostrymi zimami. Murawy występują w miejscach wybitnie ciepłych, suchych oraz nasłonecznionych. Zajmują jednak niewielkie powierzchnie zboczy o wystawie przeważnie S, SW i SE. Obecnie obserwowane są między innymi, na krawędziach dolin rzecznych, wyżynnych wzniesień, wychodni skalnych, kamieniołomów czy skarp śródpolnych. Dodatkowym niezbędnym czynnikiem warunkującym ich istnienie jest podłoże o odczynie zasadowym lub obojętnym, bogate w węglan wapnia (Barańska, Jermaczek 2009).

Murawy kserotermiczne Wyżyny Sandomierskiej reprezentowane są głównie przez zbiorowiska ze związku *Cirsio-Brachypodion pinnati* HADAČ ET KLIKA 1944 EM. KRAUSCH 1961. Osobliwością badanego terenu, pod względem florystycznym,

jest występowanie dosyć licznych populacji wiśni karłowatej (*Cerasus fruticosa* PALL.). Najbardziej znanym oraz cennym stanowiskiem muraw kserotermicznych są Góry Pieprzowe (ryc. 1). Objęte są one zarówno ochroną rezerwatową (od 1979 roku) oraz posiadają status Obszaru Specjalnej Ochrony Siedlisk NATURA 2000.



Rycina 1. Fragment murawy kserotermicznej w Górach Pieprzowych (*Sisymbrio-Stipetum capillatae* (DZIUB. 1925) MEDW.-KORN. 1959), (fot. K. Ruraż, 21.08.2015 r.)

4. Wyniki

Podczas prowadzonych badań terenowych w latach 2014-2015 nawłóć kanadyjską odnotowano na 47, spośród 87 obserwowanych stanowisk. Analizowane płaty muraw kserotermicznych znajdują się w 33 kwadratach o boku 2,5 km (tab. 1). Średnia liczba gatunków, przypadająca na stanowisko, wynosi 45. Największą ich liczbę (84 gatunki) stwierdzono dla murawy kserotermicznej w Gałkowicach Ocín. Inwazyjność badanego gatunku nawłóci kanadyjskiej kształtuje się w całej rozpiętości przyjętej skali. Pod tym względem najczęściej, ponieważ w 22 przypadkach,

zaobserwowano nawłóć tworzącą pojedyncze kępy, z pokryciem gatunku, stanowiącym 25-50% powierzchni. W płatach, w których stwierdzono czwarty stopień inwazyjności, liczba stwierdzonych gatunków roślin jest niższa niż wartość średnia. Podobnie sytuacja kształtuje się w przypadku trzeciego stopnia inwazyjności (w 9 na 13 płatach liczba gatunków kształtowała się poniżej średniej). Największą inwazyjność nawłoci kanadyjskiej w płatach muraw kserotermicznych zaobserwowano w miejscowościach: Chrapanów (FE 7220), Dąbie (FE 7233), Dacharzów (FE 8132), Czermin (FE 8212) oraz Wielogóra (FE 9122).

Tabela 1. Rozmieszczenie nawłoci kanadyjskiej w siatce kwadratów o boku 2,5 km, stopień jej inwazyjności oraz liczba gatunków w płatach muraw kserotermicznych Wyzyny Sandomierskiej

Numer kwadratu	Liczba gatunków	Stopień inwazyjności nawłoci kanadyjskiej
EE 6812	35	II
EE 8833	50	II
EE 9901	50	II
EE 9901	45	II
EE 9912	40	II
FE 7010	58	II
FE 7021	53	II
FE 7033	29	III
FE 7033	21	II
FE 7213	43	II
FE 7213	34	I
FE 7220	18	IV
FE 7220	58	II
FE 7233	33	IV
FE 8001	41	III
FE 8023	43	III
FE 8023	23	II
FE 8023	37	III
FE 8023	42	III
FE 8120	56	II
FE 8123	34	II
FE 8123	33	III
FE 8130	81	II
FE 8132	61	II
FE 8132	44	IV

Numer kwadratu	Liczba gatunków	Stopień inwazyjności nawłoci kanadyjskiej
FE 8133	33	III
FE 8212	38	IV
FE 8213	62	III
FE 8220	36	III
FE 8220	57	III
FE 8221	70	I
FE 8221	84	II
FE 8221	36	I
FE 8222	49	I
FE 8222	66	III
FE 8231	38	III
FE 9000	49	II
FE 9010	65	I
FE 9012	57	II
FE 9033	52	I
FE 9120	21	II
FE 9122	25	IV
FE 9131	47	I
FE 9131	36	II
FE 9132	25	II
FE 9201	55	III
FE 9212	61	II

5. Dyskusja

Wpływ inwazyjnych gatunków roślin zachodzi przede wszystkim w trzech sferach życia, tj. społecznej, ekonomicznej oraz ekologicznej. Z uwagi na poruszane zagadnienie, najbardziej istotny stopień oddziaływań występuje w ostatniej z wymienionych sfer. Coraz powszechniejszym zjawiskiem jest intensywne rozprzestrzenianie się tej grupy gatunków wśród ekosystemów naturalnych i półnaturalnych. Rośliny inwazyjne, wkracząc na do tej pory niezajęte siedlisko, przyczyniają się do wypierania gatunków rodzimych. Prowadzi to do zubożenia bioróżnorodności danego ekosystemu. Zmiany w składzie gatunkowym koncentrują się wokół zarówno zmniejszenia liczebności, jak i zaniku wielu gatunków cennych oraz światłożądnych. Przyszły proces rozwoju danego ekosystemu najlepiej odzwierciedla

zmniejszająca się zasobność glebowego banku nasion. Dlatego też wraz z upływem czasu, można zaobserwować utratę regionalnej odrębności fitocenoz, co skutkuje jej monotypizacją. Należy pamiętać, iż zmiany mogą ulegać również właściwości fizykochemiczne gleby, między innymi, odczyn pH, gęstość objętościowa oraz zawartość poszczególnych pierwiastków (Domaradzki i in. 2013; Szymura, Szymura 2013; Chmura 2014).

Uzyskane wyniki potwierdzają ogólnie przyjętą tezę o wypieraniu gatunków roślin w wyniku zwiększenia zajmowanej powierzchni przez inwazyjną nawłoc kanadyjską. Analizowane murawy kserotermiczne wyraźnie charakteryzuje spadek bioróżnorodności gatunkowej, a tym samym zubożenie i przekształcenie siedliska, a w dalszym etapie jego zanik. Należy mieć na uwadze również inne czynniki, które wpłynęły na ten stan, między innymi, udział drzew i krzewów, innych gatunków inwazyjnych, powierzchnię płatu siedliska. Biorąc pod uwagę płaty o największym stopniu inwazyjności, nawłoc kanadyjska intensywnie rozprzestrzenia się wśród skarp śródpolnych (Chrapanów (FE 7220), Czermin (FE 8212)) w szczególnie tych, mających postać izolowanych wysp. Otoczone są one zazwyczaj polami uprawnymi, a także obsadzone przez drzewa owocowe. Podobną zależność można stwierdzić w przypadku stanowisk, które są związane z dolinami rzecznyymi wyżyny, w takich miejscowościach, jak: Dąbie (FE 7233), Dacharzów (FE 8132) oraz Wielogóra (FE 9122). Wcześniejsze badania florystyczne muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej były prowadzone przez Głazka (1968a). Na liście florystycznej z tego okresu, jako gatunek inwazyjny, wymieniana jest jedynie nawłoc późna. Autor podaje jej masowe występowanie na zboczach lessowych o ekspozycji północnej oraz powszechne występowanie na całym terenie.

Interesującym wydaje się fakt, iż obecność nawłoci kanadyjskiej notowano częściej we wschodniej części Wyżyny Sandomierskiej. Niewątpliwie ma na to wpływ silnie rozwinięte rolnictwo, gdyż pola uprawne oraz sady są systematycznie poddawane zabiegom agrotechnicznym, co prowadzi do ograniczenia rozwoju nawłoci. Natomiast znajdujące się na wyżynie płaty muraw kserotermicznych są dogodnymi miejscami umożliwiającymi niezakłócony rozwój gatunku inwazyjnego. Taką zależność udowodniły również badania innych autorów (Rola, Rola 2010; Babczyńska-Sendek i in. 2012), które potwierdzają obecność nawłoci na terenach nie poddawanych uprawie. Dodatkowo, należy podkreślić, iż badane siedliska są wystawione na liczne zagrożenia, chociażby ze strony gatunków synantropijnych, braku użytkowania czy postępującego zarastania, potęgując obserwowane zjawisko.

Nawłoc kanadyjska posiada szeroki zakres tolerancji względem wskaźnika granulometrycznego gleby (2-4). Rozwija się zarówno na żwirach, piaskach oraz na glinach piaszczystych czy ciężkich (Zarzycki i in. 2002). Obecność żyznych gleb

badanego terenu szczególnie sprzyja rozprzestrzenianiu się nawłoci wśród płatów muraw kserotermicznych. Ten proces zachodzi szybciej oraz bardziej dynamicznie na glebach zasobnych w składniki odżywcze w porównaniu do gleb uboższych. Dlatego też niezbędnym zabiegiem jest włączenie najcenniejszych płatów muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej pod ochronę czynną. Brak ochrony czynnej w szybkim czasie może doprowadzić bowiem do całkowitego zaniku lub przekształcenia kolejnych płatów tego siedliska i wymarcia wielu rzadkich roślin. Wiele płatów muraw i gatunków kserotermicznych znanych z danych literaturowych, nie udało się obecnie potwierdzić. Prawdopodobnie część z nich została utracona bezpowrotnie.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Recenzentom za cenne uwagi do niniejszego opracowania.

Literatura

- Abhilasha D., Quintana N., Vivanco J., Joshi J., 2008. Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? J. Ecol., 96: 993-1001.
- Babczyńska-Sendek B., Błońska A., Hejdysz J., 2012. Characteristics of the flora of fallow lands on rendzina soils on the Twardowice Plateau (Silesian Upland). Acta Agrobot., 65(4): 75-90.
- Barańska K., Jermaczek A., 2009. Poradnik utrzymania i ochrony siedliska przyrodniczego 6210-murawy kserotermiczne. Wydawnictwo Klubu Przyrodników, Świebodzin.
- Butcko V.M., Jensen R.J., 2002. Evidence of tissue-specific allelopathic activity in *Euthamia graminifolia* and *Solidago canadensis* (Asteraceae). Am. Midl. Nat., 148: 253-262.
- Chmura D., 2014. Soils characteristics of forest phytocoenoses occupied by self-regenerating populations of *Quercus rubra* in Silesian Upland. Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology, 19(1-2): 109-117.
- Domaradzki K., Dobrzański A., Jezierska-Domaradzka A., 2013. Rośliny inwazyjne – występowanie, znaczenie i zagrożenie dla bioróżnorodności. Postępy w ochronie roślin, 53(3): 613-620.
- Dziubałtowski S., 1918. Rozwój roślinności na porębach lessowych w Sandomierskiem w oświetleniu florystyczno-statystycznym. Sprawozdania z Posiedzeń Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, Wydział III, Nauk Matematycznych i Przyrodniczych, 11(2): 187-245.
- Dziubałtowski S., 1922. O zbiorowiskach roślinnych godnych ochrony w Sandomierskiem i Opatowskiem. Kosmos, 47(1, 2, 3): 30-38.

- Dziubałtowski S., 1923. La distribution et l'ecologie des associations steppiques sur le plateau de la Petite Polotne. Acta Soc. Bot. Pol., 1(3): 185-200.
- Dziubałtowski S., 1925. Les associations steppiques sur le plateau de la Petite Pologne et leur succesions. Acta Soc. Bot. Pol., 3(2): 164-195.
- Głazek T., 1964. Rozmieszczenie stanowisk wiśni karłowatej (*Cerasus fruticosa* (Pall.) Woronow) i ostnicy włosowatej (*Stipa capillata* L.) w dorzeczu Opatówki na Wyżynie Sandomierskiej. Zeszyty Naukowe UAM, 5: 154-165.
- Głazek T., 1968a. Flora kserotermiczna Wyżyny Sandomierskiej i Przedgórza Iłżeckiego. Wyd. Art.-Graf., Kraków.
- Głazek T., 1968b. Roślinność kserotermiczna Wyżyny Sandomierskiej i Przedgórza Iłżeckiego. Monogr. Bot., 25: 1-133.
- Głazek T., 1978. Flora Gór Pieprzowych pod Sandomierzem. Fragm. Florist. Geobot., 24(2): 197-224.
- Gudej J., Owczarek A., 2012. Roślinne surowce lecznicze – badania makroskopowo-mikroskopowe. Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Katedra i Zakład Farmakognozji, Łódź.
- Jambor J., 2012. Fitoterapia chorób układu moczowego. Przegląd Urologiczny, 1(71): 23-29.
- Jezierska-Domaradzka A., Domaradzki K., 2012. *Solidago canadensis* jako potencjalny gatunek energetyczny – zagrożenia dla środowiska przyrodniczego oraz ocena naturalnych zasobów surowca na przykładzie wybranych odłogowanych pól w powiecie wołowskim na Dolnym Śląsku. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Rolnictwo C, 584: 43-51.
- Kondracki J., 2011. Geografia regionalna Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kopeć D., Michalska-Hejduk D., Polak A., Polak P., 2014. Gatunki z rodzaju nawłóć *Solidago* spp. [W:] Otręba A., Michalska-Hejduk D. (red.), Inwazyjne gatunki roślin w Kampinoskim Parku Narodowym i w jego sąsiedztwie. Kampinoski Park Narodowy, Izabelin, 54-60.
- Kozłowska A., 1925. Zmienność kostrzewy owczej (*Festuca ovina* L.) w związku z sukcesją zespołów stepowych na Wyżynie Małopolskiej. Spraw. Kom. Fizjogr. PAU, 60: 63-110.
- Krzaczek W., 1967. Materiały rodologiczne z Okręgu Sandomiersko-Opatowskiego. Fragm. Florist. Geobot., 13(4): 475-482.
- Lenda M., Witek M., Skórka P., Moroń D., Woyciechowski M., 2013. Invasive alien plants affect grassland ant communities, colony size and foraging behavior. Biol. Invasions, 15: 2403-2414.
- Łapczyński K., 1887. Roślinność Sandomierza i Gór Pieprzowych. Pam. Fizjogr., 7(3): 44-59.
- Matuszkiewicz W., 2014. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M., 2002. Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist. [W:] Mirek Z. (red.), Biodiversity of Poland 1. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków, 1-188.
- Moroń D., Lenda M., Skórka P., Szentgyörgyi H., Settele J., Woyciechowski M., 2009. Wild pollinator communities are negatively affected by invasion of alien goldenrods in grassland landscapes. *Biol. Conserv.*, 142: 1322-1332.
- Panek M., 2016. Nowe stanowiska rzadkich gatunków roślin naczyniowych z Sandomierza. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 23(1): 151-156.
- Panek M., Ruraż K., 2016. Śródmiejskie wzgórza ostoją roślin ciepłolubnych na przykładzie Sandomierza. [W:] Klich M., Kozłowski J. (red.), Odnawialne źródła energii i gospodarka odpadami oraz ochrona i gospodarowanie zasobami przyrody – wybrane problemy w Polsce. Wydawnictwa PWSZ w Tarnowie, Tarnów, 211-219.
- Pliszko A., 2013. A new locality of *Solidago ×niederederi* Khek (*Asteraceae*) in Poland. *Biodiv. Res. Conserv.*, 29: 57-62.
- Popek R., 1967. Róże Gór Pieprzowych koło Sandomierza. Cz. I. *Fragm. Florist. Geobot.*, 13(4): 459-474.
- Popek R., 1983. Róże Gór Pieprzowych koło Sandomierza. Cz. II. *Fragm. Florist. Geobot.*, 29(3-4): 345-353.
- Rola J., Rola H., 2010. *Solidago* sp. biowskażnikiem występowania odłogów na gruntach porolnych. *Fragm. Agron.*, 27(3): 122-131.
- Ruraż K., 2015. Rzadkie gatunki roślin naczyniowych muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 22(1): 109-112.
- Ruraż K., 2016. Rzadkie gatunki ciepłolubnych roślin naczyniowych Wyżyny Sandomierskiej. Cz. II. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 23(1): 156-158.
- Ruraż K., Panek M., 2016. Rośliny inwazyjne wybranych siedlisk Wyżyny Sandomierskiej. [W:] Klich M., Kozłowski J. (red.), Odnawialne źródła energii i gospodarka odpadami oraz ochrona i gospodarowanie zasobami przyrody – wybrane problemy w Polsce. Wydawnictwa PWSZ w Tarnowie, Tarnów: 203-209.
- Rutkowski L., 2015. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Sekutowski T., Bortniak M., Domaradzki K., 2012. Ocena potencjału allelopatycznego rośliny inwazyjnej – nawłoci olbrzymiej (*Solidago gigantea*) w odniesieniu do gryki zwyczajnej (*Fagopyrum sagittatum*) oraz słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus*). *J. Res. Appl. Agric. Engng.*, 57(4): 86-91.
- Skórka P., Lenda M., Tryjanowski P., 2010. Invasive alien goldenrods negatively affect grassland bird communities in Eastern Europe. *Biol. Conserv.*, 143: 856-861.
- Sudnik-Wójcikowska B., 2015. Flora Polski. Rośliny synantropijne. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa.

- Sun B.J., Tan J.Z., Wan Z.G., Gu F.G., Zhu M.D., 2006. Allelopathic effects of extracts from *Solidago canadensis* L. against seed germination and seedling growth of some plants. J. Environ. Sci., 18 (2): 304-309.
- Szymura M., Wolski K., 2006. Zmiany krajobrazu pod wpływem ekspansywnych bylin północnoamerykańskich z rodzaju *Solidago* L. Prob. Ekol. Kraj., XVI: 451-460.
- Szymura M., Szymura T.H., 2013. Soil preferences and morphological diversity of golden-rods (*Solidago* L.) from south-western Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 82(2): 107-115.
- Tokarska-Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C., 2012. Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych. Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Trąba Cz., Rogut K., Wolański P., 2012. Rośliny dziko występujące i ich zastosowanie. Przewodnik po wybranych gatunkach. Pro Carpathia, Rzeszów.
- Yang R.Y., Mei L.X., Tang J.J., Chen X., 2007. Allelopathic effects of invasive *Solidago canadensis* L. on germination and growth of native Chinese plant species. Allelopathy J., 19(1): 241-248.
- Zając A., 1978. Założenia metodyczne „Atlasu rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce”. Wiad. Bot., 22(3): 145-155.
- Zarzycki K., Trzcińska-Tacik H., Różański W., Szeląg Z., Wołek J., Korzeniak U., 2002. Ecological indicator values of vascular plants of Poland. [W:] Mirek Z. (red.), Biodiversity of Poland 2. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków, 1-183.

20 Murawy kserotermiczne w miejskim krajobrazie Sandomierza – bogactwo gatunkowe i zagrożenia

Michalina Panek*

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Instytut Biologii, Zakład Botaniki

ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

* e-mail: michalinapanek@wp.pl

Streszczenie: Sandomierz to miasto leżące w południowo-wschodniej części Polski, na terenie makroregionu Kotliny Sandomierskiej i mezoregionu Wyżyna Sandomierska. Granicę pomiędzy nimi wyznacza Wisła. Celem pracy jest przedstawienie bogactwa gatunkowego flory muraw kserotermicznych Sandomierza oraz zwrócenie uwagi na zagrożenia skierowane w kierunku omawianych fitocenoz wynikające z działalności człowieka, takie jak: celowe nasadzenia drzew oraz dynamiczna ekspansja gatunków inwazyjnych. Badania florystyczne na terenie miasta prowadzono w latach 2014-2016. Stwierdzono występowanie 9 płatów roślinności kserotermicznej, o różnej powierzchni (od 2400 m² do 17000 m²) i odmiennym składzie gatunkowym. Wśród flory budującej omawiane fitocenozy szczególnie interesujące są: *Achillea pannonica*, *A. setacea*, *Anemone sylvestris*, *Asperula cynanchica*, *Bothriochloa ischaemum*, *Campanula sibirica*, *Cerasus fruticosa*, *Cerinth minor*, *Eryngium planum*, *Festuca pallens*, *Gentiana cruciata*, *Helichrysum arenarium*, *Nonea pulla*, *Scorzonera purpurea*, *Stachys recta*, *Stipa capillata*, *Thymus marschallianus*. Na wysoką wartość sandomierskich muraw kserotermicznych dodatkowo wpływa fakt, że są one zlokalizowane na terenie miasta. Ich obecność zwiększa różnorodność biologiczną miejskiej flory. W większości przypadków murawy te występują na stromych lessowych zboczach, co chroni je przed rozwojem zabudowy, czy infrastruktury drogowej. Jednak w znacznym stopniu ustępują ekspansywnym gatunkom inwazyjnym.

Słowa kluczowe: murawy kserotermiczne, gatunki inwazyjne, gatunki rzadkie, gatunki chronione

1. Wstęp

Sandomierz jest miastem południowo-wschodniej części województwa świętokrzyskiego, zajmującym powierzchnię 28,8 km². Na jego terenie występują różnego rodzaju zbiorowiska roślinne. Zaczynając od oczywistej dla terenów miejskich roślinności synantropijnej, przez zbiorowiska łąkowe, do wodnych. Jednak najcenniejsze są murawy kserotermiczne wykształcone na podłożu lessowym, zlokalizowane na północ od Wisły. Są to zbiorowiska o charakterze stepowym, cechujące się wysoką bioróżnorodnością (Matuszkiewicz 2013). Ich bogactwo gatunkowe wpływa pozytywnie na różnorodność florystyczną miasta. Z uwagi na budujące je rzadkie, chronione i zagrożone wyginięciem gatunki, są one niezwykle cenne.

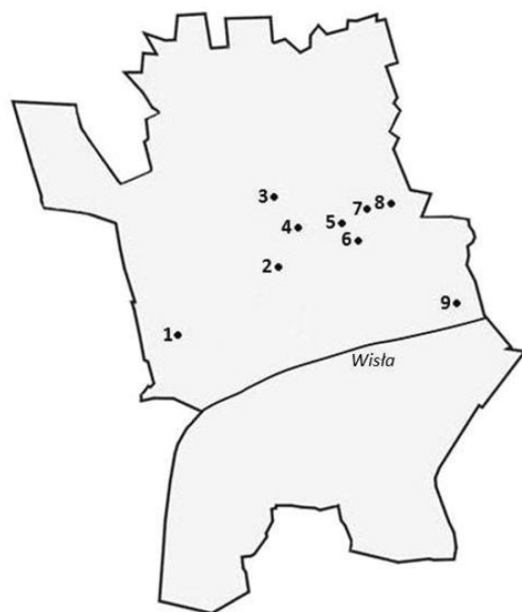
Flora i roślinność Sandomierza wzbudzały zainteresowanie badaczy już od dawna. Pierwsze opracowanie autorstwa Łapczyńskiego pochodzi z 1887 roku. Kolejne prace dotyczyły przeważnie flory i roślinności kserotermicznej Wyżyny Sandomierskiej oraz Gór Pieprzowych. Wśród nich znajdują się opracowania, między innymi, Dziubałtowskiego (1922, 1923, 1925), Kuca (1959), Popka (1967, 1983), Głazka (1968a, b, 1978, 1996), Kostrakiewicza i Popka (1972), Kozika (1981) oraz najnowsze, tj. Ruraż (2015, 2016), Ruraż, Panek (2016), Panek (2016) i Panek, Ruraż (2016).

Celem pracy jest przedstawienie bogactwa gatunkowego flory muraw kserotermicznych Sandomierza oraz zwrócenie uwagi na zagrożenia skierowane w kierunku omawianych fitocenoz, wynikające z działalności człowieka, takie jak: celowe nasadzenia drzew oraz dynamiczna ekspansja gatunków inwazyjnych.

2. Materiał i metody

Badaniami florystycznymi objęto obszar zlokalizowany w granicach administracyjnych Sandomierza. Prace terenowe prowadzono w latach 2014-2016. Polegały one na inwentaryzacji florystycznej 9 muraw kserotermicznych o różnej wielkości (od 2 400 m² do 17 000 m²) zlokalizowanych na terenie miasta. Kryterium wyznaczenia powierzchni badawczych stanowiła obecność gatunków charakterystycznych dla syntaksonów *Festuco-Brometea* BR. BL. et R. TX. i *Trifolio-Geranietea sanguinei* MÜLL. (Matuszkiewicz 2013). Do analiz wybrano jedynie zwarte płyty roślinności, zawierające w swym składzie wspomniane gatunki.

Wszystkie inwentaryzowane powierzchnie znajdują się na terenie jednostki FE92 – 10×10 km zgodnie z ATPOL (Zajac 1978). Każdej z nich przyporządkowano numer od 1 do 9 (ryc. 1).



1 – wzgórze Salve Regina (dzielnica Krakówka); 2 – lessowe wzgórze nieopodal starego miasta; 3 – łagodne zbocze przy ul. E. Kwiatkowskiego; 4 – stroma skarpa przy ul. Przedmieście Zawichojskie; 5 – strome zbocza przy ul. Zamiejskiej; 6 – użytek ekologiczny Kamień Plebański; 7 – wąwozy na południe od ul. Panoramicznej; 8 – wąwozy w okolicy ul. Łukawskiej; 9 – Góry Pieprzowe (fragment leżący w granicach administracyjnych Sandomierza)

Rycina 1. Lokalizacja stanowisk muraw kserotermicznych na terenie Sandomierza

Źródło: opracowanie własne.

W pierwszym sezonie wegetacyjnym wyznaczono powierzchnie badawcze. Natomiast w kolejnych latach prowadzono spisy florystyczne na każdej z nich. Z uwagi na różną powierzchnię badanych płatów, analizy prowadzono dla każdego z osobna. Porównano udział gatunków charakterystycznych dla klasy *Festuco-Brometea* i *Trifolio-Geranietae sanguinei* w stosunku do pozostałych grup syngenetycznych. Zwrócono uwagę na zależność pomiędzy bogactwem gatunkowych poszczególnych płatów a udziałem gatunków z klas *Festuco-Brometea* i *Trifolio-Geranietae sanguinei*. Przedstawiono listę gatunków ciepłolubnych, z zaznaczeniem charakterystycznych dla zbiorowisk kserotermicznych. Przy użyciu odpowiedniej sygnatury, oznaczono gatunki chronione według Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. z 2014 r., poz. 1409). Gatunki rzadkie i zagrożone określono na podstawie *Czerwonej listy roślin naczyniowych Polski* (Zarzycki i Szeląg 2006) oraz *Polskiej czerwonej księgi roślin: paprotniki i rośliny kwiatowe* (Każmierczakowa i in. 2014). Nazewnictwo podano na podstawie Mirka i in. (2002). Wyniki zamieszczono w formie wykresów, tabel i opisów.

3. Teren badań

Sandomierz jest jednym z najstarszych królewskich miast Polski. Za panowania Bolesława Chrobrego był jednym z trzech głównych siedzib Królestwa Polskiego (Buliński 1879). Do dziś zachowała się malownicza starówka, która przez cały rok przyciąga turystów. Aktualnie Sandomierz jest miastem powiatowym województwa świętokrzyskiego, leżącym na terenie makroregionu Kotlina Sandomierska i mezoregionu Wyżyna Sandomierska. Granicę pomiędzy nimi wyznacza Wisła (Kondracki 2011).

Krawędź doliny Wisły rozdziela również krainy geobotaniczne, na których terenie leży Sandomierz. Północna część miasta zaliczana jest do krainy Miechowsko-Sandomierskiej oraz okręgu Sandomiersko-Opatowskiego. Jest to teren bogatszy pod względem florystycznym, przecinany licznymi wąwozami, którego cechą wyróżniającą jest przede wszystkim podłoże lessowe i rozwijająca się na nim roślinność kserotermiczna. Do części tej zaliczany jest także podokręg Góry Pieprzowe charakteryzujący się licznymi odsłonięciami utworów pochodzących z środkowego kambriu. Skałą budulcową wzniesień są szare i ciemnoszare łupki ilaste, częściowo pokryte lessem. Pozostały fragment miasta, położony na południe od Wisły, zaliczany jest do krainy Kotlina Sandomierska. Jest to teren równinny, leżący w znacznym obniżeniu w stosunku do części północnej. Brak tutaj pokrywy lessowej, która została wypłukana już w holocenie. Znaczny udział w pokrywie roślinnej przypada na zbiorowiska łąkowe (Szafer, Zarzycki 1977).

4. Wyniki

W badaniach muraw na terenie Sandomierza stwierdzono obecność dziewięciu płatów o różnych powierzchniach, porośniętych roślinnością ciepłolubną. Granice ich często wyznaczone są sztucznie, poprzez biegnącą nieopodal ulicę, czy zabudowania. W przypadku stanowisk bardziej oddalonych od centrum, badane płaty sąsiadują z polami i sadami.

Ogólna liczba gatunków stwierdzonych podczas prac terenowych wyniosła 219, wśród których 36 związanych jest z syntaksonami klasy *Festuco-Brometea*, natomiast 12 – z *Trifolio-Geranietea sanguinei* (tab. 1). Dwa z nich uznano za rzadkie w skali kraju (*Linosyris vulgaris* CASS., *Thymus marschallianus* WILD.), cztery narażone na wyginiecie (*Cerasus fruticosa* PALL., *Festuca pallens* HOST, *Scorzonera purpurea* L. S. STR., *Stipa capillata* L.) i jeden wymierający (*Achillea setacea*

WALDST. & KIT.) (Zarzycki i Szela 2006, Kaźmierczakowa i in. 2014). Udział we florze zaznaczają również rośliny pod ochroną ścisłą i częściową, odpowiednio w liczbie: 5 i 4. Nie są to tylko taksony charakterystyczne dla zbiorowisk kserotermicznych, ale często w nich notowane, tj. *Cerasus fruticosa* i *Helichrysum arena-rium* (L.) MONECH). Pierwszy z nich występował często, jednak populacje liczyły po kilka osobników, z wyjątkiem stanowiska drugiego, gdzie tworzyły zwarty płat o powierzchni około 200 m².

Tabela 1. Wykaz gatunków ciepłolubnych, charakterystycznych dla klasy *Festuco-Brometea* oraz *Trifolio-Geranietea sanguinei*, rzadkich, zagrożonych (z kategorią zagrożenia) i chronionych oraz stanowiska, na których je notowano

Gatunek	Stanowisko	Gat. Ch. <i>Festuco-Brometea</i>	Gat. Ch. <i>Trifolio- Geranietea sanguinei</i>	Gatunki z PCzL i PCzK	Ochrona gat.
<i>Achillea pannonica</i>	1,5,6,7,8,9	+			
<i>Achillea setacea</i>	4,5,6,9	+		!(E, CR)	
<i>Acinos arvensis</i>	9	+			
<i>Agrimonia eupatoria</i>	1,2,4,5,7,9		+		
<i>Anemone sylvestris</i>	1,7,8		+		●
<i>Arabis hirsuta</i>	9	+			
<i>Artemisia campestris</i>	2,4,5,6,7,8,9	+			
<i>Asparagus officinalis</i>	1,4,5,7	+			
<i>Asperula cynanchica</i>	6,7,9	+			
<i>Bothriochloa ischaemum</i>	9	+			
<i>Brachypodium pinnatum</i>	1,5,7,8	+			
<i>Bromus inermis</i>	7,9	+			
<i>Campanula rapunculoides</i>	1,2,8		+		
<i>Campanula sibirica</i>	2,3,4,5,7,9	+			●
<i>Centaurea scabiosa</i>	1,2,5,6,7,9	+			
<i>Centaurea stoebe</i>	1,4,5,6,7,8,9	+			
<i>Cerasus fruticosa</i>	2,4,5,6,7,9			!(V, VU)	
<i>Cerinthe minor</i>	2,5				
<i>Clinopodium vulgare</i>	1,7,9		+		
<i>Coronilla varia</i>	1,4,7		+		
<i>Dianthus carthusianorum</i>	1,4,5,6,7,8,9	+			
<i>Eryngium planum</i>	5,8,9				
<i>Euphorbia cyparissias</i>	1,2,3,5,6,7,9	+			

<i>Festuca pallens</i>	5	+		!(V)	●
<i>Festuca rupicola</i>	2,9	+			
<i>Filipendula vulgaris</i>	1,3,4,5,7	+			
<i>Galium mollugo</i>	7,9	+			
<i>Galium verum</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9		+		
<i>Gentiana cruciata</i>	7,9				●
<i>Helianthemum nummularium</i>	1	+			
<i>Helichrysum arenarium</i>	7				◐
<i>Hieracium bauhinii</i>	5	+			
<i>Koeleria macrantha</i>	4,5,9	+			
<i>Linosyris vulgaris</i>	4,9	+		!(R)	◐
<i>Medicago falcata</i>	1,5,6,7,8,9,		+		
<i>Nonea pulla</i>	2,3,7				
<i>Onobrychis viciifolia</i>	1,2,7	+			
<i>Origanum vulgare</i>	1,2,4,5,7,8,9		+		
<i>Orthanta lutea</i>	6,9	+			
<i>Plantago media</i>	2,3,5,7	+			
<i>Potentilla arenaria</i>	2,4,5,6,9	+			
<i>Prunella grandiflora</i>	1,3,7,8				
<i>Salvia pratensis</i>	1,2,3,5,7,8,9				
<i>Sedum maximum</i>	2,6,7,8,9				
<i>Scabiosa columbaria</i>	1,7,8	+			
<i>Scabiosa ochroleuca</i>	1,3,6,7,8,9	+			
<i>Scorzonera purpurea</i>	5,9	+		!(V)	●
<i>Seseli annuum</i>	1,5,9	+			
<i>Stachys recta</i>	2,4,5,6,7	+			
<i>Stipa capillata</i>	4,5,6,7,9	+		!(V)	●
<i>Thalictrum minus</i>	1		+		
<i>Thymus marschallianus</i>	1,4,6,9	+		!(R)	
<i>Valeriana angustifolia</i>	7		+		
<i>Veronica austriaca</i>	5,9	+			
<i>Veronica spicata</i>	7,8,9	+			
<i>Veronica teucrium</i>	2,7		+		
<i>Viola hirta</i>	4		+		
SUMA:		36	12	7	●-5 ◐-4

1-9 – numery stanowisk, na których odnotowano gatunki; + – gatunki charakterystyczne dla syntaksonów klas *Festuco-Brometea* oraz *Trifolio-Geranietea sanguinei*; PCzL – Czerwona lista roślin naczyniowych Polski; PCzK – Polska czerwona księga roślin; ! – gatunki rzadkie i zagrożone (CR – krytycznie zagrożony; E – wymierający; V – narażony na wymarcie; VU narażony; R – rzadki); ● – gatunki objęte ochroną ścisłą; ◐ – gatunki objęte ochroną częściową

Źródło: opracowanie własne.

Łączna liczba gatunków z klas *Festuco-Brometea* oraz *Trifolio-Geranietea sanguinei* zawiera się w przedziale od 6 do 32 na pojedynczą powierzchnię badawczą. Średni procentowy udział gatunków kserotermicznych dla poszczególnych płątów wynosi 25. W przypadku murawy 1. i 7., mimo dużej różnicy w wielkości (odpowiednio 2400 m² i 17000 m²), aż 33% składu syntaksonomicznego flory stanowią gatunki kserotermiczne. Z kolei murawy 3. i 4. – o zbliżonej powierzchni (odpowiednio 6600 m² i 6500 m²) posiadają takie samo bogactwo gatunkowe. Różnią się jednak udziałem gatunków kserotermicznych. W pierwszym przypadku stanowią one jedynie 10% flory, natomiast w drugim aż 30%. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy powierzchnią murawy a jej bogactwem florystycznym. Poniżej (tab. 2) przedstawiono bogactwo gatunkowe poszczególnych muraw oraz procentowy udział gatunków kserotermicznych, w odniesieniu do powierzchni zajmowanych przez badane płąty.

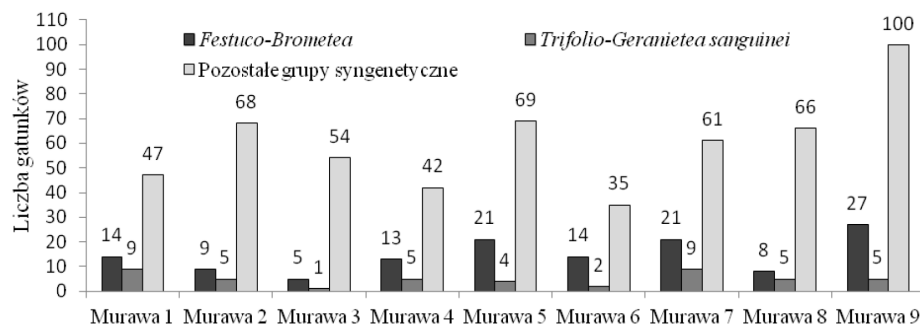
Tabela 2. Bogactwo gatunkowe muraw kserotermicznych oraz procentowy udział gatunków związanych z klasą *Festuco-Brometea* oraz *Trifolio-Geranietea sanguinei*

Numer murawy	Powierzchnia murawy (m ²)	Bogactwo gatunkowe	Udział gatunków kserotermicznych (%)
1	2400	70	33
2	7200	83	17
3	6600	60	10
4	6500	60	30
5	8900	94	27
6	2600	52	31
7	13200	92	33
8	5700	81	16
9	17000	134	24

Źródło: opracowanie własne.

W przypadku każdej z analizowanych muraw, zaznacza się zdecydowana przewaga gatunków charakterystycznych dla syntaksonów *Festuco-Brometea* nad *Trifolio-Geranietea sanguinei*. Prócz trzech płątów muraw, ich liczba przekracza 10 gatunków. Na większości muraw liczba gatunków pozostałych grup syngenetycznych mieści się w przedziale od 35 do 69. Wśród nich występują elementy flory związane ze środowiskiem miejskim, tj.: gatunki ruderalne, segetalne, zaroślowe, a także rośliny ozdobne. Liczbowy stosunek gatunków z klas *Festuco-Brometea*,

Trifolio-Geranietea sanguinei oraz pozostałych grup syngenetycznych na poszczególnych murawach przedstawia rycina 2.



Rycina 2. Udział grup syngenetycznych na poszczególnych murawach

Źródło: opracowanie własne.

Podczas wyboru płątów do badań zauważono istotne zagrożenie w postaci rozległych łąnów *Solidago canadensis* L. W wielu przypadkach pomiędzy kępami tego gatunku stwierdzono pojedyncze osobniki gatunków ciepłolubnych, najczęściej było to *Origanum vulgare* L. Można zatem przypuszczać, iż w niedalekiej przeszłości w miejscach tych znajdowały się zbiorowiska o charakterze kserotermicznym. Omawiany gatunek notowano na badanych powierzchniach, za wyjątkiem stanowiska 1. i 2. *Solidago canadensis* to niestety nie jedyny przedstawiciel roślin inwazyjnych stwierdzonych na obszarze sandomierskich muraw. Na badanym terenie odnotowano także *Reynoutria japonica* HOUTT. – stanowisko 3, *Robinia pseudoacacia* L. – 3, 4, 5, 6, 7, 9 oraz *Juglans regia* L. – 2, 3, 5, 7, 8, 9. Pierwszy z nich występuje w płacie zlokalizowanym w sąsiedztwie ruchliwej ulicy oraz zabudowań mieszkalnych. Murawa ta, jak udało się zaobserwować, jest koszona raz w roku, czemu zapewne zawdzięcza swe istnienie, ponieważ działanie to uniemożliwia rozprzestrzenianie się gatunku inwazyjnego. Dwa kolejne taksony występują często na inwentaryzowanych powierzchniach, lecz w dosyć dużych odstępach pomiędzy osobnikami, przez co aktualnie nie mają tak negatywnego wpływu na zachowanie siedlisk, jak ma to miejsce w przypadku *Solidago canadensis*. Niestety, na stanowisku 2 zaobserwowano celowe, gęste nasadzenia *Juglans regia*. Są to obecnie młode rośliny dorastające do 0,5 m wysokości, jednak z czasem, zacieniając murawę, mogą przyczynić się do jej zaniku.

5. Dyskusja

Płaty roślinności ciepłolubnej na terenie Sandomierza zlokalizowane są jedynie po północnej stronie Wisły. Jest to obszar zaliczany do Wyżyny Sandomierskiej zbudowany z utworów lessowych. Istnieją tu odpowiednie warunki do rozwoju omawianej roślinności.

Sandomierskie murawy kserotermiczne reprezentują dobrze zachowane płaty ze związków *Cirsio-Brachypodium pinnati* HADAČ et KLIKA oraz *Festuco-Stipion* KLIKA, jak również liczne ich formy mozaikowe, przejściowe lub zaburzone. Przyczyną tego jest duży udział przedstawicieli flory typowej dla terenów miejskich i podmiejskich, które wnikają na siedliska ciepłolubne. Są to gatunki ruderalne, segetalne, często też rośliny ozdobne i zaroślowe. Już w 1887 roku Łapczyński zwracał uwagę na interesujące gatunki ciepłolubne, nazywając je wówczas „wąwozowymi”. Po wielu stanowiskach, podanych wówczas przez autora, obecnie nie ma śladu. Zgodnie z ów spadkową tendencją, w przyszłości sandomierska flora może być uboższa o kolejne składniki.

Badane powierzchnie to jedyne fragmenty muraw kserotermicznych, jakie zachowały się do dziś. Mimo różnej wielkości i odmiennego bogactwa florystycznego, są one równie ważne z uwagi na coraz mniejszą powierzchnię jaką zajmują. Wśród składników flory budującej omawiane zbiorowiska, znajduje się wiele rzadkich, zagrożonych i chronionych gatunków. Wartość badanych muraw kserotermicznych dodatkowo podnosi fakt, iż zlokalizowane są na terenie miasta, w miejscu silnie przekształconym przez człowieka, gdzie można byłoby spodziewać się głównie flory synantropijnej. Bogactwo gatunkowe badanych powierzchni jest średnio o 25% wyższe, dzięki obecności gatunków kserotermicznych. Zatem obecność omawianych zbiorowisk pozytywnie wpływa na bioróżnorodność miejskiej flory.

Wiele z tych siedlisk ocalało w miejskim krajobrazie, z uwagi na ukształtowanie terenu (liczne strome skarpy, głębokie wąwozy), dzięki któremu nie są one narażone na zniszczenie przez rozwój infrastruktury drogowej, zabudowę czy uprawy. Jednak wiele muraw kserotermicznych z tej przyczyny obecnie nie istnieje. Największym zagrożeniem dla sandomierskich muraw nie jest wyłącznie bezpośredni wpływ działalności ludzkiej oraz specyficzne położenie w obrębie miasta. Istotną przyczyną ich zaniku jest również naturalna sukcesja gatunków zaroślowych oraz obecność roślin inwazyjnych, a przede wszystkim *Solidago canadensis*, która w znaczący sposób zmienia warunki siedliskowe. Jest to roślina pochodząca z Ameryki Północnej, zdomowiona na terenie kraju, posiada status gatunku inwazyjnego (Tokarska-Guzik i in. 2012). Tworząc zwarte łany w krótkim czasie wypiera pozostałe gatunki ze zbiorowisk. W dużym stopniu porasta ona lessowe zbocza

Sandomierza oraz całej Wyżyny Sandomierskiej, skutecznie wypierając roślinność kserotermiczną (Ruraż, Panek 2016). W pracy dotyczącej flory muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej (Głazek 1968a), autor, wymieniając gatunki inwazyjne tychże siedlisk, nie podaje *Solidago canadensis*, która aktualnie jest rośliną w wielu miejscach dominującą, zarówno na murawach kserotermicznych Sandomierza, jak i całej Wyżyny Sandomierskiej (Ruraż, Panek 2016).

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Recenzentom za cenne uwagi w przygotowaniu niniejszej publikacji.

Literatura

- Buliński M., 1879. Monografia miasta Sandomierza. Wydanie pośmiertne Wawrzyńca Kuklińskiego, Warszawa.
- Dziubałtowski S., 1922. O zbiorowiskach roślinnych godnych ochrony w Sandomierskiem i Opatowskiem. Kosmos, 47: 30-38.
- Dziubałtowski S., 1923. La distribution et l'ecologie des associations steppiques sur le plateau de la Petite Polotne. Acta Soc. Bot. Pol., 1(3): 185-200.
- Dziubałtowski S., 1925. Les associations steppiques sur le plateau de la Petite Pologne et leur succesions. Acta Soc. Bot. Pol., 3(2): 164-195.
- Głazek T., 1968a. Flora kserotermiczna Wyżyny Sandomierskiej i Przedgórza Iłżeckiego. Wyd. Art.-Graf., Kraków.
- Głazek T., 1968b., Roślinność kserotermiczna Wyżyny Sandomierskiej i Przedgórza Iłżeckiego. Monogr. Bot., 25: 1-133.
- Głazek T., 1978. Flora Gór Pieprzowych pod Sandomierzem. Fragm. Flor. Geobot., 24(2): 197-224.
- Głazek T., 1996. Projektowany rezerwat stepu ostnicowego „Kamień Plebański” koło Sandomierza. Chrońmy Przyr. Ojcz., 1: 46-53.
- Każmierczakowa R., Zarzycki K., Mirek Z., 2014. Polska czerwona księga roślin: paprotniki i rośliny kwiatowe. Instytut Ochrony Przyrody, Kraków.
- Kondracki J., 2011. Geografia regionalna Polski. PWN, Warszawa.
- Kostrakiewicz K., Popek R., 1972. Góry Pieprzowe jako przyszły rezerwat przyrody. Chrońmy Przyr. Ojcz., 28(5-6): 11-18.
- Kozik R., 1981. Porosty (Lichenes) Gór Pieprzowych koło Sandomierza. Fragm. Flor. Geobot., 27(4): 641-648.

- Kuc M., 1959. Mchy Wyżyny Sandomiersko-Opatowskiej (Okręg Sandomierski). *Fragm. Flor. Geobot.*, 5(1): 129-150.
- Łapczyński K., 1887. Roślinność Sandomierza i Gór Pieprzowych. *Pamiętnik Fizjograficzny*, 7: 44-59.
- Matuszkiewicz W., 2013. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. PWN, Warszawa.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając A., Zając M., 2002. Flowering plants and pteridophytes of Poland – checklist. [W:] Mirek Z. (red.), *Biodiversity of Poland 1*. Instytut Botaniki im. W. Szafera, PAN, Kraków.
- Panek M., 2016. Nowe stanowiska rzadkich gatunków roślin naczyniowych z Sandomierza. *Fragm. Flor. Geobot. Polonica*, 23(1): 151-156.
- Panek M., Ruraż K., 2016. Śródmiejskie wzgórza ostoją roślin ciepłolubnych na przykładzie Sandomierza. [W:] Klich M., Kozłowski J. (red.), *Odnawialne źródła energii i gospodarka odpadami oraz ochrona przyrody i gospodarowanie zasobami przyrody – wybrane problemy w Polsce*. Wyd. PWSZ w Tarnowie, Tarnów, 211-219.
- Popek R., 1967. Róże Gór Pieprzowych koło Sandomierza. Cz. I. *Fragm. Flor. Geobot.*, 13(4): 459-474.
- Popek R., 1983. Róże Gór Pieprzowych koło Sandomierza. Cz. II. *Fragm. Flor. Geobot.*, 29(3-4): 345-353.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. z 2014 r., poz. 1409).
- Ruraż K., 2015. Rzadkie gatunki roślin naczyniowych muraw kserotermicznych Wyżyny Sandomierskiej. *Fragm. Flor. Geobot. Polonica*, 22(1): 109-112.
- Ruraż K., 2016. Rzadkie gatunki ciepłolubnych roślin naczyniowych Wyżyny Sandomierskiej. Cz. II. *Fragm. Flor. Geobot. Polonica*, 23(1): 156-158.
- Ruraż K., Panek M., 2016. Rośliny inwazyjne wybranych siedlisk Wyżyny Sandomierskiej. [W:] Klich M., Kozłowski J. (red.), *Odnawialne źródła energii i gospodarka odpadami oraz ochrona przyrody i gospodarowanie zasobami przyrody – wybrane problemy w Polsce*. Wyd. PWSZ w Tarnowie, Tarnów, 203-209.
- Szafer W., Zarzycki K., 1977. Szata roślinna Polski 2. PWN, Warszawa.
- Tokarska-Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C., 2012. Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych. Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Zając A., 1978. Założenia metodyczne „Atlasu rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce”. *Wiad. Bot.*, 22(3): 145-155.
- Zarzycki K., Szelaż Z., 2006. Czerwona lista roślin naczyniowych Polski. [W:] Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szelaż Z. (red.): *Czerwona lista roślin i grzybów Polski*. Instytut Botaniki im. W. Szafera, PAN, Kraków.

Ocena palinologiczna wybranych polskich miodów odmianowych

Mirosława **Kupryjanowicz*** / Magdalena **Fiłoc**
/ Anna **Mordasewicz** / Małgorzata **Mach**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Paleobotaniki

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-425 Białystok

* e-mail: m.kupryjanowicz@uwb.edu.pl

Streszczenie: Ocenie melisopalinologicznej poddano 67 miodów. Oznaczono pyłek roślinny na preparatach mikroskopowych wykonanych z próbek poszczególnych miodów, a następnie, na podstawie składu taksonomicznego uzyskanych spektrów pyłkowych, określono odmiany tych miodów. W klasyfikacji odmianowej nie uwzględniono 12 próbek, w których frekwencja pyłku była bardzo niska oraz 2 próbek, w których dominował pyłek roślin nienektarodajnych. W grupie 53 sklasyfikowanych miodów wyróżniono 32 miody z dominującym pyłkiem przewodnim (18 rzepakowych, 7 gryczanych, 4 jarzębinowe, 3 lipowe, 1 komonicowy) oraz 21 miodów wielokwiatowych. W większości przypadków wyniki przeprowadzonych analiz nie potwierdziły klasyfikacji odmianowej podawanej przez producentów. W żadnej próbce nie znaleziono pyłku roślin pozakrajowych – stąd wniosek, że żaden z badanych miodów nie był zafałszowany poprzez zmieszanie miodu krajowego z tańszymi miodami zagranicznymi.

Słowa kluczowe: miód, odmiany miodu, melisopalinologia

1. Wstęp

Jednym z naturalnych składników nektaru wytwarzanego przez rośliny nektarodajne jest ich pyłek. Dostaje się on do nektaru z pylników znajdujących się w pobliżu produkujących nektar miodników (Dyakowska 1959; Szafer 1969). Pyłek własny roślin nektarodajnych, jako naturalny składnik nektaru, trafia wraz z nim do miodu i jest wyznacznikiem jego botanicznego pochodzenia. Wskazany przez pyłek skład nektarowy miodu nadaje mu specyficzne cechy, które decydują o właściwościach odżywczych i zdrowotnych miodu (Szafer 1969; Majewska 2009; Wilczyńska 2012).

Rośliny kwiatowe przyciągają pszczoły nie tylko słodyczą nektaru, ale też pożywnym pyłkiem, który w przypadku roślin nienektarodajnych, jest jedynym pożytkiem, jaki owady otrzymują w zamian za zapylenie kwiatu (Szafer 1969). Z pyłku pszczoły produkują pierzgę, którą zasklepiają plastry z płynnym miodem. Bliskie sąsiedztwo pierzgi i miodu, a głównie czynności związane z wydobywaniem miodu z plastra przez pszczelarzy, powodują przedostawanie się części pierzgi do miodu i wzbogacenie go pyłkiem roślin nienektarodajnych (Dyakowska 1959; Nalewajk 2013). Zatem, miody nektarowe, poza pyłkiem roślin nektarodajnych trafiającym do miodu „drogą nektarową”, zawierają także niewielkie ilości pyłku roślin nienektarodajnych, trafiającego do miodu „drogą pozanektarową”.

Botaniczne pochodzenie miodu definiowane jest jako jego nazwa odmianowa (Wilczyńska 2012). Jej określeniem, w oparciu o analizę taksonomiczną pyłku wchodzącego w skład miodu, zajmuje się dział palinologii stosowanej, nazywany melisopalinologią (Dyakowska 1959; Demianowicz, Demianowicz 1955; Demianowicz 1961; Demianowicz i in. 1981; Warakomska 1962, 1985, 1996; Warakomska, Jaroszyńska 1992; Wróblewska 1995; Warakomska 2003, Teper 2007). Polska Norma na miód pszczeli PN-88/A-77626:1988 definiuje pięć odmian miodu charakteryzujących się odpowiednio wysoką zawartością tzw. pyłku przewodniego, czyli dominującego w miodzie pyłku roślin nektarodajnych (tab. 1). Jego nazwa gatunkowa lub rodzajowa określa odmianę miodu. Przypisany miodom odmianowym procentowy udział pyłku przewodniego danej rośliny zapewnia co najmniej pięćdziesięcioprocentową zawartość nektaru tej rośliny w miodzie (Nalewajk 2013). Miody akacjowe i lipowe, dla których wymagany procentowy udział pyłku przewodniego, jest niższy niż w przypadku pozostałych miodów odmianowych; są one tzw. miodami niedoproszonymi.

Tabela 1. Zawartość procentowa pyłku przewodniego w polskich miodach odmianowych

Odmiana miodu	Roślina, której pyłek jest pyłkiem przewodnim	Udział procentowy pyłku przewodniego
rzepakowy	rzepak (<i>Brassicanapus</i>)	co najmniej 45%
akacjowy	robinia akaczowa (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	co najmniej 30%
lipowy	lipa (<i>Tilia sp.</i>)	co najmniej 20%
gryczany	gryka zwyczajna (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	co najmniej 45%
wrzosowy	wrzos pospolity (<i>Calluna vulgaris</i>)	co najmniej 45%
wielokwiatowy	bez pyłku przewodniego	–

Źródło: Polska Norma na miód pszczeli PN-88/A77626:1988.

Brak szczegółowych regulacji prawnych dotyczących składu nektarowego miodów i ich nazewnictwa, sprzyja dość dowolnemu wprowadzaniu na rynek miodów o nazwach odmianowych. Producenci zwykle klasyfikują swoje miody bez analizy melisopalinologicznej, bazując jedynie na ocenie ich właściwości organoleptycznych (smaku, zapachu, barwy). Jest to dość powszechna praktyka marketingowa służąca podwyższeniu atrakcyjności handlowej miodów, a co za tym idzie – także ich ceny. Innym procederem, prowadzonym w tym samym celu, jest fałszowanie miodów przez mieszanie krajowych miodów odmianowych ze znacznie tańszymi nieodmianowymi miodami importowanymi (Dyakowska 1959; Targoński, Stój 2005; Teper 2007; Nalewajk 2013).

Celem podjętych badań była ocena składu palinologicznego dostępnych w Polsce miodów, których nazwy producentkie wskazywały na to, że są to miody odmianowe, i na tej podstawie oszacowanie udziału miodów zafałszowanych.

2. Materiał i metody

Do badań pozyskano 67 próbek miodów (tab. 2). Przeważającą część próbek uzyskano bezpośrednio od producentów, którzy przekazali je nieodpłatnie do analiz melisopalinologicznych. Część miodów zakupiono w sklepach na terenie Białegostoku. Większość badanych miodów pochodziła z północno-wschodniej Polski. W przypadku kilku próbek (nr 17, 28 i 48) nie określono miejsca produkcji miodu z powodu braku takich danych na etykiecie handlowej. Prawie wszystkie badane miody określone były przez producentów jako odmianowe.

Tabela 2. Zestawienie podstawowych informacji o badanych miodach

Nr próbki	Odmiana miodu według deklaracji producenta	Lokalizacja pasieki / Nazwa firmy	Odmiana miodu określona na bazie danych palinologicznych
Miody pozyskane bezpośrednio od producentów			
15/2015	akacjowy (robiniowy)	Hermanówka	rzepakowy
4/2015	blawatkowaty	Sokółka	gryczany
42/2015	bobikowy	Żelichowo	- (brak pyłku)
22/2015	borówkowy	Tykocin	wielokwiatowy
6/2014	gryczany	Nowa Wola	wielokwiatowy
1/2015	gryczany	Sokółka	wielokwiatowy
6/2015	gryczany	Wasilków	gryczany
8/2015	gryczany	Grabówka	rzepakowy
9/2015	gryczany	Nowy Janów	rzepakowy
10/2015	gryczany	Turośl Kościelna	rzepakowy
11/2015	gryczany	Zambrów	wielokwiatowy
34/2015	gryczany	Elbląg – okolice	jarzębinowy
37/2015	gryczany	Kościerzyna	wielokwiatowy
13/2015	kruszynowy	Hermanówka	rzepakowy
12/2014	leśny	Nowa Wola	-
9/2014	lipowy	Nowa Wola	wielokwiatowy
18/2015	lipowy	Białystok	rzepakowy
30/2015	lipowy	Studzianki	- (brak pyłku)
33/2015	lipowy	Suwałki	jarzębinowy
35/2015	lipowy	Elbląg – okolice	jarzębinowy
41/2015	lipowy	Jantar	wielokwiatowy
16/2015	lipowo-gryczany	Hermanówka	rzepakowy
2/2015	lipowy spadziowy	Sokółka	- (brak pyłku)
26/2015	lipowy spadziowy	Świridy	wielokwiatowy
5/2015	malinowy	Sokółka	gryczany
2/2014	mniszkowy	Nowa Wola	rzepakowy
12/2015	mniszkowy	Hermanówka	rzepakowy
3/2015	rzepakowy	Sokółka	gryczany
38/2015	rzepakowy	Jantar	wielokwiatowy

Nr próbki	Odmiana miodu według deklaracji producenta	Lokalizacja pasieki / Nazwa firmy	Odmiana miodu określona na bazie danych palinologicznych
40/2015	rzepakowo-akacjowy	Jantar	- (brak pyłku)
7/2015	wielokwiatowy	Wasilków	rzepakowy
14/2015	wielokwiatowy	Hermanówka	- (brak pyłku)
17/2015	wielokwiatowy	Konowały	rzepakowy
19/2015	wielokwiatowy	Białystok	wielokwiatowy
20/2015	wielokwiatowy	Świsłoczany	rzepakowy
21/2015	wielokwiatowy	Zawyki	rzepakowy
23/2015	wielokwiatowy	Borsukówka	rzepakowy
24/2015	wielokwiatowy	Borsukówka	- (brak pyłku)
25/2015	wielokwiatowy	Gołdap	wielokwiatowy
27/2015	wielokwiatowy	Jasionowo (gm. Sztabin)	wielokwiatowy
29/2015	wielokwiatowy	Nowy Lipsk	- (brak pyłku)
31/2015	wielokwiatowy	Zalesie (gm. Dobrzyniewo)	rzepakowy
32/2015	wielokwiatowy	Zalesie (gm. Dobrzyniewo)	lipowy
36/2015	wielokwiatowy	Elbląg – okolice	jarzębinowy
43/2015	wielokwiatowy	Rybina	- (brak pyłku)
44/2015	wielokwiatowy	Lublin	- (brak pyłku)
45/2015	wielokwiatowy	Połczyn Zdrój	wielokwiatowy
46/2015	wielokwiatowy	Wadowice	wielokwiatowy
1/2014	-	Sośnia	-
15/2014	-	Sośnia	wielokwiatowy
28/2015	-	Sośnia	wielokwiatowy
39/2015	-	Jantar	- (brak pyłku)
Miody pochodzące z obrotu handlowego			
11/2014	akacjowo-lipowy	<i>Lune de Miel</i> Famille Michaud Apiculteurs France	lipowy
7/2014	gryczany	Spółdzielnia Pszczelarska <i>Apis</i>	gryczany
8/2014	gryczany	<i>Huzar</i> Sp. z o.o.	gryczany
13/2014	leśny	<i>Lune de Miel</i> , importer F. H. Rolnik Sp. Jawna	komonicowy
10/2014	lipowy	<i>Huzar</i> Sp. z o.o.	lipowy
48/2015	lipowy		- (brak pyłku)
49/2015	lipowy		- (brak pyłku)

Nr próbki	Odmiana miodu według deklaracji producenta	Lokalizacja pasieki / Nazwa firmy	Odmiana miodu określona na bazie danych palinologicznych
4/2014	malinowy	Gospodarstwo Pasieczne <i>Bartnik Sokółski</i>	wielokwiatowy
3/2014	mniszkowo-malinowy	Dary Natury	gryczany
5/2014	rzepakowy	Gospodarstwo Pasieczne <i>Sądecki Bartnik</i>	rzepakowy
47/2015	rzepakowy z imbirem		wielokwiatowy
14/2014	spadziowy iglasty	Andrzej Kolcz	wielokwiatowy
16/2014	wielokwiatowy	<i>Huzar Sp. z o.o.</i>	rzepakowy
17/2014	wielokwiatowy	Spółdzielnia Pszczelarska <i>Apis</i>	wielokwiatowy
18/2014	wielokwiatowy	Gospodarstwo Pasieczne <i>Sądecki Bartnik</i>	rzepakowy

Szarym kolorem oznaczono miody, w przypadku których badania palinologiczne potwierdziły klasyfikację odmianową podaną przez producentów. Pogrubioną czcionką wyróżniono odmiany nie ujęte w Polskiej Normie na miód pszczeli PN-88/A-77626:1988.

Źródło: badania własne.

Izolowanie pyłku z próbek miodu wykonano metodą acetolizy Erdtmanna (Erdtman1960). Uzyskany w wyniku maceracji materiał pyłkowy zatopiono w glicerynie. Jego analizę mikroskopową wykonano z zastosowaniem mikroskopu Olympus BX53, według metodyki zawartej w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. Nr 17, poz. 94). Nie ograniczono się jednak do zliczania sugerowanych w tym rozporządzeniu 300 ziaren pyłku, choć liczba ta jest wystarczająca dla potrzeb rutynowych analiz (Dyakowska 1959; Moar 1985; Warakomska 2003); zliczano wszystkie ziarna znajdujące się na preparacie mikroskopowym. W przypadku gdy na preparacie mikroskopowym stwierdzono małą liczbę ziaren pyłku, wówczas analizowano kolejne 2-3 preparaty z tej samej próbki miodu.

Oznaczeń taksonomicznych pyłku dokonano na podstawie klucza Beuga (2004), a podziału wyróżnionych palinotaksonów na nektarodajne i nienektarodajne – w oparciu o informacje zawarte w atlasach roślin miododajnych (Kołtowski 2006, 2015). Bazując na udziale procentowym taksonów nektarodajnych w poszczególnych miodach i kryteriach zawartych w Polskiej normie na miód pszczeli, przeprowadzono klasyfikację odmianową badanych miodów. Oszacowano też frekwencję poszczególnych taksonów w wyróżnionych odmianach miodu, rozumianą jako procent próbek, w których dany takson wystąpił.

3. Wyniki

Aż w 12 badanych miódach (próbki nr 5, 7, 8, 10, 12 i 17 z 2014 roku oraz nr 6, 19, 25, 27, 45 i 46 z 2015 roku), co stanowi około 18% wszystkich analizowanych próbek, zawartość pyłku była bardzo niska lub w ogóle nie odnotowano jego obecności (tab. 2). Przyczyną takiej sytuacji mogła być niedostateczna stabilizacja miodu w pojemnikach, z których były pobierane próbki – zaleca się pobieranie próbek z wierzchniej warstwy, gdzie zbiera się najwięcej pyłku, który wypływa ku powierzchni w miarę upływu czasu (Teper 2007). Mogło to też być skutkiem dokarmiania pszczół cukrem (Dyakowska 1959) albo zafałszowania miodu poprzez dodatek syropu cukrowego (Teper 2010). Bardzo niska zawartość pyłku uniemożliwiła klasyfikację odmianową tych miodów.

W pozostałych 55 próbkach liczba ziaren pyłku wahała się od 209 do 1939. Miody ze skrajnie wysoką zawartością pyłku (1939 ziaren – próbka nr 35 i 1081 ziaren – próbka nr 7) mogły być zafałszowane poprzez doproszenie pyłkiem.

Pyłek oznaczony w badanych miódach reprezentowany był przez 70 taksonów, w tym przez 40 taksonów roślin nektarodajnych i 30 taksonów roślin nienektarodajnych. Prawie we wszystkich miódach liczba ziaren pyłku taksonów nektarodajnych wyraźnie przewyższała liczbę ziaren taksonów nienektarodajnych, co charakteryzuje miody nektarowe (Dyakowska 1959; Warakomska, Jaroszyńska 1992). W jednym miodzie (próbka nr 1/2014) bezwzględnie dominował pyłek nienektarodajnego dębu (*Quercus*), a w jednym (próbka nr 12/2014) – nienektarodajnej sosny (*Pinus*), co podobnie, jak w przypadku niskiej zawartości pyłku, uniemożliwiło klasyfikację odmianową tych miodów. Mogły być one zaproszone przez pyłek z pierzgi.

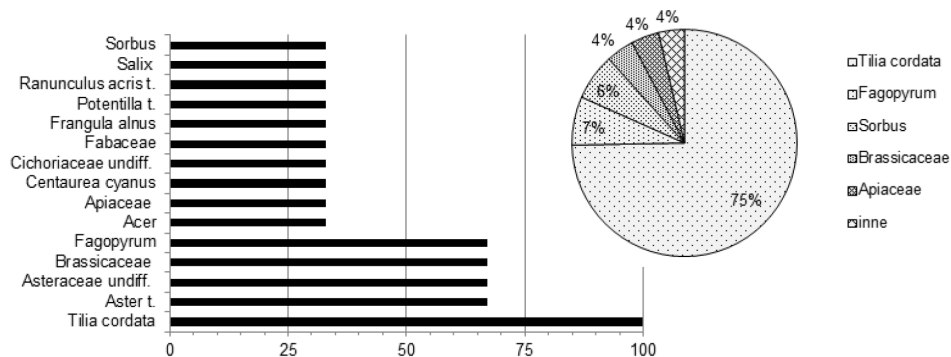
Wśród zbadanych miodów wyróżniono 33 miody odmianowe z pyłkiem przewodnim, w tym: 18 rzepakowych, 7 gryczanych, 3 lipowe, 4 jarzębinowe i 1 komonicowy. Dwie ostatnie odmiany miodu nie są ujęte w Polskiej Normie, jednak możliwość ich wydzielenia na bazie uzyskanych danych melisopalinologicznych nie budzi żadnych wątpliwości: kryterium klasyfikacji odmianowej tych miodów jest dokładnie takie samo jak dla miodów rzepakowych i gryczanych. Pozostałych 20 miodów, w których udział procentowy pyłku żadnego z taksonów nie przekraczał 45% zaklasyfikowano jako wielokwiatowe.

Tylko w 11 przypadkach, czyli w ok. 16% zbadanych miodów, przeprowadzona analiza melisopalinologiczna potwierdziła klasyfikację odmianową sugerowaną przez producentów. Przy tym wśród miodów znajdujących się w obrocie handlowym ok. 33% miało poprawną klasyfikację odmianową, a wśród miodów pochodzących bezpośrednio od pszczelarzy, jedynie ok. 12%. W żadnym z badanych

miodów nie znaleziono ziaren pyłku roślin pozakrajowych, które wskazywałyby na ich zafałszowanie miodami zagranicznymi.

3.1. Miody lipowe

Średni udział pyłku lipy (*Tilia cordata*) wynosi 75%. Obok niego, występuje także pyłek 14 innych taksonów nektarodajnych (ryc. 1), spośród których najwyższą frekwencję (67%) mają *Fagopyrum*, Brassicaceae, *Aster* t. i Asteraceae, przy czym jedynie dwa pierwsze taksony mają też dość wysoki średni udział procentowy (7% i 4%). Znacznie rzadziej, z frekwencją 33%, występują *Acer*, Apiaceae, *Centaurea cyanus*, Cichoriaceae, Fabaceae, *Frangula alnus*, *Potentilla* t., *Ranunculus acris* t., *Salix* i *Sorbus*. Dwa taksony z tej grupy – *Sorbus* i Apiaceae, mimo dość niskiej frekwencji, charakteryzują się stosunkowo wysokim średnim udziałem procentowym (6% i 4%).



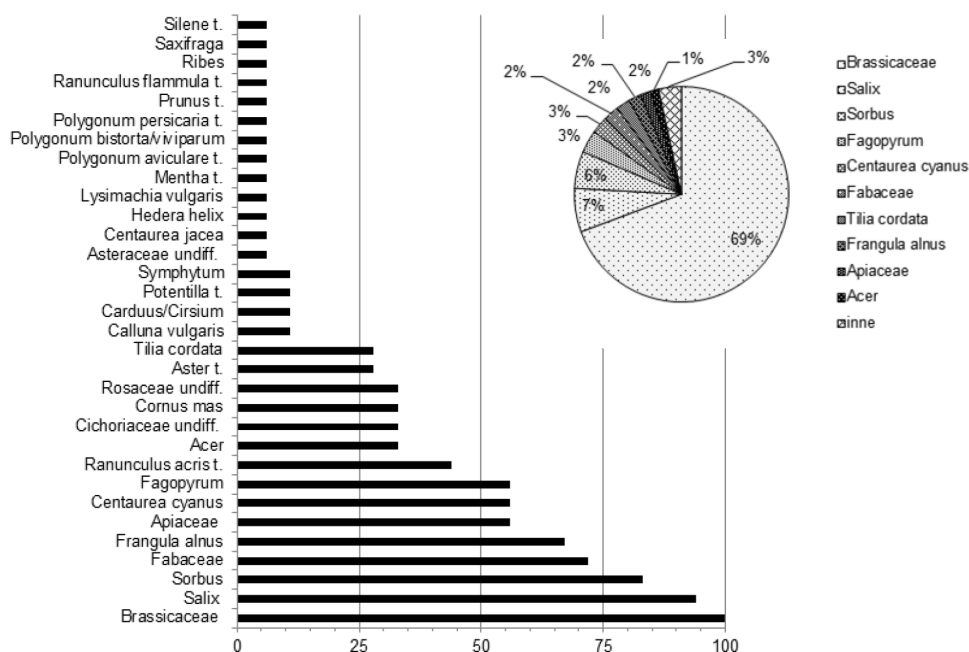
Rycina 1. Frekwencja i średni udział procentowy poszczególnych taksonów pyłkowych w badanych miodach lipowych.

Źródło: badania własne.

3.2. Miody rzepakowe

Średni udział pyłku przewodniego Brassicaceae wynosi 69% (ryc. 2). Poza nim występuje także pyłek 32 innych taksonów nektarodajnych. Najczęściej, z frekwencją ponad 75%, notowany jest pyłek *Salix* i *Sorbus*. Obydwa te taksony mają jednocześnie dość wysoki udział procentowy (7% i 6%). W około połowie miodów (frekwencja 40-70%) występuje pyłek Fabaceae, *Frangula alnus*, Apiaceae, *Centaurea cyanus*, *Fagopyrum* i *Ranunculus acris* t. Wszystkie taksony tej grupy, z wyjątkiem *Ranunculus acris* t., mają też stosunkowo wysoki udział procentowy (2-7%). Bardzo

często (frekwencja 25-35%) występuje pyłek *Acer*, Cichoriaceae, *Cornus mas*, Rosa-ceae undiff., *Aster t.* i *Tilia cordata*, przy czym, poza *Acer*, wszystkie te taksony mają bardzo niski udział procentowy (<1%). Pozostałe taksony nektarodajne mają frekwencję niższą od 10%, a udział procentowy poniżej 1%.



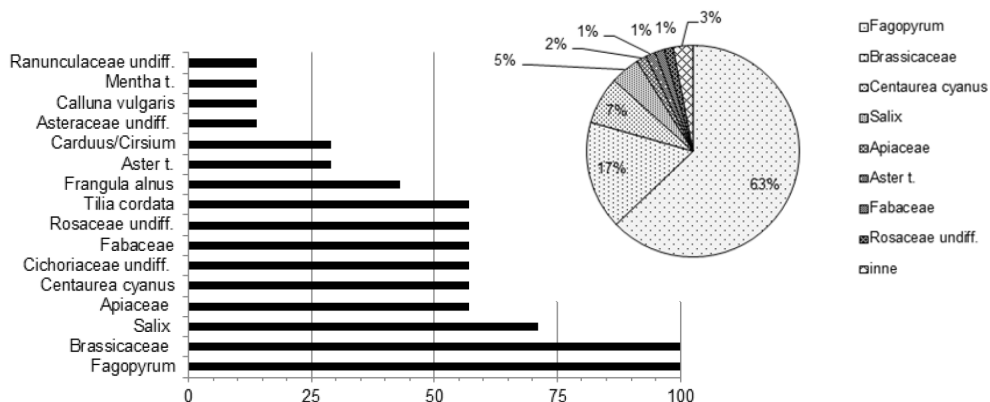
Rycina 2. Frekwencja i średni udział procentowy poszczególnych taksonów pyłkowych w badanych miodach rzepakowych

Źródło: badania własne.

3.3. Miody gryczane

Średni udział pyłku przewodniego *Fagopyrum* wynosi 63% (ryc. 3). Poza nim, we wszystkich zbadanych miodach gryczanych występuje także pyłek Brassicaceae, który ma też bardzo wysoki średni udział procentowy (17%). Bardzo często występuje pyłek *Salix* (frekwencja ok. 70%) oraz Apiaceae, *Centaurea cyanus*, Cichoriaceae, Fabaceae, Rosaceae undiff. i *Tilia cordata* (frekwencja ok. 60%). Większość taksonów tej grupy, poza Cichoriaceae i *Tilia cordata*, ma także dość wysoki średni udział procentowy (1-7%). Z nieco tylko niższą frekwencją (30-40%) notowany jest pyłek *Frangula alnus*, *Aster t.* i *Carduus/Cirsium*, przy czym spośród nich jedynie

Aster t. osiąga średni udział procentowy ok. 1%, a pyłek pozostałych występuje w niewielkich ilościach.

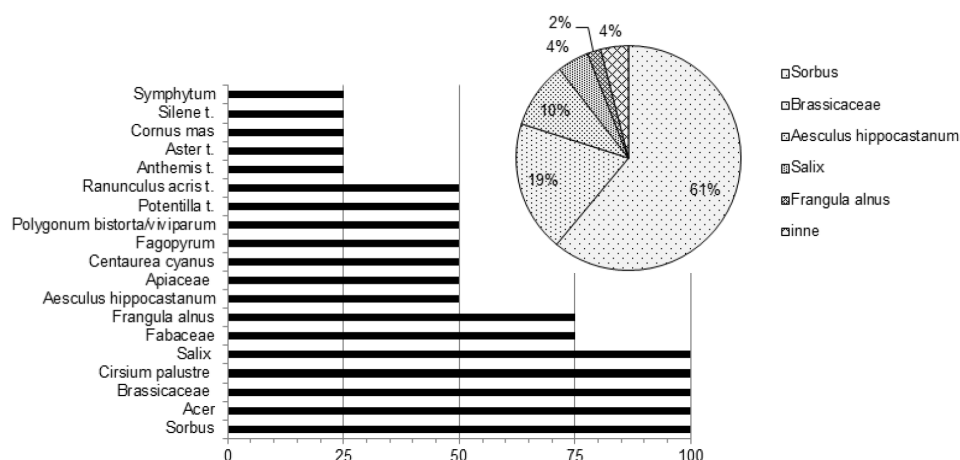


Rycina 3. Frekwencja i średni udział procentowy poszczególnych taksonów pyłkowych w badanych miodach gryczanych

Źródło: badania własne.

3.4. Miody jarzębinowe

Średni udział pyłku przewodniego *Sorbus* wynosi 61% (ryc. 4). Poza nim każdy ze zbadanych miódów zawiera także pyłek 4 innych taksonów roślin nektarodajnych: *Acer*, *Brassicaceae*, *Cirsium palustre* i *Salix*. Jednak tylko w przypadku *Brassicaceae* i *Salix* frekwencja pyłku idzie w parze z jego wysokim udziałem procentowym (19% i 4%). Bardzo często, z frekwencją 75%, notowany jest pyłek *Frangula alnus* i *Fabaceae*, przy czym jedynie *Frangula alnus* osiąga średni udział procentowy ok. 2%. W co drugiej próbce występuje pyłek *Aesculus hippocastanum*, *Apiaceae*, *Centaurea cyanus*, *Fagopyrum*, *Polygonum bistorta/viviparum*, *Potentilla t.* i *Ranunculus acris t.*, a w co czwartej pyłek *Anthemis t.*, *Aster t.*, *Cornus mas t.*, *Silene t.* i *Symphytum*. W tej grupie taksonów na uwagę zasługuje *Aesculus hippocastanum*, który wraz z wysoką frekwencją osiąga też wysoki średni udział procentowy (10%).

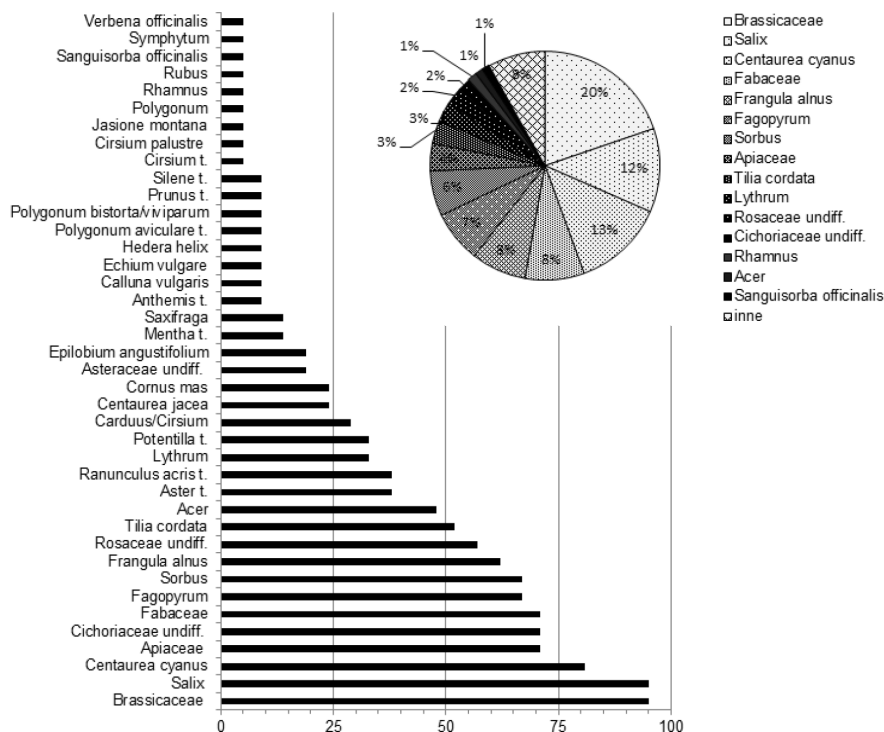


Rycina 4. Frekwencja i średni udział procentowy poszczególnych taksonów pyłkowych w badanych miodach jarzębinowych

Źródło: badania własne.

3.5. Miody wielokwiatowe

Nie ma ani jednego taksonu nektarodajnego, który wystąpiłby we wszystkich miodach wielokwiatowych. Najwyższą frekwencję (80-90%) mają Brassicaceae, *Salix* i *Centaurea cyanus*, które osiągają też najwyższe średnie udziały procentowe pyłku (20%, 12% i 13%). W większości miodów (frekwencja 50-75%) obecny jest pyłek Apiaceae, Cichoriaceae, Fabaceae, *Fagopyrum*, *Sorbus*, *Frangula alnus*, Rosaceae undiff. i *Tilia cordata*, który charakteryzuje się też dość wysokim udziałem procentowym (2-8%). Bardzo częsty (frekwencja 25-50%) jest ponadto pyłek *Acer*, *Aster* t., *Ranunculus acris* t., *Lythrum*, *Potentilla* t. i *Carduus/Cirsium*, ale w tej grupie jedynie *Acer* osiąga średni udział procentowy rzędu 1%. Frekwencję powyżej 10% mają ponadto wyłącznie: *Centaurea jacea* t., *Cornus mas*, Asteraceae undiff., *Epilobium angustifolium*, *Mentha* t. i *Saxifraga*, ale średni udział procentowy żadnego z tych taksonów nie przekracza 1%. Za to, mimo niskiej frekwencji, w stosunkowo dużych ilościach (średni udział procentowy 1%) występuje pyłek *Sanguisorba officinalis*, *Acer* i *Rhamnus*.



Rycina 5. Frekwencja i średni udział procentowy poszczególnych taksonów pyłkowych w badanych miodach wielokwiatowych

Źródło: badania własne.

4. Dyskusja

Północno-wschodnia Polska należy do rejonów o najniższej produkcji miodów w skali kraju (Semkiw 2014). Jak wynika z badań Wróblewskiej i in. (2006), przeprowadzonych w latach 1971-2004, różnorodność odmianowa miodów nektarowych produkowanych w tym regionie sięga 10 odmian. Badane miody w większości pochodziły z tego właśnie rejonu Polski. Analizy potwierdziły produkcję tylko czterech odmian: rzepakowego, gryczanego, lipowego i jarzębinowego. Należy jednak pamiętać o pilotażowym charakterze niniejszych badań i stosunkowo niewielkiej liczbie zbadanych miodów.

Odmiany miodów, określone na podstawie analizy pyłkowej, w większości próbek nie pokrywały się z klasyfikacją odmianową deklarowaną przez producen-

tów (tab. 1). Nietrafne okazało się zwłaszcza typowanie przez producentów lipy i akacji jako głównej rośliny pożytkowej; produkcja miodów akacjowych i lipowych w Polsce i w Europie Środkowej, według Dyakowskiej (1959), należy do rzadkości, co potwierdziły niniejsze badania.

Dla 4 miodów z dominującym udziałem pyłku jarzębu (*Sorbus*) przewyższającym 45%, przyjęto takie same kryterium typowania pyłku przewodniego, jak dla miodu gryczanego i rzepakowego, dla których wymagana minimalna zawartość pyłku przewodniego, określona w Polskiej Normie na miód pszczeli, wynosi 45%. Miody z pyłkiem przewodnim *Sorbus* nazwano miodami jarzębinowymi, ponieważ pyłek oznaczony jako *Sorbus* był prawdopodobnie pyłkiem popularnego w Polsce jarzębu pospolitego (*Sorbus aucuparia*), pospolicie nazywanego jarzębiną. Gatunek ten występuje powszechnie na terenie całego kraju, zwłaszcza w nizinnej jego części. Gatunkiem z rodzaju *Sorbus* spotykanym nad Bałtykiem jest jarząb szwedzki (*S. intermedia*). W atlasach roślin miododajnych jarząb wymieniany jest jako roślina pożytkowa, z łatwo dostępnymi miodnikami, choć o niskiej wydajności nektarowej, i zaliczany jest do wczesnowiosennych roślin pożytkowych (Kołtowski 2006). Poza miodami jarzębinowymi, pyłek *Sorbus* obecny był w niewielkich ilościach we wszystkich miodach odmianowych i wielokwiatowych. Nie występował tylko w grupie miodów gryczanych; okres kwitnienia gryki przypada na pełnię lata, trudno więc oczekiwać występowania w miodach gryczanych pyłku roślin wczesnowiosennych.

W zbadanych miodach wielokwiatowych, najwyższą frekwencję miał pyłek Brassicaceae, *Salix*, *Centaurea cyanus* oraz Apiaceae, Cichoriaceae, Fabaceae, *Fagopyrum*, *Sorbus*, *Frangula alnus*, Rosaceae undiff. i *Tilia cordata*. Generalnie jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami polskich miodów wielokwiatowych z północno-wschodniej Polski, w których najwyższy udział miał pyłek *Anthriscus* t., Brassicaceae, *Centaurea cyanus*, *Frangula*, *Lotus*, *Malus* t., Poaceae, *Prunus* t., *Phacelia*, *Rubus* t., *Rumex*, *Salix*, *Taraxacum* t. i *Trifolium pratense* (Wróblewska i in. 2006). Z badań na Lubelszczyźnie (1990-2008) wynika, że tam najwyższą frekwencją w miodach wielokwiatowych odznaczył się pyłek *Acer*, *Aesculus*, Brassicaceae, *Lythrum salicaria*, *Malus* t., *Prunus* t., *Ribes* i *Salix* (Wróblewska, Warakomska 2009). Natomiast na Wyżynie Sandomierskiej (2003-2005) w miodach wielokwiatowych przeważają ziarna pyłku *Aesculus*, *Anthriscus*, Brassicaceae, *Phacelia*, Poaceae, *Prunus* t., *Salix*, *Taraxacum* i *Trifolium repens* (Stawiarz, Wróblewska 2010).

6. Podsumowanie i wnioski

1. Do analizy palinologicznej wytypowano 67 miodów znajdujących się w obrocie handlowym lub uzyskanych bezpośrednio od producentów. Celem badań była weryfikacja podanej przez producenta klasyfikacji odmianowej tych miodów.
2. Wśród zbadanych miodów, 33 sklasyfikowano jako odmianowe, w tym: 18 rzepakowych, 7 gryczanych, 3 lipowe, 4 jarzębinowe i 1 komonicowy; dwie ostatnie odmiany miodu nie są ujęte w Polskiej Normie na miód pszczeli PN-88/A-77626:1988.
3. W przypadku aż 55 miodów (84% zbadanych) okazało się, że ich klasyfikacja podana przez producenta jest niezgodna z rzeczywistą klasyfikacją opartą na analizie składu palinologicznego miodów. Tylko w jednym przypadku – gdy miód wielokwiatowy (najtańszy z miodów nektarowych) określony został przez producenta jako gryczany (najdroższy), można podejrzewać złe intencje producenta.
4. W żadnym z analizowanych miodów nie znaleziono ziaren pyłku roślin egzotycznych, zatem należy odrzucić podejrzenia o ich fałszowanie poprzez dodawanie tańszego miodu pochodzącego z Chin lub Ameryki Południowej.

Podziękowania

Dziękujemy wszystkim zaangażowanym w pozyskiwanie próbek do badań, a szczególnie tym, którzy nieodpłatnie przekazali próbki miodów ze swoich lub zaprzyjaźnionych pasiek: E.A. Brzosko, M. Czernik, B. Jatkowskiej (Gospodarstwo Pasieczne „Pasięka Miś”), E. Jermakowicz, A. Kostro-Ambroziak, M. Lewoc, E. i A. Semeniuk (Gospodarstwo Pasieczne „Pasięka Wasilków”), A. i M. Szal, M. Świsłockiej, I. Tałałaj, M. i P. Venhoof (Gospodarstwo Pasieczne „Pasięka u Strusi”), W. Zajkowskiemu (Gospodarstwo Pasieczne „Bartnik Sokółski”), A. Zalewskiemu i R. Kaningowi (Gospodarstwo Pasieczne w Tykocinie).

Literatura

- Beug H.-J., 2004. Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Dyakowska J., 1959. Podręcznik palinologii. Metody i problemy. Wydawnictwo Geologiczne, Warszawa.
- Demianowicz Z., Demianowicz A., 1955. Nowe podstawy analizy pyłkowej miodów. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 1(2): 69-78.

- Demianowicz Z., 1961. Pollenkoeffizienten als Grundlage der quantitative Pollenanalyse des Honigs. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 5(2): 95-105.
- Demianowicz Z., Lecewicz W., Warakomska Z., 1981. Miody rzepakowe Żuław Wisły i Krainy Mazowieckiej. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 25: 155-163.
- Erdtman G., 1960. The acetolysis method a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54: 561-564.
- Kołtowski Z., 2006. Wielki atlas roślin miododajnych. Przedsiębiorstwo Wydawnicze Rzeczpospolita SA, Warszawa.
- Kołtowski Z., 2015. Przewodnik po roślinach miododajnych. Agencja Fotograficzno-Wydawnicza Mazury, Olsztyn.
- Majewska E., 2009. Porównanie wybranych właściwości miodów pszczelich jasnych i ciemnych. *Nauka, Przyroda, Technologie*, 3(4): 1-8.
- Moar N.T., 1985. Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 28: 39-70.
- Nalewajk T. 2013. Odpowiedź na interpelację podsekretarza stanu w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr 12735 z dnia 11 stycznia 2013 r. w sprawie uchylenia paragrafu 3, p. 1, lit. a, w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu. <http://www.sejm.gov.pl/Sejm7.nsf/InterpelacjaTresc.xsp?key=5B7B2910> [dostęp: 10.01.2015].
- Polska Norma na miód pszczeli PN-88/A-77626:1988.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu (Dz. U. Nr 181, poz. 1773, z późniejszymi zmianami).
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. Nr 17, poz. 94, z późniejszymi zmianami z dn. 30 lipca 2015 r.).
- Rozporządzenie Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych (Rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku). http://arr.gov.pl/data/00104/rr_1234_07.pdf [dostęp: 10.01.2015].
- Semkiw P., 2014. Sektor pszczelarski w Polsce w 2014 roku. Instytut Ogrodnictwa, Zakład Pszczelnictwa w Puławach, Puławy.
- Stawiarz E., Wróblewska A., 2010. Melissopalynological analysis of multifloral honeys from the Sandomierska upland area of Poland. Department of Botany, University of Life Sciences in Lublin, 54(1): 65-75.
- Szafer W., 1969. Kwiaty i zwierzęta. Zarys ekologii kwiatów. PWN, Warszawa.
- Targoński Z., Stój A., 2005. Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 4(45): 30-40.

- Teper D., 2007. Analiza miodów. Laboratorium Badania Jakości Produktów Pszczelich, Oddział Pszczelnictwa ISK w Puławach, www.opisik.pulawy.pl/teper/palinologia.htm [dostęp: 10.01.2015].
- Teper D., 2010. Ilościowa analiza pyłkowa jako metoda umożliwiająca wykrywania zafałszowań miodów. Oferta wdrożeniowa w ramach projektu badawczo-rozwojowego R12 051 „Doskonalenie i harmonizacja metod badania składu i wykrywania zafałszowań miodu”. www.inhort.pl/upload/filemanager/images/.../10/4_wdroz_2010 [dostęp: 10.01.2015].
- Warakomska Z., 1962. Badania nad zbiorem pyłku przez pszczołę miodną (*Apis mellifica* L.) w rolniczych okolicach Polski. *Annales UMCS, Sectio E*, 17(5): 67-106.
- Warakomska Z., 1985. Obraz pyłkowy miodów i pierzgi Kotliny Jeleniogórskiej. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 29: 253-263.
- Warakomska Z., 1996. Pollen contents of some honeys originating from Wielkopolska region. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 40(2): 89-98.
- Warakomska Z., Jaroszyńska T. 1992. Obraz pyłkowy miodów spadziowych Roztocza. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 36: 149-156.
- Warakomska Z., 2003. *Melisopalinologia*. [W:] Dybowa-Jachowicz S., Sadowska A. (red.), *Palinologia*. Wydawnictwa Instytutu Botaniki PAN, Kraków: 69-71.
- Wilczyńska A., 2012. Oznaczanie zawartości flawonoidów i fenolokwasów w odmianowych miodach pszczelich. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 45(3): 892-896.
- Wróblewska A., 1995. Pochodzenie botaniczne miodów okolic Białej Podlaskiej. *Nauka w praktyce ogrodniczej*, Lublin.
- Wróblewska A., Warakomska Z., 2009. Pollen analysis of honeys from Poland's Lubelszczyzna Regions. *Department of Botany, University of Life Sciences in Lublin*, 53(2): 57-67.
- Wróblewska A., Warakomska Z., Koter M., 2006. Pollen analysis of bee products from the north-eastern Poland. *Journal of Apicultural Science*, 50(1): 71-83.

Opinie uczniów szkół ponadgimnazjalnych z województwa podlaskiego na temat różnorodności biologicznej

Alina Stankiewicz*

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Pracownia Dydaktyki Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

* e-mail: salina@uwb.edu.pl

Streszczenie: Wiedza na temat różnorodności biologicznej pomaga współczesnemu człowiekowi w zrozumieniu otaczającego świata oraz w podejmowaniu decyzji respektujących prawa przyrody. Edukacja dotycząca różnorodności biologicznej wywodzi się bezpośrednio z edukacji przyrodniczej, która ma w Polsce długą, sięgającą XIX wieku tradycję. Edukacja dla różnorodności biologicznej w nowoczesnym ujęciu – łącząca aspekt przyrodniczy ze społecznym i ekonomicznym narodziła się wraz z edukacją dla zrównoważonego rozwoju podczas konferencji ONZ „Środowisko i rozwój” w 1992 r. w Brazylii – w Rio de Janeiro. Polska podpisała Konwencję o różnorodności biologicznej w 1992 roku, a następnie ratyfikowała ją w 1996 roku (2002). Zagadnienia różnorodności biologicznej od 1999 roku występują w podstawach programowych i podręcznikach biologii na poziomie gimnazjum i szkoły ponadgimnazjalnej. Obecność treści związanych z szeroko pojętymi zagadnieniami ochrony różnorodności biologicznej w programach kształcenia jest jednym z zobowiązań wynikających z art. 13 Konwencji (2002).

W pracy zostaną przedstawione wyniki badań, których celem było poznanie opinii uczniów szkół ponadgimnazjalnych na temat znaczenia różnorodności biologicznej i jej zagrożeń. Badania były przeprowadzone w roku szkolnym 2015/2016 na próbie 480 uczniów szkół ponadgimnazjalnych z Białegostoku oraz Hajnówki, Suwałk i Grajewu. Opinie uczniów na temat różnorodności biologicznej były badane za pomocą kwestionariusza ankiety składającego się z 23 wskaźników (stwierdzeń) dobranych zgodnie z założeniami skali Likerta.

Słowa kluczowe: opinie i postawy uczniów, szkoły ponadgimnazjalne, różnorodność biologiczna, kwestionariusz ankiety, wskaźniki akceptacji

1. Wstęp

Spadek różnorodności biologicznej jest faktem. Zróżnicowanie gatunkowe obniżyło się poniżej bezpiecznego poziomu na obszarze obejmującym w sumie aż 58,1% lądów; na tej powierzchni zamieszkuje 71,94% ludzi żyjących na całym świecie (Ulanowski 2016). Badacze uważają, że taka sytuacja zagraża cywilizacji człowieka. W niebezpieczeństwie znajdują się bowiem produkcja żywności, rozkład nieczystości i śmieci oraz obieg węgla w przyrodzie.

Wiedza na temat różnorodności biologicznej i jej zagrożeń pomaga współczesnemu człowiekowi w zrozumieniu otaczającego świata oraz w podejmowaniu decyzji respektujących prawa przyrody. W kształtowaniu należytego stosunku człowieka do różnorodności biologicznej mają swój udział nauki społeczne, takie jak: pedagogika, dydaktyka biologii i ochrony środowiska, psychologia, socjologia i nauki prawne. Dorobek tych dziedzin stanowi właściwe oparcie dla edukacji społeczeństwa i jednostek, edukacji zorientowanej na relacje człowieka z przyrodą, na rozpowszechnienie przekonania o konieczności poszanowania wszelkich form życia – przez zrozumienie różnorodności biologicznej, jej piękna i niezbędności dla rozwoju fizycznego, emocjonalnego i intelektualnego człowieka (Potyrała 2011).

2. Założenia metodologiczne badań

W tradycyjnym rozumieniu, postawa jest formą ustosunkowania do dowolnego aspektu rzeczywistości (Kozłowski 2004). Celem podjętych badań było ustalenie, jakie są postawy uczniów szkół ponadgimnazjalnych województwa podlaskiego wobec różnorodności biologicznej. Do celów szczegółowych należało określić:

- jakie są różnice w postawach uczniów szkół ponadgimnazjalnych wobec różnorodności biologicznej?
- na czym polegają różnice w postawach wobec różnorodności biologicznej między uczniami mieszkającymi w miastach i na wsi?

Badania przeprowadzono w roku szkolnym 2015/2016. Metodą zastosowaną w badaniach był sondaż diagnostyczny, a narzędziem kwestionariusz ankiety. Na strukturę kwestionariusza ankiety (zał. nr 1) składało się: wyjaśnienie tematu i celu badań, metryczka, informacje o instytucji prowadzącej badania, instrukcja wypełnienia kwestionariusza, 23 stwierdzenia dobrane zgodnie z założeniami skali Likerta (Brzeziński 1984).

Załącznik nr 1. Kwestionariusz ankiety

Ankieta, służy badaniu postaw uczniów wobec różnorodności biologicznej. Badania są prowadzone przez Instytut Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Udzielone w ankietach odpowiedzi będą wykorzystane tylko w celach naukowych. Ankieta jest anonimowa.

Informacje ogólne

Proszę w miejsce kropek wpisać odpowiednią informację lub podkreślić właściwą informację:

Płeć: Kobieta Mężczyzna Wiek:

Szkoła..... klasa

Profil klasy

Miejsce stałego zameldowania:

wieś/miasto do 15 tys. mieszkańców

miasto od 16 do 50 tys. mieszkańców

miasto od 50 tys. do 100 tys. mieszkańców

miasto powyżej 100 tys. mieszkańców

Przy każdym stwierdzeniu dokonaj wyboru jednej z pięciu kategorii odpowiedzi: *zdecydowanie się zgadzam, zgadzam się, nie mam zdania, raczej się nie zgadzam, zdecydowanie nie zgadzam się*. Proszę uważnie przeczytać stwierdzenia, a następnie zaznaczyć „X” przy odpowiedzi, która najlepiej odzwierciedla Twoją opinię na dane stwierdzenie. W przypadku pomyłki albo zmiany decyzji, wcześniej zaznaczony „X” należy otoczyć kółkiem, a przy wybranej odpowiedzi postawić „X”. Prosimy o szczerość.

Stwierdzenie	Zdecydowanie zgadzam się	Zgadzam się	Nie mam zdania	Raczej się nie zgadzam	Zdecydowanie nie zgadzam się
1. Różnorodność biologiczna to zróżnicowanie żywej przyrody na wszystkich poziomach jej organizacji (materiału genetycznego, populacji i gatunków oraz ekosystemów).					
2. Różnorodne rośliny i zwierzęta w miejscu mojego zamieszkania sprawiają mi przyjemność.					
3. Najczęściej odpoczywam na łonie przyrody.					
4. Jedną z przyczyn utraty różnorodności biologicznej jest rozwój urbanizacji.					
5. Istnieje związek między ochroną różnorodności biologicznej a likwidacją biedy na Ziemi.					

6. Gatunki niebezpieczne dla człowieka powinny być niszczone.					
7. Powódzie, wichury są konsekwencją utraty różnorodności biologicznej.					
8. Człowiek dla zaspokojenia swoich potrzeb bez ograniczeń może korzystać z różnorodnych roślin, zwierząt.					
9. Regulacja rzek i cieków wodnych przyczynia się do zmniejszenia różnorodności biologicznej.					
10. Każdy człowiek powinien znać pospolite gatunki roślin, zwierząt, grzybów oraz ich znaczenie w przyrodzie.					
11. Nie biorę udziału w działaniach na rzecz zachowania różnorodności biologicznej w moim miejscu zamieszkania.					
12. W województwie podlaskim nie ma obszarów objętych siecią Natura 2000.					
13. Degradacja gleb i wód jest konsekwencją utraty różnorodności biologicznej.					
14. Nie wszystkie gatunki roślin i zwierząt są potrzebne na Ziemi.					
15. Natura 2000 służy ochronie najcenniejszych, najrzadszych i najbardziej zagrożonych w Europie elementów przyrody.					
16. Natura 2000 nie ma znaczenia w utrzymaniu dobrego stanu środowiska przyrodniczego i rozwoju turystyki.					
17. Gatunki obce zasadzane w parkach i ogrodach są zagrożeniem dla gatunków powszechnie występujących w Polsce.					
18. Nie interesuje mnie różnorodność roślin, zwierząt i ekosystemów.					
19. Im większa różnorodność organizmów, tym stabilniejsze środowisko.					
20. Wprowadzanie nowych wysokopłennych odmian roślin uprawnych i ras zwierząt gospodarskich, w tym także zmodyfikowanych genetycznie (GMO) nie jest zagrożeniem dla różnorodności biologicznej.					
21. Osiągnięcia techniki i technologii są ważniejsze dla człowieka niż rośliny i zwierzęta.					
22. Zachowanie różnorodności biologicznej jest warunkiem zabezpieczenia ludzi w żywność i zaspokojenia ich potrzeb zdrowotnych.					
23. W każdej sytuacji dbam o rośliny i zwierzęta.					

Dziękujemy za udzielenie odpowiedzi! 😊

Skala Likerta jest pięciostopniową skalą, dzięki której uzyskać można odpowiedzi dotyczące stopnia akceptacji zjawiska, poglądu, oceny itp. Zastosowano następujące warianty opisane na skali: zdecydowanie nie zgadzam się (1 pkt.), raczej

się nie zgadzam (2 pkt.), nie mam zdania (3 pkt.), zgadzam się (4 pkt.), zdecydowanie zgadzam się (5 pkt.). Odpowiedzi uczniów na stwierdzenia były punktowane w ten sposób, że maksymalna liczba punktów przypisana była tej kategorii odpowiedzi, która wyrażała pozytywną postawę, a minimalną liczba punktów przypisano tej kategorii odpowiedzi, która wyrażała negatywną postawę. Przyjęto, że dla stwierdzeń nr: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23 odpowiedź „zdecydowanie zgadzam się” odpowiada postawie pozytywnej. Zaś dla stwierdzeń nr: 6, 8, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 21 odpowiedź „zdecydowanie nie zgadzam się” również oznaczała postawę pozytywną wobec różnorodności biologicznej. Przy zastosowaniu punktowania aprobaty każdego z 23 stwierdzeń w zakresie od 1 do 5, każdy uczeń mógł uzyskać od 23 do 115 punktów.

3. Wyniki badań

Badaniami objęto 480 uczniów (tab. 1), w wieku 16-19 lat.

Tabela 1. Uczniowie uczestniczący w badaniach

Lp.	Nazwa szkoły	Profil klasy	Liczba uczniów
1.	IV Liceum Ogólnokształcące im. C.K. Norwida w Białymstoku	biologiczno-chemiczny	57
		humanistyczny	30
2.	II Liceum Ogólnokształcące im. Anny z Sapiehów Jabłonowskiej w Białymstoku	medyczny	24
		międzynarodowy	47
3.	XIV Liceum Ogólnokształcące w Białymstoku	bezpieczeństwo narodowe	21
		straż graniczna	61
4.	II Liceum Ogólnokształcące z BJN w Hajnówce	biologiczno-chemiczny	65
		matematyczno-fizyczny	17
5.	I Liceum Ogólnokształcące im. M. Konopnickiej w Suwałkach	biologiczno-chemiczna	75
6.	I Liceum Ogólnokształcące im. M. Kopernika w Grajewie	biologiczno-chemiczna	45
		matematyczno-fizyczny	23
7.	Technikum w Wojewodzinie	gastronomiczny	15
Łącznie			480

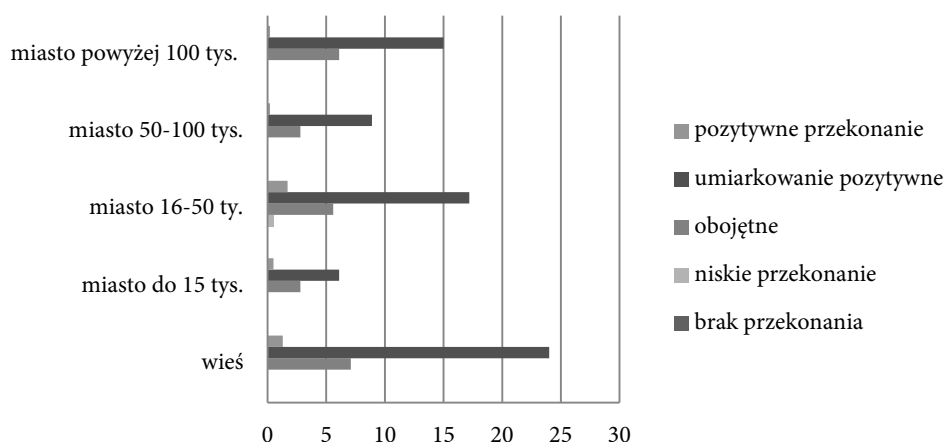
Ankiety uzupełnili uczniowie uczący się biologii w zakresie podstawowym i rozszerzonym. Najliczniejszą wśród badanych grupę stanowili uczniowie mieszkający na wsi (32%), respondenci zamieszkujący w miastach od 16 do 50 tys. oby-

wateli stanowili 25% badanych, 21,5% badanych reprezentowało populację mieszkańców miast powyżej 100 tys. osób –, 12% – mieszkańców miast od 50 do 100 tys. mieszkańców, a 9,5% – społeczność do 15 tys. mieszkańców.

Do analizy przyjęto następujący klucz interpretacyjny ogólnego wyniku ucznia:

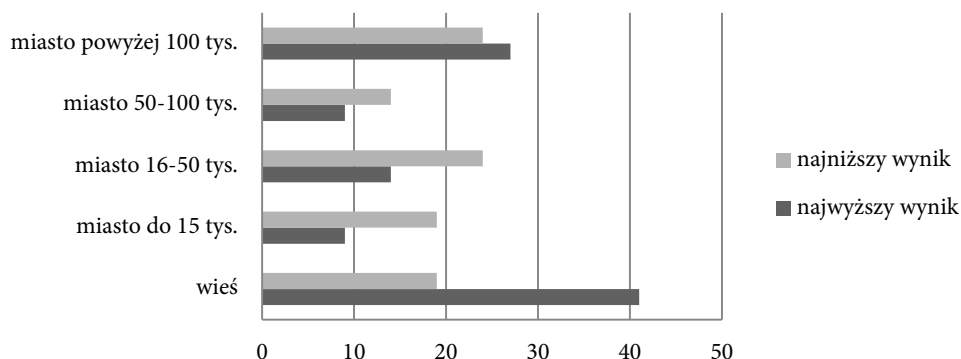
- 23-42 pkt. – zdecydowanie brak przekonania o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej,
- 43-60 pkt. – niskie przekonanie o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej,
- 61-78 pkt. – obojętna postawa wobec różnorodności biologicznej,
- 79-96 pkt. – umiarkowanie pozytywne przekonanie o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej,
- 97-115 pkt. – pozytywne przekonanie o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej.

Najwyższy wynik punktowy uzyskany w badaniach przez ucznia wynosił 110 pkt. i odpowiadał pozytywnej postawie wobec różnorodności biologicznej. Najniższy uzyskany wynik wynosił 56 pkt. i oznaczał niską postawę wobec różnorodności biologicznej. Średni wynik – 85 pkt., odpowiadał umiarkowanie pozytywnej postawie wobec różnorodności biologicznej. W badanej grupie nie było osób, których uzyskany wynik punktowy świadczyłby o braku przekonania o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej. Najwięcej uczniów z umiarkowanie pozytywnym przekonaniem o potrzebie ochrony różnorodności biologicznej mieszkało na wsi (ryc. 1), najmniej osób o takiej postawie zamieszkiwało w miastach do 15 tys. mieszkańców.



Rycina 1. Postawy uczniów uczestniczących w badaniach ze względu na miejsce zamieszkania [%]

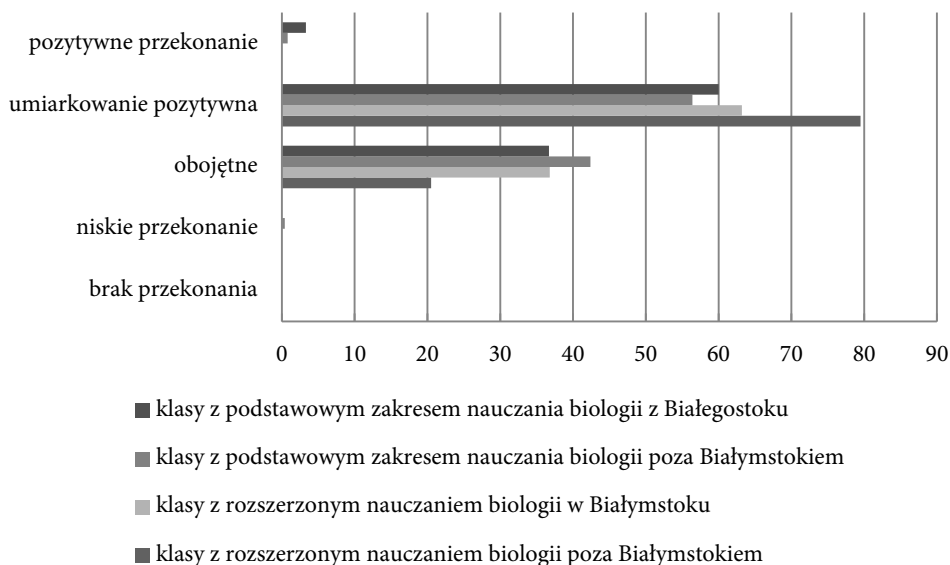
Najwyższe wyniki spośród badanych, uzyskali uczniowie mieszkający na wsi i w miastach powyżej 100 tys. mieszkańców. Najmniej osób o najwyższych wynikach punktowych mieszkało w miastach do 15 tys. mieszkańców (ryc. 2).



Rycina 2. Miejsce zamieszkania a najniższe i najwyższe wyniki badanych uczniów [%]

Rozstęp wyników to różnica punktów między najwyższym i najniższym wynikiem. Największy rozstęp (49 pkt.) odnotowano w klasach z rozszerzonym nauczaniem biologii w Liceum z BJN w Hajnówce. Najmniejszy (26 pkt.) rozstęp wyników był w klasie o profilu międzynarodowym w II Liceum Ogólnokształcącym w Białymstoku. Duży rozstęp wyników świadczy o znaczących różnicach między uczniami w wiedzy, umiejętnościach oraz opiniach na temat różnorodności biologicznej. W liceach w Białymstoku rozstęp wyników był mniejszy, co świadczy o mniejszych różnicach między uczniami w ich wiedzy i umiejętnościach.

Posługując się przyjętym kluczem do interpretacji wyników, można stwierdzić, iż uczniowie uczący się biologii w zakresie rozszerzonym, mają bardziej pozytywne postawy (wyniki punktowe w zakresie postaw umiarkowanie pozytywne) wobec różnorodności biologicznej niż uczniowie uczący się biologii w zakresie podstawowym. Porównanie postaw wobec różnorodności biologicznej uczniów uczących się biologii w zakresie rozszerzonym wskazuje, że nieco wyższe pozytywne postawy charakteryzują uczniów z Suwałk, Hajnówki i Grajewa, w porównaniu z uczniami z Białegostoku (ryc. 3).



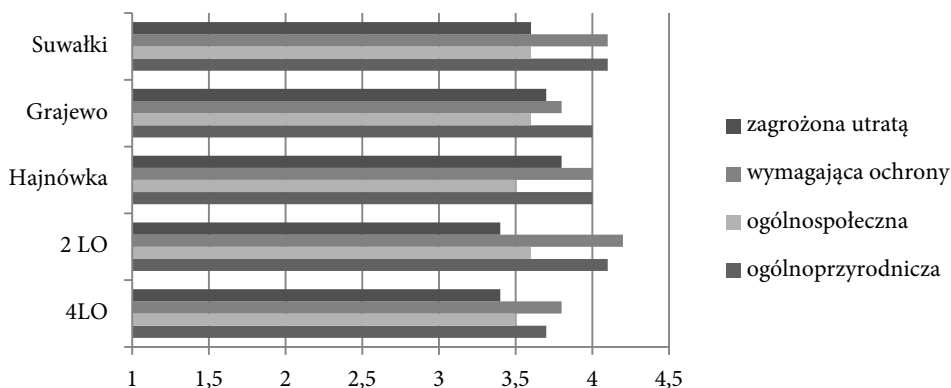
Rycina 3. Postawy wobec różnorodności biologicznej uczniów z klas z podstawowym i z rozszerzonym zakresem nauczania biologii

3.1. Postawa uczniów wobec różnorodności biologicznej jako wartości ogólnoprzyrodniczej, ogólnospołecznej, wartości zagrożonej utratą i wymagającej ochrony

Każda postawa jest postawą wobec czegoś, wobec określonego problemu, zjawiska. Dla potrzeb badań przyjęto, że postawy uczniów wobec różnorodności biologicznej w opracowanej skali odnoszą się do różnorodności biologicznej jako wartości: ogólnoprzyrodniczej (stwierdzenia nr: 1, 10, 14, 18, 19); ogólnospołecznej (stwierdzenia nr: 2, 3, 5, 6, 8, 11, 21, 22); wartości wymagającej ochrony (stwierdzenia nr: 12, 15, 16, 23); wartości zagrożonej utratą (stwierdzenia nr: 4, 7, 9, 13, 17, 20).

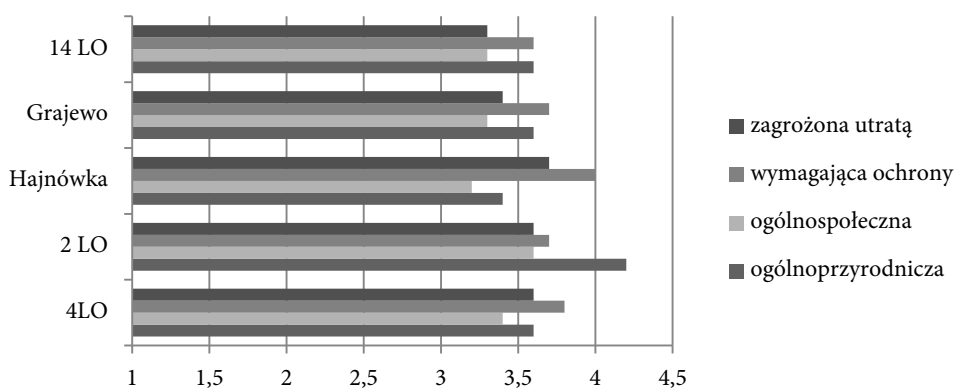
Określono postawę uczniów uczących się biologii w zakresie podstawowym i rozszerzonym względem grup stwierdzeń dotyczących różnorodności biologicznej jako wartości ogólnoprzyrodniczej, ogólnospołecznej, wymagającej ochrony, zagrożonej utratą (rys. 4). Postawy uczniów określano obliczając wskaźniki akceptacji dla każdego stwierdzenia. Wskaźnik jest średnią liczbą punktów uzyskanych przez dane stwierdzenie i przyjmuje wartość od 1 do 5. Najwyższą akceptację uczniów uczących się biologii w zakresie rozszerzonym uzyskały stwierdzenia odnoszące się do różnorodności biologicznej jako wartości ogólnoprzyrodniczej (np. do stwierdzenia nr 14 – *Wszystkie gatunki roślin i zwierząt są potrzebne na Ziemi*, stwierdze-

nia nr 19 – *Im większa różnorodność organizmów, tym stabilniejsze środowisko*) i wymagającej ochrony (np. stwierdzenie nr 15 – *Natura 2000 służy ochronie najcenniejszych, najrzadszych i najbardziej zagrożonych w Europie elementów przyrody*, stwierdzenie nr 23 – *W każdej sytuacji dbam o rośliny i zwierzęta*) (ryc. 4).



Rycina 4. Postawy uczniów uczących się biologii w zakresie rozszerzonym wobec różnorodności biologicznej jako wartości

Najniższą akceptację uczniowie uczący się biologii w zakresie podstawowym, jak i rozszerzonym przejawiali względem stwierdzeń dotyczących różnorodności biologicznej jako wartości ogólnospołecznej (ryc. 5).



Rycina 5. Postawy uczniów uczących się biologii w zakresie podstawowym wobec różnorodności biologicznej jako wartości

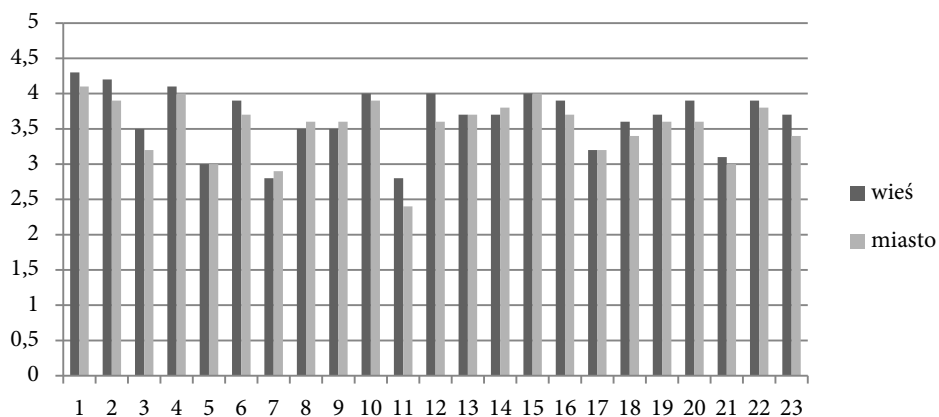
Świadczy to o niezrozumieniu przez uczniów konieczności ograniczenia się w korzystaniu z różnorodności biologicznej w zaspokajaniu potrzeb człowieka (stwierdzenie nr 8), a także braku zrozumienia przez uczniów zależności, że zachowanie różnorodności biologicznej jest warunkiem zabezpieczenia ludzi w żywność i zaspokojenia ich potrzeb zdrowotnych (stwierdzenie nr 22).

Uczniowie uczący się biologii w zakresie podstawowym, nieco wyżej zaakceptowali stwierdzenia odnoszące się do różnorodności biologicznej jako wartości wymagającej ochrony, niż jako wartości ogólnoprzyrodniczej. Wyjątek stanowią uczniowie z II LO w Białymstoku, którzy wyższą akceptację odnieśli do stwierdzeń odnoszących się do różnorodności biologicznej jako wartości ogólnoprzyrodniczej, niż wymagającej ochrony.

Wyniki (ryc. 4 i ryc. 5) wskazują również na różnice pomiędzy badanymi liceami. Najwyższą akceptację dla różnorodności biologicznej jako wartości ogólnoprzyrodniczej i wymagającej ochrony wykazali uczniowie z II LO w Białymstoku i z LO w Suwałkach. Najwyższą akceptację stwierdzeń odnoszących się do różnorodności biologicznej jako wartości zagrożonej utratą, wykazali uczniowie z LO w Hajnówce.

3.2. Postawa uczniów wobec różnorodności biologicznej uczniów mieszkających na wsi i w miastach

W badaniach zastanawiano się, na czym polegają różnice w postawach wobec różnorodności biologicznej między uczniami mieszkającymi w miastach i na wsi.



Rycina 6. Opinie mieszkańców miast i wsi na temat różnorodności biologicznej wyrażone wartością wskaźnika akceptacji

Mieszkańcy wsi wyrazili większą akceptację do 15 stwierdzeń w porównaniu z mieszkańcami miast. W przypadku 4 stwierdzeń (nr: 5, 13, 15, 17) opinie badanych były zgodne (rys. 6). Istotnie statystycznie różnice na poziomie $\alpha=0,05$ wystąpiły dla stwierdzeń nr: 1, 2, 3, 6, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 23. Mieszkańcy wsi wykazali się większym zainteresowaniem różnorodnością roślin i zwierząt w miejscu zamieszkania (stwierdzenia nr: 2, 23), chętniej odpoczywali na łonie przyrody niż mieszkańcy miast (nr 3). Poza tym mieszkańcy wsi posiadają większą wiedzę na temat programu Natura 2000 w województwie podlaskim (nr: 11, 12) niż mieszkańcy miast. Mieszkańcy wsi są również bardziej przekonani o znaczeniu różnorodności biologicznej w utrzymaniu stabilności środowiska oraz znaczeniu różnorodności biologicznej w zabezpieczaniu ludzi w żywność i zaspokajaniu ich potrzeb zdrowotnych. Niską akceptację (wartość wskaźnika akceptacji 2,8-2,9) badani wyrazili dla stwierdzeń odnoszących się do skutków utraty różnorodności biologicznej, między innymi, występowania powodzi czy wichur, co świadczy o braku w rozumieniu przebiegu globalnych zjawisk przyrodniczych.

Niechętnie badani deklarowali swój udział w lokalnych działaniach na rzecz ochrony różnorodności biologicznej (wskaźnika akceptacji 2,4-2,8). Najwyższe wskaźniki akceptacji – o wartości 4,2-4,0, uzyskały stwierdzenia wyjaśniające pojęcie „różnorodność biologiczna” (nr 1), wskazując rozwój urbanizacji (nr 4) za jedną z przyczyn utraty różnorodności biologicznej. Dalej plasowały się zagadnienia dotyczące znajomości przez człowieka pospolitych gatunków roślin, zwierząt, grzybów oraz ich znaczenia w przyrodzie (nr 10), następnie tezy wskazujące znaczenie Natury 2000 w ochronie najcenniejszych i najbardziej zagrożonych w Europie elementów przyrody (nr 15).

4. Podsumowanie

Postawy są efektem aktywności procesów poznawczych i emocjonalnych człowieka. Okres nauki w liceum, to dla młodych ludzi czas kształtowania się ich systemów wartości, poglądów, stosunku do rzeczywistości przyrodniczej. Każda czynność podejmowana przez człowieka jest aktem praktycznego ustosunkowania się do otoczenia (Potyrała 2011). Współcześnie stosunek do różnorodności biologicznej jest szczególnie istotny, gdyż ma znaczenie dla trwałości układów podtrzymujących życie w biosferze oraz dla rozwoju społeczno-gospodarczego (Stawiński 2011).

Przedstawiane w pracy badania wskazały, że większość badanej młodzieży z województwa podlaskiego przejawia postawę umiarkowaną pozytywną wobec różnorodności biologicznej, podobnie jak badani przez Obrębską (2004) uczniowie

liceum i gimnazjum w Siedlcach. Wyższe postawy wobec różnorodności biologicznej uczniów uczących się biologii w zakresie rozszerzonym można wytłumaczyć tym, że uczniowie z tych klas są bardziej zainteresowani biologią, mają więcej lekcji biologii niż uczniowie uczący się tego przedmiotu w zakresie podstawowym.

Wyniki wielu badań krajowych i międzynarodowych wskazują na braki w edukacji społeczeństw na temat znaczenia różnorodności biologicznej (Obrębska 2012). W porównaniu z wynikami badań Kalinowskiej (2011), ankietowani licealiści rozumieją znaczenie pojęcia „różnorodność biologiczna”. Przeprowadzone badania jednak potwierdziły istnienie luki w wiedzy uczniów liceów ogólnokształcących, dotyczącej znaczenia różnorodności biologicznej, szczególnie jeśli chodzi o znaczenie różnorodności biologicznej w rozwiązywaniu problemów społecznych. Świadczy o tym niska akceptacja badanych dla stwierdzeń nr 5 (*Istnieje związek między ochroną różnorodności biologicznej a likwidacją biedy na Ziemi*), nr 7 (*Powodzie i wichury są konsekwencją utraty różnorodności biologicznej*), nr 17 (*Gatunki obce zasadzane w parkach i ogrodach są zagrożeniem dla gatunków powszechnie występujących w Polsce*). Wyniki te wskazują, że szczególnie potrzebna jest wieloaspektowa edukacja o różnorodności biologicznej, uwzględniająca, obok aspektów przyrodniczych, także aspekty społeczne, kulturowe, gospodarcze, w kontekście lokalnym, regionalnym i globalnym oraz zrozumienie przez uczniów związku między ochroną różnorodności biologicznej a zrównoważonym rozwojem społeczno-gospodarczym.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż bliższy kontakt z naturą, miejsce zamieszkania na terenach o dużych walorach przyrodniczych, pozytywnie wpływa na postawy uczniów wobec różnorodności biologicznej. Świadczą o tym wyższe postawy i opinie uczniów mieszkających na wsi. Postawy młodzieży z miast położonych w sąsiedztwie parków narodowych i krajobrazowych nie różniły się zdecydowanie od opinii i postaw uczniów z Białegostoku. Niską akceptację badanych uczniów dla stwierdzeń odnoszących się do różnorodności biologicznej jako wartości zagrożonej utratą można wytłumaczyć tym, że badana młodzież nie doświadczyła zagrożeń związanych z utratą różnorodności biologicznej, mieszkając na terenach o bogatej różnorodności biologicznej.

Niską akceptację badanych otrzymało stwierdzenie nr 11, odnoszące się do podejmowania działań na rzecz zachowania różnorodności biologicznej w miejscu zamieszkania. Niechęć do podejmowania własnych działań na rzecz ochrony bioróżnorodności potwierdzają również wyniki badań Obrębskiej (2012), prowadzone wśród studentów Uniwersytetu Przyrodniczo-Historycznego w Siedlcach. Deklarowane przez studentów postawy związane z indywidualnym obowiązkiem ochro-

ny ginących gatunków, nie gwarantują włączenia się młodych osób w faktyczną ochronę przyrody i ochronę różnorodności biologicznej.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają wyniki *Raportu z badania ilościowego* (2010) ukazującego, że przyczyny i skutki utraty różnorodności biologicznej są słabo rozpoznane przez uczniów. Poza tym wydaje się, że uczniowie zdają sobie sprawę z wielu zjawisk i trendów występujących w środowisku przyrodniczym, w społeczeństwie i gospodarce, jednak nie potrafią ich odnieść do środowiska własnego życia i miejsca zamieszkania. Uczniowie mają problemy z całościowym rozumieniem zjawisk i procesów, ich wzajemnych zależności i wielostronnych powiązań.

Literatura

- Brzeziński J., 1984. Elementy metodologii badań psychologicznych. PWN, Warszawa.
- Kalinowska A., 2011. Dla trwałości życia – różnorodność biologiczna a dobrostan ludzkości. [W:] Kalinowska A. (red.) Wybrane zagadnienia z ekologii i ochrony środowiska. Różnorodność biologiczna w wielu odsłonach. UW UCB, Warszawa.
- Konwencja o różnorodności biologicznej, sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r., ratyfikowana przez Polskę w roku 1996 (Dz. U. z 2002 r. Nr 184 poz. 1532).
- Kozłowski W., 2004. Kształtowanie się postaw. Edukacja Biologiczna i Środowiskowa, 2-3 (10-11): 2004.
- Obrębska M., 2004. Młodzież gimnazjalna i licealna wobec różnorodności biologicznej. [W:] Kowalski R. (red.) Efekty edukacji przyrodniczej, biologicznej i środowiskowej w zreformowanej szkole. Wyd. Akademii Podlaskiej, Siedlce.
- Obrębska M., 2012. Studenci wobec bioróżnorodności. [W:] 111 Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis. Studia ad Didacticam Biologiae Pertinentia II. Wydawnictwo Naukowe UP, Kraków.
- Potyrała K., 2011. Kształtowanie umiejętności przetwarzania informacji i zdobywania wiedzy. [W:] Potyrała K., Walosik A. (red.) Edukacja przyrodnicza wobec wyzwań współczesności. Podręcznika akademicki. Wydawnictwo Kubajak. Krzeszowice.
- Raport z badania ilościowego. Stan świadomości i postaw mieszkańców Polski wobec utraty bioróżnorodności biologicznej. www.mos.gov.pl/g2/big/.../fe61746fcc80845867445b25bb4d2857.pdf. [dostęp: 12.2010].
- Stawiński W. 2011. Współczesne wyzwania cywilizacyjne a edukacja przyrodnicza. [W:] Potyrała K., Walosik A. (red.) Edukacja przyrodnicza wobec wyzwań współczesności. Podręcznika akademicki. Wydawnictwo Kubajak. Krzeszowice.
- Ulanowski T., 2016. Ratujmy motyle, póki jeszcze są. Gazeta Wyborcza 15 lipca 2016.