

STRESZCZENIE

Postępujące zmiany klimatyczne stwarzają warunki sprzyjające rozwojowi grzybów, których metabolity działają toksycznie zarówno na komórki roślin, jak i ludzi. Jedną z mykotoksyn, produkowaną przez gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* i akumulującą się w komórkach, jest zearalenon (ZEA). Substancja ta stymuluje wystąpienie reakcji toksycznych, których efektem jest obniżenie ilości i jakości plonów roślin, ważnych agronomicznie. Poznanie mechanizmu stresogenego działania ZEA może przyczynić się do opracowania metod minimalizujących skutki działania tej mykotoksyny. Zagadnienie to jest szczególnie ważne dla roślin stanowiących główny surowiec w przemyśle spożywczym, takich jak, np. pszenica. Występujące, w obrębie gatunku, odmiany o większej lub mniejszej wrażliwości na warunki stresowe, mogą stanowić obiekty badawcze dla poszukiwania różnic/podobieństw w mechanizmach kierujących reakcjami stresogennymi/protekcyjnymi.

Celem prowadzonych eksperymentów było zbadanie różnic w etapach mechanizmu stresogenego wpływu ZEA na komórki odmiany tolerancyjnej i wrażliwej pszenicy, poprzez wyznaczenie parametrów biochemicznych i fizykochemicznych, określających intensywność działania stresu. Jako potencjalny czynnik protekcyjny (w stosunku do ZEA) testowano brassinosteroid (24-epibrassinolid; EBR), którego własności ochronne wykazano w obecności działania innych stresorów. Obiektem biologicznym były komórki kalusów pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.), uzyskane z niedojrzałych ziarniaków, które hodowano na pożywkach zawierających ZEA w stresogennym (30 μ M) lub/i EBR, w hormonalnym stężeniu (0,1 μ M) przez 3 dni. Kontrolę stanowiły komórki rosnące na pożywkach bez dodatku tych substancji. Stymulację stresu oksydacyjnego (generowanie RFT) badano również w równoległych eksperymentach, w których bezpośrednią produkcję reaktywnych form tlenu uzyskano przez ozonowanie komórek.

W badaniach biochemicznych zastosowano wysokosprawny chromatograf ciekłowy (HPLC) sprzężony z detektorem spektrometrii masowej - do oznaczania akumulacji ZEA, natomiast ultra-wysokosprawny chromatograf ciekłowy (UHPLC) z kwadrupolowym detektorem spektrometrii masowej - do wyznaczenia zawartości EBR w komórkach. Analizy enzymatycznych (SOD, CAT, POD) i nieenzymatycznych (AA, GSH, SA) antyoksydantów oraz substancji osmoprotekcyjnej (proliny i enzymów pośredniczących w jej syntezie) wykonano z użyciem spektrofotometrów (UV i UV/VIS) wyposażonych w monitorowanie

kinetyki reakcji. Lipidy membranowe ekstrahowane z komórek kalusowych rozdzielano metodą chromatografii kolumnowej, a czystość frakcji oceniano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Strukturalno - mechaniczne właściwości wybranych frakcji (fosfolipidowej (PL) i galaktolipidowej (MGDG)) określano na podstawie parametrów fizykochemicznych wyznaczonych dla monowarstw, wytwarzanych techniką Langmuira.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w warunkach działania stresu, wywołanego obecnością ZEA w pożywkach, kultury kalusów odmiany wrażliwej charakteryzował mniejszy przyrost świeżej masy, natomiast większa peroksydacja lipidów membranowych, niż odmiany tolerancyjnej. Aktywacja enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów u odmiany wrażliwej dotyczyła głównie enzymów CAT oraz syntezy glutationu i proliny, podczas gdy u odmiany tolerancyjnej wykazano znaczne zwiększenie aktywności głównie enzymów SOD oraz POD, a także wzrost syntezy kwasu askorbinowego, w porównaniu do wrażliwej. Wyższa zawartość proliny, stwierdzona u odmiany wrażliwej, była wynikiem przesunięcia szlaku metabolizmu tego osmoprotektanta, w większym stopniu w kierunku syntezy (poprzez enzym P5CS), w stosunku do rozkładu (przez PDH), niż wykazano to u odmiany tolerancyjnej.

Obecność EBR w pożywkach zawierających ZEA skutkowałą zwiększeniem przyrostu masy i zmniejszeniem peroksydacji lipidów komórek, w stosunku do obiektów rosnących na pożywkach z ZEA, szczególnie u odmiany wrażliwej. Odmiana wrażliwa akumulowała ZEA w większych ilościach niż tolerancyjna, przeciwnie niż EBR, który był absorbowany w wyższych stężeniach u odmiany tolerancyjnej.

Dodatkowa ekspozycja na działanie reaktywnych form tlenu (RFT) układów zawierających w pożywce ZEA u obu odmian skutkowałą większą peroksydacją lipidów, wzrostem aktywności CAT oraz syntezy antyoksydantów nieenzymatycznych (GSH, AA). U odmiany wrażliwej wykazano ponadto większe zmiany w aktywności POD i SOD, jak również wyższe stężenie H_2O_2 , w porównaniu do tolerancyjnej. Obie odmiany różniły się aktywacją alternatywnego szlaku syntezy proliny: u odmiany wrażliwej odnotowano wzrost aktywności enzymu OAT, a u tolerancyjnej - spadek. Występowanie EBR w pożywkach generalnie spowodowało zmniejszenie efektów wywołanych obecnością ZEA i RFT.

Analizy składu lipidowego membran badanych obiektów wykazały, że w warunkach stresu inicjowanego przez ZEA, wzrastał procentowy udział frakcji galaktolipidów, kosztem frakcji fosfolipidów w membranach obu odmian, przy czym większe zmiany wystąpiły u odmiany wrażliwej. Dodatkowa obecność EBR w pożywkach zmniejszała modyfikacje spowodowane działaniem ZEA. Utworzenie monowarstw z frakcji PL i MGDG, jako tych,

które występowały w membranach w największych ilościach (waga Langmuira) i wykonanie dla nich izoterm (25°C) zależności ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę lipidu (A), pozwoliło na wyznaczenie parametrów fizykochemicznych charakteryzujących strukturalno - mechaniczne własności membran. Najważniejszymi parametrami, wyznaczającymi różnice w ściśliwości i elastyczności membran były: A_{lim} - powierzchnia zajmowana przez cząsteczkę lipidu w maksymalnie „upakowanej” monowarstwie, jako wynik hydrofilowo-hydrofobowych oddziaływań pomiędzy sąsiednimi lipidami, π_{col} – ciśnienie, przy którym następowało maksymalne „upakowanie” monowarstwy oraz $C_s^{-1}_{max}$ – maksymalna wartość statycznego modułu kompresji monowarstwy.

Dla obu badanych frakcji wykazano, że efektem działania ZEA było zmniejszenie wartości A_{lim} występujące u obu odmian, natomiast zmiany parametru π_{col} różnicowały odmiany: u tolerancyjnej następował spadek, a u wrażliwej - wzrost π_{col} . Wartości parametru $C_s^{-1}_{max}$ były zależne zarówno od rodzaju frakcji, jak i tolerancyjności obiektów: dla frakcji PL u odmiany tolerancyjnej odnotowano spadek, a u wrażliwej wzrost tego parametru, podczas gdy dla frakcji MGDG zmiany $C_s^{-1}_{max}$ miały odwrotny przebieg. Jednoczesna ekspozycja komórek na działanie ZEA i EBR skutkowała generalnie mniejszymi modyfikacjami parametrów fizykochemicznych, w stosunku do ZEA, szczególnie dotyczyło to A_{lim} i π_{col} . Działanie RFT powodowało, już w obiektach kontroli, obniżenie wartości A_{lim} u obu odmian, natomiast w obecności ZEA i ZEA + EBR obserwowano podobny kierunek zmian w przebiegu wyznaczonych parametrów do obiektów nieozonowanych.

Dla układów dwuskładnikowych (PL + MGDG) wyliczono zmiany nadmiarowej energii swobodnej Gibbsa (ΔG^{exc}), pozwalające określić, czy w mieszaninach, odpowiadających stosunkowi molowemu obu frakcji (wyznaczonemu w badaniach biochemicznych), występują sprzyjające oddziaływania między PL i MGDG. W obiektach ZEA u obu odmian odnotowano obniżenie wartości ΔG^{exc} (świadczące o oddziaływaniach przyciągających), przy czym większy spadek wyliczono dla odmiany tolerancyjnej, a obecność EBR zmniejszała obserwowane efekty. W układach ZEA i RFT, u odmiany wrażliwej zarejestrowano przeciwny kierunek zmian – wartości ΔG^{exc} były dodatnie (świadczące o oddziaływaniach odpychających), podczas gdy u tolerancyjnej - nie odnotowano zmian (w porównaniu do układu ZEA nietraktowanego RFT).

Na podstawie uzyskanych danych zaproponowano schemat działania mechanizmów stresogennych i obronnych u odmiany tolerancyjnej i wrażliwej po ekspozycji na stres ZEA.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że obecność ZEA wywołuje stres oksydacyjny w komórkach pszenicy, w którego mechanizm włączone jest generowanie reaktywnych form tlenu. Zróżnicowanie pomiędzy odmianą tolerancyjną i wrażliwą, wynikające z różnic w składzie i strukturze membran warunkuje większą akumulację tej mykotoksyny w komórkach odmiany wrażliwej, co może być przyczyną wystąpienia większych efektów stresogennych u tej odmiany. W mechanizmy protekcyjne włączone są zarówno enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne antyoksydanty, a także zapewnienie odpowiednich warunków osmotycznych w komórkach. Modyfikacje membran komórkowych w kierunku zwiększenia udziału frakcji galaktolipidów w stosunku do fosfolipidów, a także zwiększenie oddziaływań hydrofilowo-hydrofobowych pomiędzy lipidami zmniejsza możliwość wnikania tej toksyny do komórek, co może stanowić ważny etap w mechanizmie protekcyjnym. 24-epibrassinolid zastosowany w stężeniach hormonalnych zmniejsza wnikanie ZEA do komórek, obniżając stresogenne efekty tej mykotoksyny. Może być zatem wykorzystany jako nieinwazyjna substancja w ochronie roślin przeciw ZEA.

Paulina Dyja