

**UNIWERSYTET PEDAGOGICZNY  
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie**

**WYDZIAŁ NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH  
INSTYTUT BIOLOGII I NAUK O ZIEMI**

**Katedra Biochemii i Biofizyki**

Specjalność: Nauki biologiczne



**mgr MAGDALENA SKÓRKA**

*Analiza zmian biochemiczno - strukturalnych rejestrowanych pomiędzy  
wrażliwymi i tolerancyjnymi odmianami zbóż pod wpływem toksyczności  
jonów Mn*

*Praca doktorska*

Praca napisana pod kierunkiem  
**dr hab. Apolonii Sieprawskiej prof. UP**

**Kraków 2023**

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Pani Promotor  
dr hab. Apolonii Sieprawskiej prof. UP  
za wsparcie, profesjonalizm i zaangażowanie  
na każdym etapie studiów doktoranckich  
oraz podczas pisania pracy doktorskiej.  
Składam również podziękowania  
całemu zespołowi Katedry Biochemii i Biofizyki  
w tym szczególnie dla Pani prof. dr hab. Marii Filek  
za poświęcony czas i wsparcie merytoryczne.  
Niniejszą pracę dedykuję swojemu mężowi Jakubowi  
oraz Rodzicom w podziękowaniu za wyrozumiałość,  
wsparcie oraz pomoc, na którą zawsze mogłam liczyć.*

## SPIS TREŚCI

LISTA SKRÓTÓW .....	6
STRESZCZENIE .....	8
SUMMARY .....	10
1. WSTĘP .....	12
1.1. Mangan- występowanie w środowisku.....	12
1.1.1. Gleba .....	12
1.1.2. Woda .....	13
1.1.3. Powietrze.....	14
1.2. Pobieranie i transport manganu w roślinach.....	15
1.3. Rola manganu w metabolizmie roślin .....	16
1.4. Wpływ nadmiernego pobierania jonów manganu przez rośliny .....	18
1.5. Przyczyny i implikacje stresu oksydacyjnego .....	22
1.5.1. Reaktywne formy tlenu (RFT) .....	23
1.6. Zaburzenia osmoregulacji w komórkach.....	25
1.6.1. Stres osmotyczny.....	25
1.7. Mechanizm ochrony komórek przed działaniem reaktywnych form tlenu .....	27
1.7.1. Enzymy antyoksydacyjne.....	28
1.7.1.1. Dysmutazy ponadtlenkowe .....	28
1.7.1.2. Katalazy.....	29
1.7.1.3. Peroksydazy .....	30
1.7.2. Antyoksydanty .....	30
1.7.2.1. Kwas askorbinowy .....	31
1.7.2.2. Glutation.....	32
1.7.2.3. Kwas salicyłowy .....	33
1.7.2.4. Polifenole .....	33
1.8. Mikro- makroelementy niezbędne dla roślin.....	34
1.9. Morfogeneza organów roślinnych.....	36
1.9.1. Morfogeneza korzenia.....	36
1.9.2. Morfogeneza liści.....	38
1.10. Organizacja przestrzenna komórki – chloroplasty.....	39
1.10.1. Fotosystem II (PS II).....	41

2. CEL PRACY .....	43
3. MATERIAŁY I METODY .....	45
3.1. Przygotowanie materiału roślinnego .....	45
3.1.2. Hodowla wazonowa .....	45
3.1.3. Hodowla hydroponiczna .....	46
3.2. Oznaczenie enzymów antyoksydacyjnych .....	46
3.2.1. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) .....	46
3.2.2. Oznaczanie aktywności peroksydazy (POX) w komórkach roślinnych .....	47
3.2.3. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) w komórkach roślinnych .....	47
3.3. Oznaczanie koncentracji makro- oraz mikroelementów .....	47
3.4. Oznaczanie zawartości MDA .....	48
3.5. Oznaczanie zawartości białka .....	48
3.6. Oznaczanie cukrów rozpuszczalnych i skrobi .....	49
3.7. Oznaczanie nadtlenu wodoru .....	49
3.8. Oznaczenie zawartości proliny .....	49
3.9. Oznaczenie aktywności enzymów syntezy i degradacji proliny .....	50
3.10. Wyznaczenie zawartości chlorofilu .....	51
3.11. Oznaczenie totalnej aktywności antyoksydacyjnej .....	51
3.11.1 Wyznaczenie zdolności eliminacji rodnika DPPH .....	51
3.11.2. Wyznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC) .....	52
3.11.3. Moc antyoksydacyjna redukująca żelazo (FRAP) .....	52
3.12. Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego .....	53
3.13. Oznaczenie zawartości kwasu askorbinowego .....	53
3.14. Wyznaczenie ilości glutationu .....	53
3.15. Obserwacje mikroskopowe .....	54
3.16. Analiza statystyczna .....	55
4. WYNIKI .....	56
4.1. Pierwsza część badań .....	56
4.1.1. Zawartość manganu .....	56
4.1.2. Parametry fizjologiczne .....	57
4.1.3. Enzymy antyoksydacyjne .....	58
4.1.4. Zawartości cukrów i skrobi .....	60
4.1.5. Antyoksydanty niskocząsteczkowe .....	61

4.1.6.	Prolina i metabolizm proliny .....	63
4.1.7.	Zawartość chlorofilu a oraz b.....	65
4.2.	Druga część badań .....	67
4.2.1.	Markery stresu .....	68
4.2.2.	Prolina i metabolizm proliny .....	69
4.2.3.	Potencjały antyoksydacyjne .....	71
4.2.4.	Zawartość manganu oraz selenu .....	72
4.2.5.	Makroelementy.....	73
4.2.6.	Mikroelementy .....	76
4.2.7.	Polifenole .....	78
4.2.8.	Obserwacje mikroskopowe .....	79
4.2.8.1.	Obserwacja mikroskopowa liści.....	79
4.2.8.2.	Obserwacja mikroskopowa korzenia .....	83
5.	DYSKUSJA.....	88
6.	WNIOSKI.....	99
7.	LITERATURA .....	101

## LISTA SKRÓTÓW

APX- peroksydaza askorbinianowa

AsA- kwas askorbinowy

ATP- adenzyno trifosforan

BSA- surowicza albumina wołowa

CAT- katalazy

CAX – rodzina transporterów ang. Cation/H<sup>+</sup> exchanger

CDF/MTP- rodzina transporterów z ang. cation diffusion facilitators/ metal tolerance proteins

Chl- chlorofil

Cu/ Zn-SOD- dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo-cynkowa

Cys- cysteina

DDT- dichlorodifenylo-trichloroetanem

DHAR- reduktaza dehydroaskorbinianowa

DPPH- 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

DTNB- kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)

DW- sucha masa

EC- SOD zewnątrzkomórkową dysmutaza ponadtlenkowa

EDTA- kwas etylenodiaminotetraoctowy

Fe- SOD- dysmutaza ponadtlenkowa żelazowa

FRAP- moc antyoksydacyjna redukująca żelazo

FW- świeża masa

Glu- kwas glutaminianowy

Gly- glicyna

GPX- peroksydaza glutationowa

GR- reduktaza glutationowa

GSA-  $\gamma$ -semialdehydu glutaminowego

GSH- glutation

GSSG- disulfid glutationu

IHAR- Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

LHCII- główna antena fotosyntetyczna

MANEB- etyleno-1,2-ditiokarbaminian manganu  
MDHAR- reduktaza monodehydroaskorbinianowa  
MMT- trikarbonylek (metylocyklopentadienylo) manganu  
Mn-SOD- dysmutaza ponadtlenkowa manganowa  
NA- nikotianamina  
NADH- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
NBD-Cl- 4-chloro7-nitrobenzenofurazan  
NRAMP- rodzina transporterów z ang. natural resistance associated macrophage protein  
OEC- kompleks rozkładający wodę  
OxOx- oksydaza szczawianowa  
P5CDH- dehydrogenaza  $\Delta 1$  -pirolino-5-karboksylanowa  
P5CR- reduktaza  $\Delta 1$  -pirolino-5-karboksylanowa  
P5CS- syntetaza  $\Delta 1$  -pirolino-5-karboksylanowa  
PB- bufor fosforanowy  
POX- peroksydazy  
Pro- prolina  
PS- fitosiderofory  
PS I- fotosystem I  
PS II- fotosystem II  
RFT- reaktywne formy tlenu  
RuBP- karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu  
SA- kwas salicylowy  
SOD- dysmutazy ponadtlenkowe  
TAC- całkowita zdolność antyoksydacyjna  
TBA- kwas tiobarbiturowy  
TCA- kwas trichlorooctowy  
VIT – rodzina transporterów z ang. vacuolar iron transporter  
YLS- rodzina transporterów z ang. yellow stripe-like  
ZIP – rodzina transporterów z ang. zinc-iron permease  
 $\psi w$  – potencjał wody

**STRESZCZENIE**

Mangan jako mikroelement niezbędny dla roślin bierze udział w procesach metabolicznych, głównie w fazie jasnej fotosyntezy oraz służy jako kofaktor w wielu enzymach. W środowisku naturalnym występują liczne związki manganu, a jego zawartość jest zróżnicowana w zależności od regionu i rodzaju gleby. W wyniku antropopresji m.in. przez działania przemysłowe oraz stosowanie nawozów zawierających Mn stężenie tego pierwiastka w środowisku stale rośnie co może prowadzić do jego nadmiernego pobierania i akumulacji w roślinach, wywołując zmiany zarówno morfologiczne jak i anatomiczne. Objawy wynikające z nadmiernej akumulacji Mn różnią się w zależności od gatunku i odmiany rośliny, a różnice w tolerancji/wrażliwości roślin są następstwem uruchomienia odmiennych reakcji mających na celu przystosowanie się do toksycznej koncentracji Mn.

Dynamicznie zmieniające się warunki środowiskowe, w tym zwiększone stężenia metali ciężkich w glebie, ukierunkowały działania naukowe na poszukiwanie naturalnych związków ochronnych roślin zwiększających zarówno jakość jak i ilość uzyskanych plonów. Dlatego wykorzystując potencjał roślin do akumulacji selenu (Se), zastosowałam ten niezbędny w zbilansowanej w diecie człowieka mikroelement jako potencjalny związek protekcyjny mający zdolność do stymulacji mechanizmów ochronnych komórek. Zwiększenie stężenia wybranych związków Se w produktach pochodzenia roślinnego pozwoli nie tylko stymulować rozwój roślin oraz ich adaptację do stresu oksydacyjnego, ale jednocześnie może przyczynić się do uzupełnienia niedoboru tego pierwiastka w organizmie człowieka.

W tym celu do badań wykorzystałam ziarna zbóż ważnych agronomicznie: pszenicy, jęczmienia i owsa (odmiany jare, wytypowane jako tolerancyjne i wrażliwe). Nasiona kiełkowano z wykorzystaniem roztworów zawierających 5 i 10 mM  $MnCl_2$ , aby zbadać zdolność do akumulacji Mn przez wybrane gatunki i odmiany. Wyższy procent pobierania Mn był odnotowany w owsie, w porównaniu do pszenicy i jęczmienia, a odmiany wrażliwe gromadziły większe ilości tego pierwiastka w stosunku do tolerancyjnych. Podwyższona akumulacja Mn indukowała stres oksydacyjny w siewkach zbóż przejawiający się wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POX i CAT), podwyższonym poziomem SA, GSH oraz proliny, a także zmianą aktywności enzymów syntezy/degradacji proliny i wzrostem stężenia cukrów. Przeprowadzone badania pozwoliły uszeregować badane zboża pod względem tolerancji na Mn w kolejności: pszenica>jęczmień>owies.



Do bardziej szczegółowych analiz wytypowano pszenicę jako najbardziej odporną wśród analizowanych zbóż. Siewki pozyskano z hodowli hydroponicznej hodowanej do stadium trzeciego liścia. Mn zastosowany w toksycznej dawce (10 mM MnCl<sub>2</sub>) powodował wzrost peroksydacji lipidów i poziomu nadtlenu wodoru zarówno w liściach jak i korzeniach. Tym zmianom towarzyszyło zwiększone wchłanianie tego pierwiastka przez korzenie oraz zmniejszone pobieranie innych pierwiastków (K, Fe, S, P), z wyjątkiem Ca, którego wzrost zaobserwowano zwłaszcza w obecności Se. Sugerowano, że wzrost poziomu Ca może prowadzić do modyfikacji różnicowania komórek korzeniowych, co może stanowić jeden z etapów reakcji odpornościowych. Zmianie kierunku różnicowania komórek w wierzchołkowej części korzenia pod wpływem stresu Mn towarzyszył wzrost stężenia 5-metC. Nadmiar Mn może również zmieniać poziomy substancji odpowiedzialnych za regulację komórkowego potencjału osmotycznego (proliny), aktywność głównych enzymów odpowiedzialnych za syntezę tego aminokwasu P5CS, OAT i jej rozkładu PHD. Wykryto również zmiany w aktywacji komórkowych mechanizmów ochronnych. W wyniku przeprowadzonych analiz potwierdzono, że selen może łagodzić skutki toksycznego stężenia Mn i może stanowić alternatywę do stosowania chemicznych środków ochrony roślin.

## SUMMARY

For plants, manganese is an essential element for proper growth and development, it takes part in metabolic processes, mainly in the phase of bright photosynthesis, and serves as an enzymes' cofactor. In natural environment, Mn is widespread, and its content varies by region and the type of soil. As a result of anthropopressure, including industrial activities and the use of fertilizers containing Mn, concentration of this element is constantly increasing, which can lead to excessive uptake of accumulation in plants causing both morphological and anatomical changes. The symptoms of its over-accumulation vary depending on plant species and cultivars, and differences in plant tolerance / sensitivity are triggered by activation of diverse reactions to adapt to the toxic concentration of Mn. Dynamically changing environmental conditions, including increased concentrations of heavy metals in the soil, directed scientific efforts to search for natural plant protective compounds to enhance both quality and quantity of the obtained crops. Therefore, using the potential of plants to accumulate selenium (Se), I applied this micronutrient, vital for a balanced diet, as a potential protective compound capable of stimulating cells' protective mechanisms. Increasing the concentration of selected Se compounds in products of plant origin will not only stimulate the growth of plants and their adaptation to oxidative stress, but it can also contribute to replenishing the deficiency of this element in the human body.

I used the grains of agronomically important cereals: wheat, barley and oats (spring cultivars, selected as tolerant and sensitive) for this purpose. Seeds were germinated on solutions containing 5 and 10 mM  $MnCl_2$  to test the ability to accumulate Mn by selected species and cultivars. Higher percentage of Mn uptake was recorded in oats compared to wheat and barley, and sensitive cultivars accumulated a greater amount of this element than the tolerant ones. Elevated Mn accumulation induced oxidative stress in cereal seedlings manifested in an increase in the activity of antioxidant enzymes (SOD, POX and CAT), increased levels of SA GSH and proline, as well as a change in activity of enzymes responsible for synthesis and degradation of proline and increased sugar concentration. Research results allowed to rank the tested cereals in terms of their tolerance to Mn in the following order: wheat >barley >oats.

Wheat was selected as the most resistant one from the analyzed cereals. The seedlings were obtained from hydroponic culture grown for third leaf stage. Mn applied in a toxic dose (10 mM  $MnCl_2$ ) caused an increase in lipid peroxidation and the level of hydrogen peroxide in both leaves and roots. These changes were accompanied by a rised absorption of this

element by roots and a reduced uptake of other elements (K, Fe, S, P), except for Ca, the increase of which was observed especially in the presence of Se. This suggests that an enhance in Ca levels may lead to modification of differentiation of root cells, which may be one of the stages of defense mechanisms. Changing the direction of diversifying cells in the apical part of the root under the Mn stress were accompanied by the growth of 5-metC concentration. An excess of Mn can also alter the levels of the substances responsible for regulating cellular osmotic potential (proline), activity of the main enzymes responsible for the synthesis of this amino acid P5CS, OAT and its PHD decomposition. Changes in cellular activation of protective mechanisms were also detected. As a result, of the analyzes, it was confirmed that selenium can mitigate the effects of toxic levels of Mn and may be an alternative to chemical protection agents in plants.

## 1. WSTĘP

### 1.1. Mangan- występowanie w środowisku

#### 1.1.1. Gleba

Mangan (Mn) jest pierwiastkiem należącym do 7 grupy układu okresowego, który może występować na 11 stopniach utlenienia w zakresie od -3 do +7, jednak najczęściej przyjmuje +2 i +4 stopień utlenienia. Pierwiastek ten, klasyfikowany jako metal, występuje powszechnie w środowisku głównie w postaci związanej, a do popularnych minerałów zawierających mangan należą: piroluzyt ( $MnO_2$ ), manganit ( $MnO \cdot (OH)$ ), rodonit ( $MnSiO_3$ ), hausmannit ( $Mn_3O_4$ ) oraz psylomelan ( $BaMn_9O_{16}(OH)_4$ ) [Grygo-Szymanko i wsp. 2016; Nádaská i wsp. 2012]. Mangan znajduje także różnorodne zastosowanie w przemyśle przede wszystkim w metalurgii, gdzie wykorzystuje się głównie ferromangan, natomiast siarczan (VI) manganu (II) jest składnikiem środków grzybobójczych, nawozów sztucznych, lakierów, ceramiki oraz glazury [Grygo-Szymanko i wsp. 2016]. Do produkcji materiałów szklanych, fajerwerków i zapalek używany jest tlenek manganu (IV). Nadmanganiany, ze względu na właściwości oksydacyjne, są wykorzystywane jako środek dezynfekujący oraz do oczyszczania ścieków i wód ze związków organicznych. Dodatkowo nadmanganiany można uznać za bezpieczniejsze utleniacze w porównaniu do chloru, ozonu lub dwutlenku rodu. Do produkcji baterii oraz katalizatorów do chlorowania związków organicznych wykorzystuje się chlorek manganu (II) [Grygo-Szymanko i wsp. 2016].

Zawartość Mn w glebie jest zróżnicowana w zależności od regionu i rodzaju gleby. W 1979 r. Lindsay [1979] zarejestrował stężenia manganu wahające się od 20 mg/ kg do 3000 mg/ kg, natomiast obecnie szacuje się, że wartość ta mieści się w przedziale od 450 mg/ kg do 4000 mg/ kg [Li i wsp. 2019]. W Hiszpanii w regionie Alicante średnie stężenie Mn w glebie wynosi 320 mg/ kg [Mendoza i wsp. 2006], natomiast w Indiach całkowita zawartość Mn w glebie w stanie Pendżab mieści się w zakresie od 200 mg/ kg do 950 mg/ kg [Sharma i wsp. 2016], w Japonii poziom Mn oscyluje w granicach od 3 mg/ kg do 12 400 mg/ kg [Takeda i wsp. 2004], a w Nowej Kaledonii gleby pochodzące ze skał ultramaficznych zawierały od 290 do 650 mg/ kg Mn [Becquer i wsp. 2010]. Tkaczyk i wsp. [2017] wykazali związek między stężeniem Mn a rodzajem gruntów ornych. Gleba sklasyfikowana do klasy III lub wyższej w porównaniu do klas niższych zawierała podwyższone stężenie manganu ze średnią wartością ok. 190 mg/ kg, a Sharma i wsp. [2006] zarejestrowali, w glebach typu Vertisols stężenie manganu wahające się w granicach

od 387 mg/ kg do 1396 mg/ kg. W regionie Alentejo (Portugalia), w glebach typu kambisol i arenosol pochodzących z granitów, wysokie stężenia Mn były głównym czynnikiem ograniczającym wydajność upraw [Carvalho i wsp. 2015]. Wysokie zawartości Mn w środowisku nie zależą tylko i wyłącznie od rodzajów gleb, ponieważ Mn (i inne metale śladowe) mogą zostać uwolnione do środowiska w wyniku antropopresji poprzez działania przemysłowe oraz przez zastosowanie nawozów zawierających mangan [Alloway 1995; Rimmer i wsp. 2001]. MANEB (etyleno-1,2-ditiokarbaminian manganu) jest powszechnie stosowanym fungicydem służącym do zwalczania chorób grzybowych w uprawach zbóż oraz wykorzystywanym do oprysków winorośli przeciwko mączniakowi rzekomemu. Jego zużycie tylko w Salinas Valley w Kalifornii szacuje się na około 150 000 kg rocznie [Gunier 2013]. Niewłaściwy nadzór i gromadzenie stałych odpadów pozostałości manganu (MSW) w glebie może powodować uwalnianie i rozprzestrzenianie się tego pierwiastka w środowisku powodując zanieczyszczenie powietrza, gleb i wód gruntowych, co z kolei może prowadzić do zagrożeń ekologicznych, które mogą mieć niekorzystny wpływ na zdrowie i życie człowieka [Das i wsp. 2015].

### 1.1.2. Woda

Występowanie manganu w środowisku wodnym jest wynikiem wymywania jego jonów z tworów geologicznych przede wszystkim ze skał magmowych (hornblendy, augity) oraz ze skał osadowych [Maziarka i Krogulska 2018]. Dodatkowo czynniki antropogeniczne mogą prowadzić do przedostawania się związków manganu do wód gruntowych, poprzez odprowadzanie ścieków komunalnych i przemysłowych [U.S EPA 2004].

W środowisku wodnym mangan występuje na dwóch stopniach utlenienia (+2 i +4). Do wód podziemnych pierwiastek ten dostaje się w wyniku rozpuszczania skał w obecności jonów siarczanowych oraz w procesie tworzenia kompleksów z materią organiczną. Przy wartościach pH: 4 - 7 mangan przyjmuje zazwyczaj dwuwartościową formę a najczęściej spotykanymi związkami w środowisku wodnym są wodorowęglan manganu (II)  $Mn(HCO_3)_2$  i siarczan (VI) manganu (II)  $MnSO_4$ . Natomiast w wodach o podwyższonym potencjale utleniającym, mangan występuje na +4 stopniu utlenienia, który charakteryzuje się znacznie niższą rozpuszczalnością i prowadzi do wytrącania się osadów [Williams i wsp. 2013].

Zawartość manganu w wodzie słodkiej wynosi od 1 g/l do 200 g/l [Barceloux 1999], natomiast w wodzie morskiej mieści się w zakresie od 0.4 g/l do 10 g/l [ATSDR 2000].

W wodach aerobowych obserwuje się podwyższone stężenia manganu, czego powodem są najczęściej odpady przemysłowe. Dodatkowo możemy obserwować dodatnią korelację pomiędzy zawartością żelaza i manganu w wodzie (podwyższone stężenie żelaza występuje w wodzie przy jednoczesnym wysokim stężeniu manganu). Dopuszczalna zawartość manganu dla wody pitnej wynosi  $0.05 \text{ mg/ dm}^3$ . Pawęska i wsp. [2016] zarejestrowali przekroczenia dopuszczalnego stężenia manganu w 75 % badanych studni gospodarczych w gminie Gorzyce, gdzie odnotowano maksymalne stężenie na poziomie  $2.87 \text{ mg/ dm}^3$ . Z kolei Kaniuczak i Augustyn w 2010 r. [2011] zarejestrowali w wodach powierzchniowych Wisłoki, przeznaczonych do spożycia przez ludzi, przekroczenia zawartości manganu, którego stężenie wynosiło  $0.232 \text{ mg/ dm}^3$ .

### *1.1.3. Powietrze*

Emisje przemysłowe są głównym źródłem powodującym uwolnienie manganu do powietrza (produkcja żelaza, odlewnie stali) oraz spalanie paliw kopalnych (elektrownie, piece koksownicze) [Lioy 1983]. Stosowanie metaloorganicznych związków chemicznych zawierających mangan takich jak np. trikarbonylek (metylocyklopentadienylo) manganu (MMT) jako środka przeciwstukowego do paliw może powodować emisję pierwiastka do atmosfery. Analiza zawartości Mn w powietrzu podczas stosowania pojazdów zasilanych paliwami z dodatkiem MMT przyczyniły się do zwiększenia emisji Mn średnio o  $13 \text{ ng/ m}^3$  w południowej Kalifornii, podczas gdy w środkowej i północnej Kalifornii o około  $3 \text{ ng/ m}^3$  [Davis i wsp. 1988].

Zaostrzenie przepisów dotyczących emisji spalin a także realizacja zadań wynikających z wprowadzonych obostrzeń spowodowała w ostatnich latach zmniejszenie emisji metali śladowych, w tym manganu, do środowiska. W mieście Marietta w stanie Ohio ilość cząsteczek manganu zawieszonych w powietrzu oscylowała w przedziale od  $0.03 \text{ }\mu\text{g/ m}^3$  do  $1.61 \text{ }\mu\text{g/ m}^3$  natomiast we Wschodnim Liverpoolu (stan Ohio) odnotowano stężenie manganu plasujące się w szerszym zakresie od  $0.01 \text{ }\mu\text{g/ m}^3$  do  $6.32 \text{ }\mu\text{g/ m}^3$  [Bowler i wsp. 2015].

## 1.2. Pobieranie i transport manganu w roślinach

Pomimo zapotrzebowania roślin na Mn oraz jego udział w rozwoju roślin, stosunkowo niewiele wiadomo na temat sposobu przemieszczania się tego pierwiastka do oraz z organelli, czy między tkankami. Poznano kilka rodzin transporterów, które są zaangażowane w transport Mn w roślinach.

Transportery NRAMP (ang. natural resistance associated macrophage protein) odpowiedzialne są za pobieranie i dystrybucję wielu metali w tym Mn, Fe, Zn, Cd, Cu, Ni, Co i Al [Nevo i Nelsona 2006; Xia i wsp. 2010; Socha i Guerinot 2014]. Białka te zbudowane są z 10-12 domen transbłonowych, z których 8-9 odpowiedzialnych jest za transport metali [Socha i Guerinot 2014]. NRAMP jako transporter o wysokim powinowactwie do pobierania jonów Mn zlokalizowany jest w błonie komórkowej komórek korzenia [Lu i wsp. 2018]. Ekspresja tego transportera błony plazmatycznej jest zwiększona przy niedoborze jonów Mn [Cailliatte i wsp. 2010].

Oligopeptydowe transportery z rodziny YSL (ang. yellow stripe-like) zaangażowane są w transport wielu kompleksów metali takich jak: Zn, Cu, Ni, Cd i Fe. Yen i wsp. [2001] zasugerowali udział białek YSL w kompleksowaniu metali przez aminokwasy nieproteogenne, takie jak nikotianamina (NA) i fitosiderofory (PS). Udział PS w transporcie metali jest możliwy tylko w zbożach, podczas gdy w innych roślinach transportery YSL wykorzystują NA [Palmer i Guerinot 2009].

Białka typu CDF/MTP (ang. cation diffusion facilitators/ metal tolerance proteins) są odpowiedzialne za transport jonów Zn, Co, Cd, Mn i Ni. Zbudowane są z sześciu domen transbłonowych i trzech grup funkcyjnych zidentyfikowanych w roślinach jako Zn-CDF, Fe/Zn-CDF i Mn CDF [Gustin i wsp. 2011]. Prowadzą do wytworzenia homo- lub heterooligomerycznych kompleksów, które działają na zasadzie antyportu protonowego. Ich zadaniem jest przenoszenie metali z cytoplazmy do innych kompartmentów komórkowych [Gustin i wsp. 2011].

Białka z rodziny ZIP (ang. zinc-iron permease) transportują metale, takie jak Fe, Zn, Cd, Co i Mn [Guerinot 2000]. Składają się z ośmiu domen transbłonowych skierowanych na zewnątrz błony komórkowej. Pomiędzy trzecią a czwartą domeną znajduje się tak zwany motyw histydynowy wykazujący zdolność do wiązania metali, a jego mutacje mogą wpływać na selektywność wychwytu jonów [Guerinot 2000].

Białka CAX (ang. Cation/H<sup>+</sup> exchanger) należą do rodziny transporterów stanowiących nadrodzinę CaCA (ang. Ca<sup>2+</sup>/cation antiporter) [Shigaki i Hirschi 2006;

Emery i wsp. 2012]. Transportery te są zdolne do transportu jonów dwuwartościowych takich jak Ca i Cd w tym również do wychwytu Mn. Zwykle składają się z 11 domen transbłonowych i działają na zasadzie pompy protonowej.

Transportery rodziny VIT (ang. vacuolar iron transporter) mogą przenosić zarówno Fe, jak i Mn. Do transportu manganu najczęściej wykorzystywane są dwa homologi (VIT1 i VIT2) [Socha i Guerinot 2014; Shao i wsp. 2017].

Plazmolemmowa ATPaza typu P2A utrzymuje homeostazę Ca i Mn i przyczynia się do przenoszenia jonów metali pomiędzy organami roślin np. z korzenia do pędów [Li i wsp. 2008; Mills i wsp. 2008].

### 1.3. *Rola manganu w metabolizmie roślin*

Mangan jest mikroelementem, który odgrywa istotną rolę w reakcjach redoks ze względu na zdolność zmiany jego stopnia utlenienia [Maathuis i Diatlof 2013]. Bierze udział w reakcjach enzymatycznych, takich jak fosforylacja, hydroliza i dekarboksylacja [Schmidt i Husted 2019] oraz służy jako kofaktor wielu enzymów m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, oksydazy oksalinianowej, dekarboksylazy oksalinianowej a także lipoksygenazy. Dodatkowo Mn wchodzi w skład enzymów zaangażowanych w reakcje cyklu kwasów tłuszczowych, w syntezę kwasu deoksyrybonukleinowego i kwasu rybonukleinowego [Broadley i wsp. 2012; Hajiboland 2012; Bityutskii i wsp. 2017; Shao i wsp. 2017]. W natywnej formie enzymów mangan występuje na +2 stopniu utlenienia, natomiast aktywacja enzymów powoduje utlenianie manganu do +3 lub +4 stopnia utlenienia.

Kompleks enzymatyczny rozkładający wodę (OEC) zawiera mangan w centralnej części, który jest otoczony przez macierz białkową w fotosystemie II (PSII). W fazie jasnej fotosyntezy OEC katalizuje reakcję, prowadzącą do rozszczepienia cząsteczki wody, w wyniku której uwalniany jest tlen. Cykliczność wydzielania O<sub>2</sub> jest powiązana ze zmianami stopnia utleniania manganu (+2, +3 i +4), które są obecne w kompleksie [Nickelsen i Rengstl 2013; Cheah 2020], a Mn w tym procesie służy jako akumulator protonów [Ducic i Polle 2005; Pittman 2005; Mar Tinez-Finley i wsp. 2013]. Możliwość przenoszenia przez Mn pięciu ładunków od Mn (+2) do Mn (+7) sprawia, że jest to idealny pierwiastek do budowy centrum aktywnego OEC, w którym do utlenienia cząsteczek wody do tlenu cząsteczkowego potrzebna jest akumulacja czterech ładunków [Schmidt i Husted 2019].



W roślinach dysmutazy ponadtlenkowe zawierające mangan (Mn-SOD) występują zwykle w mitochondriach, ale mogą być również zlokalizowane w peroksysomach. U roślin wyższych struktura molekularna Mn-SOD jest homotetrameryczna, z pojedynczym atomem Mn na podjednostkę. Miejsce aktywne Mn-SOD jest wysoce konserwatywne, a roślinne Mn-SOD wykazują między sobą około 70% podobieństwa sekwencji [Bowler i wsp. 1994]. Mn (III) jest związany w bipiramidzie trygonalnej z łańcuchami bocznymi trzech reszt histydynowych, jedną resztą asparaginową i z jednym ligandem rozpuszczalnika (uważa się, że jest to jon hydroksylowy). W czasie aktywacji Mn-SOD powstaje miejsce koordynacyjne, które pozwala wiązać się anionowi hydroksylowemu z Mn (III) [Zhu i Richards 2017; Miller 2012]. Elektron pochodzący z utleniania ponadtlenków jest przenoszony na Mn (III) tworząc Mn<sup>II</sup>-SOD i tlen. Mechanizm dysmutacji Mn-SOD polega więc na przemianie pomiędzy +3 a +2 stopniem utlenienia manganu w trakcie dysmutacji rodników ponadtlenkowych [Abreu i Cabelli 2010].

Oksydaza szczawianowa (OxOx) jest kolejnym enzymem związanym z Mn i katalizuje zależny od tlenu rozkład szczawianu poprzez utlenianie do CO<sub>2</sub>, w reakcji sprzężonej z tworzeniem się H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Darvill i wsp. 1980]. Mangan pełni tutaj bardzo ważną rolę, ponieważ jest jedynym metalem biorącym udział w neutralizacji szczawianów w roślinach [Whittaker i wsp. 2002]. Aktywność OxOx rejestrowana jest głównie w apoplacie i jej działanie ochronne jest dwójakie. Po pierwsze bierze udział w neutralizacji toksyn grzybowych, po drugie wytwarza nadtlenek wodoru, który pełni rolę sygnalizatora w odpowiedzi na stres oksydacyjny [Requena i wsp. 1999]. Dodatkowo oksydaza szczawianowa odgrywa rolę w kiełkowaniu nasion. OxOx jest heksamerem, w którym mangan jest wiązany przez trzy łańcuchy boczne histydyny, jedną resztę glutaminową i dwie cząsteczki wody w kompleksie oktaedrycznym. Wykazano, że oksydaza szczawianowa ze zredukowaną formą Mn (II) nie wykazuje aktywności (postać natywna), która zostaje przywrócona w momencie utleniania centrum aktywnego do Mn (III) lub Mn (IV). Mechanizm regulujący stan redoks centrum aktywnego został zaproponowany przez Whittakera i wsp. [2007].

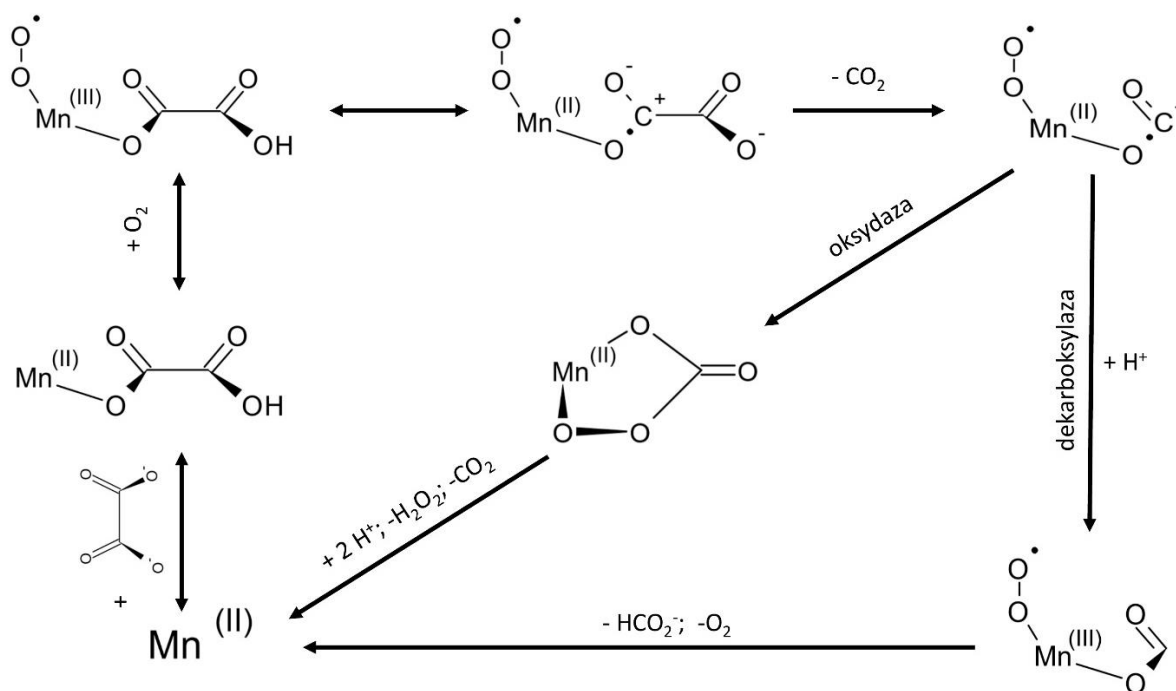


Fig. 1. Schemat cyklu katalitycznego dekarboksylazy i oksydazy kwasu szczawiowego [według: Whittaker i wsp. 2007].

Ze względu na to, że jony manganu wykazują szybką kinetykę zmiany ligandów, można je łatwo zastąpić innymi dwuwartościowymi jonami metali ( $\text{Me}^{2+}$ ), takimi jak Ca, Co, Mg, Fe, Zn i Cu [Schmidt i Husted 2019].

#### 1.4. Wpływ nadmiernego pobierania jonów manganu przez rośliny

Nawożenie manganem może poprawić zdolności adaptacyjne roślin w odpowiedzi na różne stresy oksydacyjne np. zastosowanie jonów Mn zmniejsza szkodliwe działanie innych metali w roślinach poprzez obniżenie akumulacji tych metali, spadek peroksydacji lipidów, zwiększenie ilości chlorofilu (Chl), karotenoidów oraz poprawę sprawności mechanizmów antyoksydacyjnych [Pařove-Balang i wsp. 2006; Peng i wsp. 2008; Sebastian i Prasad 2015; Gzyl-Malcher i wsp. 2019]. Rahman i wsp. [2016] wykazali, że egzogenna aplikacja jonów  $\text{Mn}^{+2}$  w siewkach ryżu hodowanych w warunkach stresu solnego ograniczyła powstawanie nowych uszkodzeń poprzez przywrócenie homeostazy jonowej i zwiększenie wydajności glioksalazy oraz systemów antyoksydacyjnych.

Egzogenna aplikacja manganu stymuluje wiele procesów w komórkach roślinnych, jednak przekroczenie optymalnego stężenia Mn w glebie może prowadzić do zwiększonego pobierania i akumulacji tego pierwiastka. Nadmierny wychwyt jonów Mn skutkuje pojawieniem się zmian zarówno morfologicznych jak i anatomicznych. W warunkach

wysokich stężeń jonów Mn obserwuje się powstawanie plam chlorotycznych i nekrotycznych w liściach. Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające tworzenie się tych zmian w tkankach roślinnych pod wpływem stresu manganowego [Fernando i Lynch, 2015]. Pierwsza hipoteza (apoplastyczna) zakłada, powstawanie uszkodzeń w tkankach w wyniku odkładania się tlenków Mn, utlenionych związków fenolowych i reaktywnych form tlenu (RFT) w ścianie komórkowej. Pojawianie się chlorozy jest spowodowane niedoborem żelaza (Fe) w warunkach nadmiaru Mn, podczas gdy pojawianie się martwicy przypisuje się akumulacji i utlenianiu tlenku manganu (IV) ( $MnO_2$ ), a także utlenionym związkom fenolowym. Druga teoria (symplastyczna) zakłada, że stres oksydacyjny, zainicjowany przez nadmiar Mn, jest odpowiedzialny za tworzenie zmian chlorotycznych, powodując zaburzenia w procesie fotosyntezy [Alejandro i wsp. 2020]. Ilość i wielkość zmian pojawiających się w wyniku zwiększonej akumulacji manganu zależy od etapu rozwoju rośliny (młody i dojrzały liść), a także jest charakterystyczne dla danego gatunku i odmiany [Kováčik i wsp. 2006]. Na młodych liściach częściej rejestruje się chlorozy, podczas gdy na dojrzałych roślinach można zaobserwować ciemne plamy martwicze oraz odkształcenia liści [Li i wsp. 2019].

Zwiększona akumulacja Mn może zakłócać funkcjonowanie białek zaangażowanych w metabolizm ściany komórkowej korzeni poprzez modyfikację jej struktury oraz lignifikację prowadząc do zahamowania wzrostu korzeni [Chen i wsp. 2016]. Ekspozycja roślin na wysokie dawki manganu powoduje nadprodukcję RFT, zarówno w wyniku reakcji Fentona, jak i poprzez transfer elektronów inicjując tym samym stres oksydacyjny [Boojar i Goodarz 2008]. Lynch i Clair [2004] wykazali, że anionorodnik ponadtlenkowy jest głównym RFT wytwarzanym w wyniku stresogennego działania jonów Mn. W takich warunkach w apoplacie może dochodzić do utleniania Mn z  $Mn^{2+}$  do  $Mn^{3+}$ , gdzie  $Mn^{3+}$  jest utleniaczem białek i lipidów [Fecht-Christofers i wsp. 2003]. Macfe i Taylor [1992] postulowali, że nadmiar Mn powoduje zmniejszenie szybkości fotosyntezy na jednostkę chlorofilu u wrażliwych odmian pszenicy. Również Wang i wsp. [2013] wykazali, że zwiększona akumulacja Mn wpływa negatywnie na szybkość fotosyntezy oraz hamuje biosyntezę chlorofilu. Dodatkowo może zmniejszyć liczbę podjednostek wiążących Rubisco, ograniczając aktywność aktywazy RuBisCO i fosforybulokinazy, które należą do ważnych enzymów w cyklu Calvina [Wang i wsp. 2013]. W odmianach wykazujących zróżnicowaną tolerancję na stres Mn, zaobserwowano zmniejszenie wydajności fotosystemu II oraz wydajności kwantowej PSII u wrażliwej odmiany w porównaniu do odmiany tolerancyjnej [Doncheva i wsp. 2009].

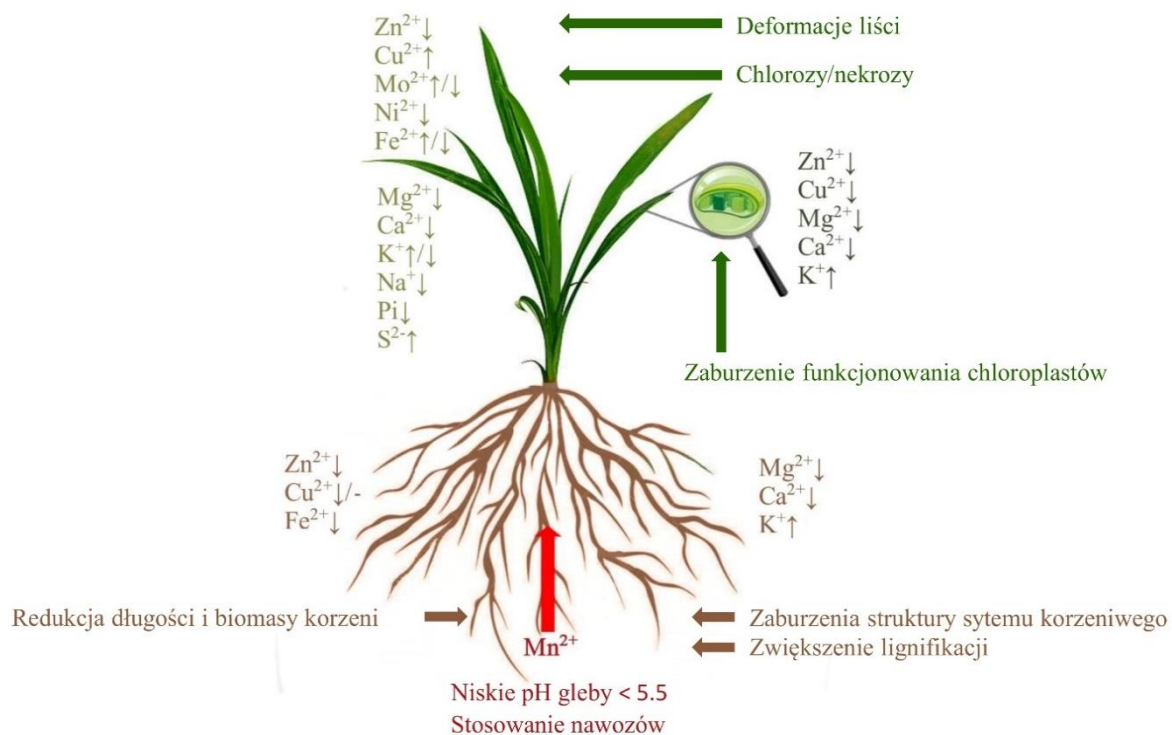


Fig. 2. Schemat zmian pobierania/ transportu mikro- i makroelementów oraz objawy morfologiczne pojawiające się w warunkach stresu Mn

Tab. 1. Objawy toksyczności manganu u roślin

Objekt badawczy	Stężenie Mn	Objawy nadmiaru Mn	Bibliografia
<b>Monocotyledones</b>			
<i>Oryza sativa</i> L.	2 mM	Redukcja długości korzenia, pędu oraz biomasy	Rajpoot i wsp. 2021
<i>Triticum vulgare</i> L.	1000 $\mu$ M	Redukcja długości korzenia, pędu	Sharma i Uttman 2016
<i>Hordeum vulgare</i> L.	1 mM	Chloroza liści	Huang i wsp. 2018
<i>Hordeum vulgare</i> L.	1830 $\mu$ M	Brązowe plamy na liściach	Demirevska-Kepova i wsp. 2004
<i>Hordeum vulgare</i> L.	50 $\mu$ M	Brązowe plamy na liściach	Fühns i wsp. 2010
<i>Hordeum vulgare</i> L.	150 $\mu$ M	Redukcja biomasy	Millaleo i wsp. 2018
<i>Lolium perenne</i> L.	150 $\mu$ M	Redukcja suchej masy i redukcja długości korzenia	Mora i wsp. 2009
<i>Lolium perenne</i> L.	355 $\mu$ M	Chloroza liści, redukcja biomasy korzeni i liści	Rosas i wsp. 2007
<i>Oryza sativa</i> L.	50 $\mu$ M	Brązowe plamy na liściach	Fühns i wsp. 2010
<b>Dicotyledones</b>			
<i>Brassica napus</i> L.	200 $\mu$ M	Chlorozy i nekrozy liści	Moroni i wsp. 2003
<i>Brassica juncea</i> L.	9 mM	Redukcja długości korzenia i powierzchni liści	Fariduddin i wsp. 2015
<i>Brassica juncea</i> L.	9 mM	Redukcja długości korzenia i powierzchni liści	Parashar i wsp. 2014
<i>Vicia faba</i> L.	160 $\mu$ M	Redukcja długości korzenia i pędu	Arya i Roy 2011
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	100 $\mu$ M	Nekrozy i chlorozy liści	Fernando i Lynch 2015
<i>Glycine max</i> L.	200 $\mu$ M	Morfologiczne zmiany korzenia	Chen i wsp. 2016
<i>Glycine max</i> L.	200 $\mu$ M	Anatomiczne zmiany liści	Lavres i wsp. 2009
<i>Glycine max</i> L.	300 $\mu$ M	Redukcja suchej masy pędu i korzenia	Santos i wsp. 2017
<i>Stylosanthes guianensis</i> (Aubl.) Sw.	400 $\mu$ M	Chlorozy i nekrozy liści	Chen i wsp. 2015
<i>Stylosanthes guianensis</i> (Aubl.)	400 $\mu$ M	Redukcja suchej masy pędu i korzenia	Liu i wsp. 2019

### 1.5. Przyczyny i implikacje stresu oksydacyjnego

Gwałtowne zmiany klimatyczne w znacznej mierze przyczyniają się do obniżenia ilości oraz jakości zebranych plonów. Wykazano, że w roślinach eksponowanych na stres abiotyczny (działanie suszy, niskich i wysokich temperatur, szczególnie w połączeniu z dużym natężeniem promieni słonecznych, narażonych na zanieczyszczenia powietrza m.in. ozonu i dwutlenku siarki, herbicydów oraz na promieniowanie ultrafioletowe) dochodzi do nadprodukcji RFT w konsekwencji prowadząc do zapoczątkowania stresu oksydacyjnego [Inze i Van Montagu 1995]. Stres oksydacyjny można zdefiniować jako zaburzenie równowagi (homeostazy) pomiędzy reakcjami redoks, w czasie których dochodzi do zwiększonej produkcji RFT. Powstające reaktywne formy tlenu jako produkt uboczny reakcji metabolicznych są na bieżąco dezaktywowane przez enzymy odpowiedzialne za prawidłowe utrzymanie homeostazy komórkowej. W momencie, gdy równowaga redoks zostaje zachwiana obecne w organizmie RFT mogą wchodzić w interakcje z metalami przejściowymi lub innymi składnikami cyklu redoks, tworząc wysoce reaktywne formy tlenu, które mogą prowadzić do uszkodzenia błony komórkowej, białek, lipidów, DNA i organelli komórkowych [Jones i Sies. 2007]. Przyczyny powodujące stres oksydacyjny to głównie:

- i) brak równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a jego detoksyfikacją w wyniku zaburzenia homeostazy;
- ii) biosynteza *de novo* RFT jako cząsteczek sygnałowych stresu [Demidchik 2015].

Do pierwszych reakcji zachodzących w odpowiedzi na stesy abiotyczne u roślin należą dysfunkcja i zahamowanie syntezy białek [Timperio i wsp. 2008; Cramer i wsp. 2011]. Białka pełnią w komórce funkcje strukturalne, katalityczne oraz regulacyjne i są składnikami szczególnie podatnymi na utlenianie. Przy zaburzonej homeostazie redoks w komórce może znajdować nawet 68 % utlenionych cząsteczek białek, które mogą być wykorzystywane jako marker diagnostyczny określający intensywność stresu oksydacyjnego [Rinalducci i wsp. 2008]. Modyfikacje białek mogą prowadzić do tworzenia się agregatów białkowych oraz do rozerwania łańcucha polipeptydowego. Natomiast utlenianie reszt tiolowych i tworzenie pochodnych karbonylowych mają szczególne znaczenie w ocenach ekotoksykologicznych [Braconi i wsp. 2011].

Nadprodukcja RFT powoduje utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych a w zależności od rodzaju lipidów i utleniaczy oraz nasilenia reakcji utleniania powstają

różne produkty peroksydacji lipidów [Sharma i wsp. 2012, Hameed i wsp. 2013]. Głównymi produktami tych reakcji są ugrupowania zawierające hydroksyle, hydroperoksyle, aldehydy, ketony, kwasy karboksylowe i podwójne wiązania trans [Borchman i Sinha 2002].

Ze względu na niestabilny charakter liponadtlenków, w wyniku ich rozkładu, powstają reaktywne związki karbonylowe, w tym aldehydy, takie jak dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenal lub hydroksynonenal (4-HNE). Związki te powodują dalsze uszkodzenia w komórkach poprzez wiązanie wolnych grup aminowych aminokwasów białek [Sochor i wsp. 2012]. Zaburzają właściwości fizyczne błon komórkowych doprowadzając do zwiększenia ich przepuszczalności dla substancji polarnych oraz jonów wodorowych [Karsznicka i Grzesik 2004]. Peroksydacja lipidów może prowadzić również do zmniejszenia aktywności białek transportujących oraz enzymów membranowych, w wyniku czego może dojść do utraty integralności błon komórkowych [Stewart i Bewley 1980]. Ze względu na dynamiczną naturę błony komórkowej roślin i wrażliwość jej składu/struktury lipidowego/ów na bodźce pochodzące ze środowiska zewnętrznego, zmiany zachodzące w lipidach błonowych działają jak markery stresu i pomagają roślinie przystosowywać się do potencjalnego działania stresu abiotycznego [Barklaand i Pantoja 2011; Furt i in. 2011; Murphy i in. 2010].

Ogólny mechanizm utleniania lipidów spowodowany przez RFT polega na:

- i) inicjacji (aktywacji), czyli powstawaniu wolnych rodników;
- ii) propagacji (dystrybucji), tj. reakcjach łańcuchowych wolnych rodników;
- iii) zakończeniu (rozszczepieniu), tj. tworzeniu produktów nierodnikowych.

Składniki kwasów nukleinowych - reszty pirymidynowe, purynowe i guanina oraz reszty aminokwasowe białek m.in. histydyna, metionina i cysteina są wyjątkowo podatne na uszkodzenia przez tlen w stanie wzbudzonym [Bartosz 2003]. Reakcje z rodnikiem hydroksylowym lub tlenem singletowym mogą prowadzić do uszkodzenia kwasów nukleinowych poprzez modyfikacje reszt cukrowych, zasad nukleinowych, a także do rozerwania wiązań fosfodiesterowych, prowadząc tym samym do rozerwania nici kwasów nukleinowych [Karsznicka i Grzesik 2004].

### *1.5.1. Reaktywne formy tlenu (RFT)*

Reaktywne formy tlenu (RFT) są terminem zbiorowym obejmującym rodniki tlenowe, takie jak rodniki ponadtlenkowe ( $O_2^{\cdot-}$ ), rodniki hydroksylowe ( $OH^{\cdot}$ ), tlen singletowy ( $^1O_2$ ) oraz niektóre nierodnikowe związki/ cząsteczki utleniające m.in. nadtlenuk

wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kwas chlorowy (I) ( $\text{HOCl}$ ) i ozon, które łatwo można przekształcić w rodniki [Gutteridge i Halliwell 1989]. RTF produkowane w czasie reakcji metabolicznych są wykorzystywane w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, transdukcji sygnału oraz ekspresji genów [Bayr 2005].

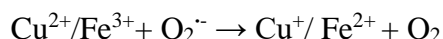
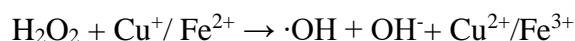
Tlen singletowy powstaje w wyniku wzbudzenia cząsteczki tlenu poprzez dostarczenie odpowiedniej ilości energii, czyli zaabsorbowaniu kwantu o wyższej energii lub promieniowania nadfioletowego, a także w niektórych reakcjach chemicznych. Taka wzbudzona cząsteczka może reagować z innymi cząsteczkami na dwa sposoby:

- i) wchodzi w reakcję chemiczną;
- ii) przekazuje energię wzbudzenia innym cząsteczkom przechodząc w podstawową formę (tlen trypletowy).

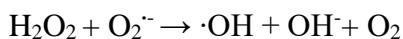
Anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^-$ ), jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu, jest dosyć silnym utleniaczem, który jest redukowany do nadtlenu wodoru, a także może działać jako reduktor i przekształcać się w tlen [Dröge 2002]. Jest to stosunkowo niestabilna cząsteczka, której okres półtrwania wynosi milisekundy. Anionorodnik ponadtlenkowy może przenikać przez błony komórkowe, jednakże ze względu na ładunek elektryczny, na czas transportu ulega protonacji do rodnika wodoronadtlenkowego, a następnie dysocjuje ponownie do anionorodnika ponadtlenkowego [Hampton i Kettle 1998].

Nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), jest produktem reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego katalizowanego przez dysmutazę ponadtlenkową lub podczas dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Ze względu na łatwą dyfuzję może docierać do wielu biomolekuł oraz utleniać grupy tiolowe białek. Razem z rodnikami ponadtlenkowymi może być substratem w reakcjach Fentona lub Habera-Weissa, tworząc wysoce reaktywne rodniki hydroksylowe.

#### Reakcja Fentona:



#### Reakcja Habera- Weissa





Rodnik hydroksylový jest najbardziej reaktywną z form tlenu i powstaje w wyniku reakcji Fentona i Habera- Weissa z nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego lub w wyniku przyłączenia trzech elektronów do cząsteczki tlenu. Ten rodnik nie posiada zdolności do przedostawania się przez błony komórkowe [Bogdan i wsp. 2000]. Może brać udział w inicjacji peroksydacji lipidów przyczyniając się do dezaktywacji biomolekuł, takich jak DNA lub białka [Arora i wsp. 2002; Gill i Tuteja 2010].

## 1.6. Zaburzenia osmoregulacji w komórkach

### 1.6.1. Stres osmotyczny

W organizmach żywych woda stanowi ośrodek do zachodzenia wszystkich procesów biochemicznych i utrzymanie optymalnego turgoru (ciśnienie osmotyczne komórek) warunkuje odpowiedni przebieg tych procesów. Wegetatywny wzrost roślin może nastąpić tylko przy określonej zawartości wody w komórkach i tą ilość można określić jako energia swobodna przypadająca na każdy mol wody – potencjał wodny ( $\psi_w$ ). W danej komórce  $\psi_w$  składa się głównie z ciśnienia i potencjału osmotycznego. Utrzymując dodatnie ciśnienie turgorowe, komórki roślinne zwykle dostosowują swój potencjał osmotyczny do wymagań całej rośliny prowadząc do wyrównania jej bilansu wodnego. Znaczące zmiany potencjałów wodnych w środowisku mogą wywołać stres osmotyczny u roślin, co zaburza normalną aktywność komórkową, a nawet w skrajnych przypadkach może powodować śmierć komórki. Jak do tej pory stres osmotyczny był opisywany głównie w przypadku suszy lub związany z wysokim zasoleniem. Jednak również stres wywołany m.in. metalami, może powodować zaburzenia bilansu wodnego w komórkach roślinnych [Ghori i wsp. 2019].

Po ekspozycji na stres osmotyczny rośliny wykazują szeroki zakres odpowiedzi na poziomie molekularnym, komórkowym jak i tkankowym [Yeo 1998]. Należą do nich m.in. zmiany morfologiczne i rozwojowe (np. zahamowanie wzrostu pędów i wzmocnienie wzrostu korzeni), zaburzenia transportu mikro- i makroelementów (takie jak pobieranie i sekwestracja jonów) oraz przemiany metaboliczne (np. metabolizm węgla, synteza kompatybilnych substancji rozpuszczonych). Niektóre z tych odpowiedzi mogą być wywołane przez pierwotne sygnały stresu osmotycznego, podczas gdy inne mogą wynikać ze stresu wtórnego. Rośliny poddane stresowi osmotycznemu gromadzą organiczne osmolity, w tym L-prolinę (Pro), walinę, izoleucynę, ektoinę, kwas asparaginowy, betainę, glukozę, fruktozę, sacharozę w cytoplazmie komórek [Parida i Das 2005]. Osmolity organiczne na ogół gromadzą się w roślinach w wyniku zwiększenia ich syntezy. Pomimo

ich podwyższonego stężenia nie są toksyczne, natomiast zapobiegają wypływowi wody z komórki przez obniżenie jej potencjału.

Skrobia jest ważną cząsteczką pośredniczącą w reakcjach roślin na stresy abiotyczne, takie jak deficyt wody, wysokie zasolenie lub ekstremalne temperatury. W takich warunkach środowiskowych rośliny na ogół gromadzą skrobię, aby zapewnić energię w sytuacjach, gdy fotosynteza może być ograniczona. Degradacja skrobi w odpowiedzi na stres często była skorelowana z poprawą tolerancji stresu. González-Cruz i Pastenes [2012] stwierdzili, że odporna na suszę odmiana fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) rozkładała więcej skrobi niż odmiana wrażliwa na suszę. Podobnie Cuellar-Ortiz i wsp. [2008] wykazali zwiększoną akumulację węglowodanów tylko w strąkach odmiany fasoli odpornej na suszę (*Phaseolus vulgaris* L.). Uwolnione cukry i inne pochodne wspomagają wzrost roślin pod wpływem stresu, działają jako osmoprotektanty i kompatybilne substancje rozpuszczone [Krasensky i Jonak 2012]. Cukry mogą również działać jako cząsteczki sygnalizacyjne, które krzyżują się ze szlakiem sygnalizacyjnym zależnym od kwasu abscysynowego (ABA) i aktywują kolejne etapy reakcji odpornościowych [Rook i wsp. 2006]. Jednak akumulacja i degradacja skrobi są zależne od czynnika stresowego, gatunku rośliny oraz rodzaju tkanki. U roślin łąbinu białego (*Lupinus albus* L.) poddanych stresowi suszy, poziom cukrów rozpuszczalnych obniżył się w blaszce liściowej, w przeciwieństwie do ogonków liściowych [Pinheiro i wsp. 2001]. U trzciny pospolitej (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud) zawartość skrobi wzrosła we wszystkich tkankach wegetatywnych, ale u podstawy pędu była ponad dwukrotnie wyższa niż w jego górnej części [Kanai i wsp. 2007]. Oprócz rozkładu skrobi akumulacja cukrów może pochodzić z fotosyntetycznej asymilacji węgla z powodu zmniejszonego zapotrzebowania, będącego konsekwencją ograniczenia wzrostu.

L-Prolina (Pro) jest endogennym, niepolarnym aminokwasem i gromadzi się w roślinach podczas niekorzystnych warunków środowiskowych oraz odgrywa ważną rolę w tolerancji roślin na stres. Oprócz funkcji osmolitu, prolina jest chelatorem metali, cząsteczką antyoksydacyjną i sygnalizatorem stresu. Podnosi tolerancję na stres poprzez wzmacnianie funkcji mitochondriów, wpływa na proliferację komórek, aktywuje specyficzną ekspresję genów, wpływa na równowagę błon, zapobiegając wyciekowi elektrolitów i neutralizuje nadmiar RFT, co prowadzi do przywrócenia równowagi w komórce [Kaur i Asthir 2015]. Zdolność roślin do produkcji proliny jest warunkowana genetycznie i skorelowana z tolerancją na suszę i zasolenie [Georgieva i wsp. 2004; Chaitanya i wsp. 2009; Mafakheri i wsp. 2010; Morales i wsp. 2013].

W roślinach L-prolina wytwarzana jest głównie drogą przemian z glutaminy, gdzie glutamina jest redukowana do  $\gamma$ -semialdehydu glutaminowego (GSA) przez enzym syntetazę  $\Delta^1$ -pirolino-5-karboksylianową (P5CS) i przekształcana do pirolino-5-karboksylianu (P5C), który następnie przekształca się w L-prolinę za pomocą reduktazy  $\Delta^1$ -pirolino-5-karboksylianowej (P5CR) [Fichman i wsp. 2015]. Drugi sposób syntezy proliny następuje poprzez transformację ornityny i może przebiegać na dwa sposoby, gdzie pierwszy polega na transaminacji grupy  $\alpha$ -aminowej z ornityny w obecności aminotransferazy ornityny ( $\alpha$ -OAT) do kwasu  $\alpha$ -okso- $\delta$ -aminowaleriany, a następnie spontanicznej cyklizacji do pirolino-2-karboksylianu (P2C), który po reakcji z dodatkiem reduktazy  $\Delta^1$ -pirolino-2-karboksylianowej (P2CR) przekształca się w L-prolinę. Alternatywnym sposobem jest transaminacja grupy  $\delta$ -aminowej przy udziale  $\delta$ -aminotransferazy ornityny ( $\delta$ -OAT), która przekształca ornitynę w GSA [Fichman i wsp. 2015].

Zwiększona biosynteza proliny w chloroplastach może przyczynić się do stabilizacji równowagi redoks i utrzymania homeostazy komórkowej poprzez rozproszenie zwiększonego potencjału redukującego w łańcuchu transportu elektronów [Taiz i Zeiger 2010]. Natomiast degradacja Pro jest katalizowana przez kolejne działanie dwóch enzymów mitochondrialnych, dehydrogenazy proliny (PHD) i dehydrogenazy  $\Delta^1$ -pirolino-5-karboksylianowej (P5CDH). PHD wiąże się z wewnętrzną błoną mitochondrialną z miejscem aktywnym skierowanym do macierzy, podczas gdy P5CDH znajduje się w macierzy mitochondrialnej [Deuschle i wsp. 2004].

### 1.7. Mechanizm ochrony komórek przed działaniem reaktywnych form tlenu

Uważa się, że działanie pochodnych tlenu jest jednym z najstarszych stresów, które pojawiły się na Ziemi [Dowling i Simmons 2009]. Już od co najmniej 2,7 miliarda lat, czyli odkąd rośliny zaczęły produkować tlen z wody i dwutlenku węgla, przystosowały się do panujących warunków wykorzystując biosyntezę RFT. Te cząsteczki w niskich stężeniach mogą działać jako cząsteczki sygnałowe w regulacji wielu procesów fizjologicznych m.in. wzrostu, reakcji odpornościowych, sygnalizacji śmierci komórki [Demidchik i wsp. 2003, 2010; Foreman i wsp. 2003]. Aby przeciwdziałać podwyższonym koncentracjom RFT, rośliny wykształciły mechanizmy, które zapobiegają skutkom ich toksycznego działania. Systemy neutralizacji RFT są funkcjonalnie podzielone na dwie grupy: nieenzymatyczne oraz enzymatyczne, które są zlokalizowane w większości organelli komórkowych [Gill i Tuteja, 2010].

### 1.7.1. Enzymy antyoksydacyjne

#### 1.7.1.1. Dysmutazy ponadtlenkowe

Rodzina dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) została pierwotnie opisana w 1969 roku przez McCorda i Fridovicha [1969]. SOD to metaloproteiny, składające się z części białkowej (apoenzymu) oraz kofaktora będącego jonem metali takich jak: Cu, Zn, Mn lub Fe, występują w chloroplastach, mitochondriach, cytosolu, peroksysomach i apoplacie [Mittler, 2002].

Spośród enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy ponadtlenkowe jako jedyne potrafią efektywnie katalizować reakcję neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot -}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu cząsteczkowego. Reakcja ta przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap polega na uwolnieniu cząsteczki tlenu przy jednoczesnej redukcji jonu metalu. Natomiast drugi etap polega na ponownym utlenieniu jonu metalu w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym i jonami wodorowymi, gdzie produktem tej reakcji jest nadtlenek wodoru [Culotta i wsp. 2006].

W roślinach można wyodrębnić trzy wewnątrzkomórkowe izoformy SOD: dysmutazę miedziowo-cynkową (Cu/ Zn-SOD), manganową (Mn-SOD) i żelazową (Fe-SOD) oraz zewnątrzkomórkową postać EC-SOD [Alscher i wsp. 2002].

Mn-SOD jest tetramerem o masie 89 kD, występuje w mitochondriach i peroksysomach, jest kodowana przez genom jądrowy oraz wytwarzana w postaci białka prekursorowego. W wyniku działania związków generujących anionorodnik ponadtlenkowy, a także szoku osmotycznego możemy obserwować zwiększoną aktywność Mn-SOD [Czarna i Jamuszkiewicz 2006].

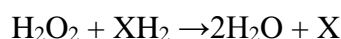
Cu/ Zn-SOD jest to enzym, który występuje w postaci dimerycznej o masie 32 kD, gdzie każda podjednostka zawiera 151 reszt aminokwasowych. Ten enzym jest obecny głównie w cytozolu, mitochondriach i plastydach. Charakteryzuje się dużą odpornością chemiczną i fizyczną na denaturację, nie tracąc swojej odporności nawet w temperaturze ok. 80 °C [Brouwer i wsp. 2003].

EC-SOD jest tetrameryczną glikoproteiną o masie 135 kDa, która jest w 60 % homologiczna do miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej i podobnie jak ona zawiera jeden atom Cu i jeden Zn na podjednostkę [Gao i wsp. 2008].

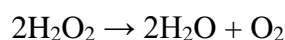
Fe-SOD to dimer o masie cząsteczkowej 20 kD zbudowany z dwóch jednakowych podjednostek. Znajduje się w chloroplastach, cytosolu, mitochondriach i peroksysomach [Inze' i Van Montagu 1995].

### 1.7.1.2. Katalazy

Katalaza to enzym należący do grupy hydroperoksydaz, który zawiera żelazoporfirynę – połączenie Fe (III) z porfiryną tworząc kompleks tzw. hem [Gasyna 1975]. Enzym ten występuje głównie w peroksysomach i jest odpowiedzialny za rozkład nadtlenu wodoru do tlenu i wody. Wykazuje podwójną aktywność peroksydazową i katalazową [Ścibior i Czeczot 2006]. Przy niewielkich ilościach nadtlenu wodoru dominuje aktywność peroksydazowa katalazy, powodując utlenianie azotanów (III), mrówczanu, etanolu, chinonów, metanolu itp. W reakcji tej wymienione wcześniej związki są donorami wodoru (XH<sub>2</sub>) doprowadzając do redukcji nadtlenu wodoru. Reakcja ta przebiega zgodnie z poniższym schematem:



Natomiast przy wysokim stężeniu przeważa aktywność katalazowa enzymu, gdzie nadtlenek wodoru jest rozkładany do tlenu i wody [Zámocký i wsp. 2012]:

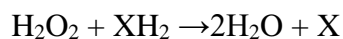


Reakcja rozkładu nadtlenu wodoru katalizowana przez katalazę zachodzi szybko, w ciągu jednej minuty enzym ten może rozłożyć około 6 milionów cząsteczek nadtlenu wodoru [Ścibior i Czeczot, 2006]. Możemy wyróżnić trzy rodzaje katalaz:

- i) jednofunkcyjne, typowe- to tetrametry, zbudowane z około 390 aminokwasów o masie cząsteczkowej mieszczącej się w przedziale od 140 do 340 kDa, biorące udział tylko w reakcji dysproporcjonowania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- ii) katalazy dwufunkcyjne, katalazo-peroksydazy - są złożone z jednej do 6 podjednostek i zbudowane z około 700 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej od 120 - 340 kDa. Enzymy te wykazują aktywność peroksydazową i katalazową [Chelikani i wsp. 2004];
- iii) pseudokatalazy - w swojej budowie zawierają połączenie dwóch atomów Mn<sup>+2</sup>-Mn<sup>+2</sup> zamiast atomów Fe<sup>+3</sup>. Składają się z dwóch podjednostek o heksamerycznej budowie i masie cząsteczkowej od 170 do 210 kDa [Zámocký i Koller 1999].

### 1.7.1.3. Peroksydazy

Peroksydazy to grupa enzymów należąca do klasy oksydoreduktaz, które katalizują reakcję rozkładu nadtlenu wodoru. Mechanizm działania peroksydaz można przedstawić równaniem, gdzie w reakcji  $XH_2$  jest donorem wodoru doprowadzając tym samym do redukcji nadtlenu wodoru [Veitch 2004]:



Większość peroksydaz ma podobną budowę, gdzie część niebiałkową (grupę prostetyczną) stanowi hem, który jest luźno związany z częścią białkową (apoenzymem). Ich masy cząsteczkowe mieszczą się w zakresie 32 - 100 kDa.

Jedną z peroksydaz występujących w komórkach roślinnych jest peroksydaza glutationowa (GPX), która jest selenoenzymem i katalizuje reakcję redukcji nadtlenu wodoru oraz nadtlenców organicznych przez zredukowany glutation [Wu i wsp. 2004]. Występuje najczęściej w cytosolu, ale również znajduje się w jądrze komórkowym i w mitochondrium [Ursini i wsp. 1982]. W reakcjach katalizowanych przez ten enzym zachodzi stopniowa redukcja selenu (z +4 do -2) w centrum aktywnym. Do takiej reakcji niezbędne są cztery cząsteczki zredukowanego glutationu. Dopiero taka forma peroksydazy jest zdolna do redukcji nadtlenców.

Kolejną peroksydazą występującą w komórkach roślinnych jest peroksydaza askorbinianowa (APX), która jest zaliczana do hemoprotein zawierających cztery cysteiny, a te z kolei są odpowiedzialne za wrażliwość enzymu na związki dezaktywujące grupy tiolowe [Gest i wsp. 2013]. Peroksydazy askorbinianowe możemy podzielić na dwa rodzaje chloroplastową i cytozolową.

W roślinach peroksydazy pełnią ważną funkcję w regulowaniu procesów wzrostu i rozwoju. Biorą udział w kiełkowaniu nasion, dojrzewaniu owoców, procesie starzenia i opadania liści oraz w procesie zablizniania uszkodzeń [Mohan i wsp. 1993].

### 1.7.2. Antyoksydanty

Antyoksydantami nazywamy związki chemiczne, które chronią komórki przed uszkodzeniami powodowanymi przez wolne rodniki. Można je podzielić na trzy grupy na podstawie ich mechanizmu działania:

- i) antyoksydanty pierwotne, które działają jako zmiatacze wolnych rodników;

- ii) antyoksydanty wtórne, które są przeciwutleniaczami zapobiegawczymi i działają poprzez opóźnianie reakcji rodnikowej;
- iii) trzeciorzędowe przeciwutleniacze, które zajmują się naprawą uszkodzonych biomolekuł [Daramola i Adegok 2011].

#### 1.7.2.1. Kwas askorbinowy

Kwas L-askorbinowy (witamina C, AsA) jest ważnym substratem do detoksykacji reaktywnych form tlenu w roślinach narażonych na czynniki stresowe [Qian i wsp. 2014]. AsA to  $\gamma$ -laktone kwasu -dehydro-L-gulonowego wykazujący silne właściwości redukujące, wynikające z posiadania przy węglach 2 i 3 wiązań endiolowych [Janda i wsp. 2015]. AsA w komórkach roślinnych występuje w mitochondriach, chloroplastach, cytozolu i wakuoli, natomiast jest syntezowana w cytozolu z wyłączeniem ostatniego etapu, który zachodzi w mitochondriach [Smirnoff 2000]. Kwas askorbinowy reagując z RFT utlenia się do monodehydroaskorbinianu, a kolejno do dehydroaskorbinianu [Foyer i Noctor 2011]. Przy udziale glutationu lub przez enzymy cyklu askorbinianowo-glutationowego: peroksydazę askorbinianową (APX), reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDHAR), reduktazę dehydroaskorbinianową zależną od glutationu (DHAR) i reduktazę glutationową (GR) następuje redukcja kwasu dehydroaskorbinowego ponownie do kwasu askorbionowego [Konopacka 2004]. Cykl ten eliminuje  $H_2O_2$  poprzez sekwencyjne przenoszenie elektronów bez zużywania askorbinianu lub GSH [Foyer i Noctor 2011]. Wzrost redukcji puli askorbinianowej u roślin z nadekspresją GR koresponduje z efektywnym sprzężaniem reakcji szlaku askorbinian-glutation [Le Martret i wsp. 2011]. W liściach około 70-80% enzymów wychwytyjących  $H_2O_2$  zależnych od AsA znajduje się w chloroplastach. APX posiada wiele izoform, które znajdują się w zrębie chloroplastów, związanych z tylakoidami chloroplastowymi (w pobliżu PSI) [Miyake i Asada 1992], cytozolem, mitochondriami i peroksysomami. Ponadto AsA może działać jako alternatywny donator elektronów fotosystemu II, a tym samym pobudzać transport elektronów, gdy kompleksy wydzielające tlen są inaktywowane [Ariizumi i wsp. 2009].

AsA odgrywa również ważną rolę we wzroście komórek i sygnalizacji komórkowej. Kerchev i wsp. [2011] wykazał, że rośliny *A. thaliana* z niedoborem syntezy AsA (*vtc1*) wykazywały podwyższony poziom kwasu abscysynowego (ABA), który prowadzi do zahamowania wzrostu roślin. Deficyt wody w liściach wpływa na podwyższenie ilości ABA, powodując akumulację nadtlenu wodoru i zamykanie aparatów szparkowych [Zhang i wsp.

2001]. W tym procesie stężenie AsA i jego status redoks są istotne do uzyskania takiej koncentracji  $H_2O_2$ , aby doszło do ruchu aparatów szparkowych [Chen i Gallie 2004]. Ponadto jako kofaktor enzymów hydroksylaz prolinowych, które katalizują tworzenie glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę, AsA wpływa na skład ściany komórkowej i jej właściwości mechaniczne [De Tullio i wsp. 1999]. Bierze również udział w szlakach biosyntezy dioksygenaz, odpowiedzialnych za biosyntezę flawonoidów i alkaloidów.

#### 1.7.2.2. *Glutation*

Glutation (GSH) jest tripeptydem ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glicyna;  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), który występuje w cytozolu, retikulum endoplazmatycznym, wakuolach, mitochondriach, chloroplastach, peroksosomach i apoplazmie [Noctor i Foyer 2005]. Synteza GSH zachodzi w cytozolu, gdzie następnie może być importowany do innych organelli. W strukturze GSH występuje wiązanie między grupą karboksylową łańcucha bocznego glutaminianu (Glu) a grupą aminową cysteiny (Cys), która jest połączona z glicyną (Gly) wiązaniem peptydowym. Cechą charakterystyczną GSH jest jego wysokie stężenie w stosunku do innych tioli komórkowych. I to właśnie grupa tiolowa tego związku, ze względu na swoją reaktywność chemiczną, pełni główną funkcję biologiczną i biochemiczną [Zagorchev i wsp. 2013]. Glutation jest silnym przeciwutleniaczem i jako donor elektronu wchodzi w reakcje z RFT takimi jak rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru tworząc addukt glutationylowy (disulfid glutationu, GSSG). GSSG następnie jest redukowany przy udziale reduktazy glutationowej w obecności NADPH jako koenzymu [Zabłocka i Janusz 2008]. Oprócz utrzymania komórkowej równowagi redoks pełni funkcje sygnalizacyjne w roślinach. Działa jako kofaktor w układzie glioksalazy i pomaga w detoksykacji metyloglioksalu, uznawanego za wskaźnik stresu oksydacyjnego. Dodatkowo glutation reguluje wiele funkcji metabolicznych m.in. zapobiega denaturacji oksydacyjnej białek w warunkach stresowych poprzez ochronę ich grup tiolowych oraz służy jako substrat zarówno dla peroksydazy glutationowej, jak i S-transferazy glutationowej [Hasanuzzaman i wsp. 2017]. Działając jako prekursor fitochelatyn, GSH pomaga w chelatowaniu toksycznych metali/metaloidów, które są następnie transportowane i sekwestrowane w wakuoli [Sharma and Dietz 2006].



### 1.7.2.3. Kwas salicylowy

Kwas salicylowy (SA), czyli kwas o-hydroksybenzoesowy, należy do grupy fenoli roślinnych, zwykle definiowanych jako substancje, które posiadają aromatyczny pierścień z obecną grupą hydroksylową lub jego funkcjonalną pochodną. Jako naturalny hormon SA bierze udział w wielu procesach fizjologiczno- biochemicznych tj. regulacja wzrostu, kiełkowanie, glikoliza, kwitnienie, pobieranie i transport jonów, transpiracja a także regulacja syntezy enzymów przeciwutleniających w warunkach stresu oksydacyjnego [Vlot i wsp. 2009]. W roślinach występuje głównie w postaci wolnej (najbardziej aktywnej), lub w formie sprzężonej tworząc estry takie jak m.in. salicylan metylu, który ma działanie stymulujące lub inhibicyjne w procesach metabolicznych i fizjologicznych roślin.

Egzogenne zastosowanie fitohormonów, takich jak kwas salicylowy (SA), może zwiększyć tolerancję roślin i przeciwdziałać toksycznym działaniom metali ciężkich na kiełkowanie oraz wzrost i rozwój roślin [Khokon i wsp. 2011]. Suplementacja SA reguluje działanie systemów antyoksydacyjnych, poprawia żywotność roślin oraz powoduje obniżenie uszkodzeń oksydacyjnych przy stresie wywołanym ołowiem u *Brassica campestris* L. [Hasanuzzaman i wsp. 2019]. Song i wsp. [2014] wykazali, że za pośrednictwem SA następuje wzmocnienie aktywności enzymów CAT i SOD w liściach jęczmienia narażonych na stres oksydacyjny wywołany wysokimi stężeniami jonów Zn, Cu i Mn. Z kolei, Chao i wsp. [2010] postulowali, że SA może wspomagać neutralizację RFT poprzez regulację enzymów antyoksydacyjnych oraz przez ekspresję niektórych białek, odpowiedzialnych za obniżenie RFT w ryżu pod wpływem działania stresu metali ciężkich.

### 1.7.2.4. Polifenole

Polifenole (PF) są związkami organicznymi z grupy fenoli biorącymi udział w wielu przemianach metabolicznych i fizjologicznych u roślin [Lattanzio i wsp. 2012]. Są zaangażowane w procesy związane ze wzrostem i rozwojem roślin, w podziały komórkowe oraz w reakcje syntezy pigmentów fotosyntetycznych [Tanase i wsp. 2019]. PF są biosyntetyzowane przez szlak szikimowo - fenylopropanoidowy, który wytwarza zarówno monomeryczne i polimerowe fenole [Sharma i wsp. 2019]. Struktura związków fenolowych jest bardzo zróżnicowana, natomiast ich wspólną cechą jest obecność jednego lub więcej podstawników hydroksylowych, umiejscowionych bezpośrednio do jednego lub wielu pierścieni aromatycznych [Šamec i wsp. 2021]. Związki fenolowe mogą występować w roślinach w wolnej postaci, ale częściej znajdują się w postaciach sprzężonych z jedną lub

kilkoma resztami cukrowymi połączonymi wiązaniami  $\beta$ -glikozydowymi z grupą hydroksylową (O-glikozydy) lub z atomem węgla w pierścieniu aromatycznym (C-glikozydy). Związki polifenolowe są uważane za grupę cząsteczek należących do wtórnych metabolitów roślinnych wykazujących aktywność biologiczną, przedstawianą w badaniach w postaci całkowitej puli polifenoli. W roślinach eksponowanych na warunki stresowe obserwuje się wzmożoną biosyntezę tych związków, zwiększając tym samym tolerancję i ich zdolności adaptacyjne [Sharma i wsp. 2019]. Jednak biologiczna rola polifenoli w roślinach hodowanych *in vitro* w warunkach imitujących stresy środowiskowe, zależy od warunków eksperymentalnych, takich jak czas ekspozycji, gatunek i odmiana rośliny, stadium wzrostu roślin i metoda analizy metabolitów.

### 1.8. Mikro- makroelementy niezbędne dla roślin

Rozwój roślin jest w dużym stopniu determinowany przez dostępność w podłożu mikro- oraz makroelementów, dlatego, w celu zapewnienia lepszej produktywności roślin uprawnych, konieczne jest zrozumienie dynamiki pobierania, transportu, asymilacji i biologicznych interakcji pomiędzy tymi składnikami [Wawrzyńska i Sirko, 2014]. Indukcja przejścia ze stadium wegetatywnego do generatywnego roślin również zależy od odpowiedniej ilości niezbędnych składników odżywczych, dlatego stosowanie syntetycznych nawozów stało się jednym z priorytetowych działań zapewniających zwiększone plonowanie roślin i jest uważane za jeden z ważnych filarów zielonej rewolucji w latach 60 XX wieku [Kumar, 2013].

Mikroelementy, takie jak cynk (Zn) i żelazo (Fe), odgrywają ważną rolę w fizjologicznych procesach roślin m.in. w syntezie chlorofilu, a także w utrzymaniu struktury i funkcji chloroplastu. Cynk jest niezbędnym mikroelementem, który wpływa na aktywność takich enzymów jak hydrogenaza i anhidraza węglanowa oraz reguluje stabilizację frakcji rybosomalnych i syntezę cytochromu. Bierze również udział w metabolizmie węglowodanów, syntezie białek, utrzymaniu integralności błony komórkowej oraz regulacji ekspresji genów wpływających na tolerancję roślin w warunkach stresowych [Hafeez i wsp. 2013].

Żelazo aktywuje szlaki metaboliczne, takie jak synteza DNA, oddychanie komórkowe i fotosynteza. Wchodzi w skład grup prostetycznych wielu enzymów, m.in. oksydazy cytochromu c łańcucha transportu elektronów, ferredoksyny, dysmutazy ponadtlenkowej, ferrochelatazy, fitoferrytyny [Balk i Schaedler 2014]. Uczestniczy

w syntezie chlorofilu i posiada duże znaczenie dla utrzymania struktury i funkcji chloroplastów [Rout i Sahoo 2015]. Dostępność żelaza jest również istotnym elementem regulującym metabolizm molibdenu u roślin [Bittner 2014]. Zdolność Mo do procesów wymiany elektronów, jest wykorzystywana przez enzymy do katalizowania reakcji redoks i jest kontrolowana zarówno przez różne ligandy w atomie Mo, jak i w środowisku enzymatycznym. W związku z tym, Mo jest kofaktorem metaloenzymów, takich jak oksydaza ksantynowa, reduktaza azotanowa, oksydaza aldehydowa, hydrogenaza oraz uczestniczy w komórkowym transporcie elektronów [Murray i wsp. 2003]. Antagonistyczna zależność pomiędzy Mo i miedzią (Cu) zaburza rolę Mo w enzymatycznej reakcji redukcji azotanu [Pandey i wsp. 2020]. Miedź pełni rolę niezbędnego kofaktora wielu białek. Jako składnik strukturalny enzymów (oksydaza aminowa, oksydaza cytochromu c, katalaza, peroksydaza, oksydaza cytochromowa, oksydaza kwasu askorbinowego, dysmutaza ponadtlenkowa Cu/ Zn) bierze udział w kontroli homeostazy redoks komórek. Do głównych funkcji tego pierwiastka można zaliczyć transport elektronów w mitochondriach i chloroplastach (najpowszechniejszym białkiem zawierającym Cu jest plastocyanina, białko związane z fotosyntezą biorące udział w przenoszeniu elektronów z cytochromu f do P700+), ale także przebudowę ściany komórkowej [Cohu i Pilon, 2010]. Cu jest wykorzystywana również w reakcjach asymilacji dwutlenku węgla i produkcji ATP [Broadley i wsp. 2012; Marques i wsp. 2018].

Przejście do fazy generatywnej wiąże się również z dostępnością makroelementów takich jak wapń (Ca), magnez (Mg), potas (K), fosfor (P) i siarka (S). Za utrzymanie integralności strukturalnej i funkcjonalnej błon komórek odpowiedzialny jest wapń (Ca) [Tuna i wsp. 2007]. Reguluje transport i selektywność jonów oraz kontroluje wymianę jonową, a także aktywność enzymów ściany komórkowej [Ashraf i Harris 2004; Zhao i wsp. 2007]. W wyniku wiązania z kalmoduliną uczestniczy w przekazywaniu sygnału z korzeni do pędów. Jego wpływ odnotowano w reakcjach adaptacyjnych na zmienne warunki środowiskowe, tj. stres cieplny, aklimatyzacja roślin, infekcja patogenami, nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach [Sharma i wsp. 2017]. Wapń i magnez (Mg) jako dwa analogiczne kationy mogą wykazywać działanie antagonistyczne, a obniżona zawartość Ca w stosunku do Mg może ograniczać wzrost i rozwój wielu gatunków roślin. Mg jest składnikiem tkankowym i regulatorem procesów fizjologicznych w roślinach, które wpływają na ogólną kondycję i podatność lub odporność na choroby. Uczestniczy w wielu reakcjach metabolicznych obejmujących syntezę białek, fosforylację, syntezę chlorofilu, fotooksydację, a także aktywację enzymów, m.in. RuBP (karboksylaza rybulozo-1,5-

bisfosforanu) [Cakmak i Yazici 2010]. Oprócz Mg również potas (K) przyczynia się do prawidłowego przebiegu procesu fotosyntezy. Jeśli K lub Mg nie są pobierane w optymalnych ilościach pojawiają się interakcje anatomiczne, fizjologiczne i biochemiczne, które powodują zmniejszenie asymilacji fotosyntetycznej węgla. Ponadto K jest zaangażowany w syntezę białek, aktywację enzymów, transfer energii, osmoregulację, równowagę kationowo-anionową oraz tolerancję na stres biotyczny/abiotyczny u roślin [Wang i wsp. 2013].

Równoczesne stosowanie fosforu (P) i siarki (S) może mieć synergistyczny lub antagonistyczny wpływ na plonowanie roślin, w zależności od początkowego stanu żyzności gleby, poziomu zastosowanych suplementów oraz gatunku rośliny [Kumar i wsp. 2021]. Fosfor (P) wspomaga procesy komórkowe, w tym syntezę biomolekuł, stabilizację struktur błonowych i molekuł wysokoenergetycznych [Malhotra i wsp. 2018]. Jest ważnym elementem budowy kwasów nukleinowych, aktywacji enzymów, podziału komórek i metabolizmu węglowodanów [Razaq i wsp. 2017]. Natomiast siarka (S) poprawia syntezę ważnych aminokwasów, cysteiny i metioniny, jest kofaktorem grup prostetycznych licznych enzymów. Zwiększa tolerancję na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe oraz wpływa na wzrost roślin [Liang i wsp. 2016].

### *1.9. Morfogeneza organów roślinnych*

Rośliny wyższe charakteryzują się budową biegunową, która jest warunkowana w zygocie, gdzie można już wyodrębnić zawiązek korzenia i pędu. W wyniku takiej organizacji przestrzennej we wczesnej fazie rozwoju zarodka dochodzi do uformowania merystemu korzeniowego oraz do wykształcenia liści.

#### *1.9.1. Morfogeneza korzenia*

Zaczątkiem korzenia głównego jest korzeń zarodkowy formujący się jako pierwszy organ w trakcie embriogenezy. Korzeń zarodkowy powstaje przez uruchomienie aktywności mitotycznej merystemu korzeniowego zarodka. Komórki inicjalne merystemu wierzchołkowego (promerystemu) jako jedyne są zdolne do intensywnych podziałów [Scheres i wsp. 2002]. Są one odpowiedzialne za wydłużanie komórek u podstawy korzenia (kierunek proksymalny) zwiększając strefę zróżnicowanych, natomiast u wierzchołka korzenia (kierunek dystalny) różnicują się i przekształcają w komórki czapeczki korzeniowej [Gabryś i wsp. 2002]. Pod komórkami inicjalnymi merystemu

wierzchołkowego mieści się centrum spoczynkowe merystemu wierzchołkowego, które nie wykazuje aktywności mitotycznej i zakłada się, że jest ono odpowiedzialne za formowanie i różnicowanie tkanek korzenia. Komórki sąsiadujące z centrum spoczynkowym od strony czapeczki wytwarzają nowe partie komórek oddalających się od komórek inicjalnych w czasie, gdy ich aktywność mitotyczna zmniejsza się, aż w końcu ustaje [Shishkova i wsp. 2008]. Wtedy komórki ze strefy proksymalnej wchodzi w fazę wzrostu elongacyjnego. Różnicują się, wytwarzając typowe dla korzenia tkanki, czyli skórę (epidermę) wraz ze strefą włośnikową, korę pierwotną, śródskórną (endodermę) oraz walec osiowy z wiązkami przewodzącymi. Poza strefą włośnikową w okolicy (pericyklu) tworzą się z ośrodków merystematycznych korzenie boczne. Powstający merystem wierzchołkowy korzenia bocznego przechodzi przez endodermę, korę pierwotną i epidermę na zewnątrz. Korzeń główny oraz korzeń boczny mają podobną budowę anatomiczną, ale z odmiennym kierunkiem wzrostu [Shishkova i wsp. 2008].

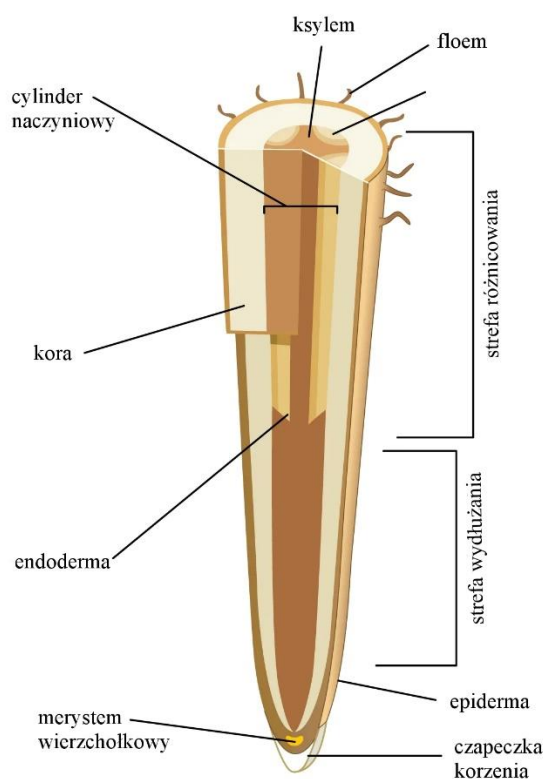


Fig. 3. Struktura korzenia [według: Gabryś i wsp. 2002] (modyfikacja własna).

### 1.9.2. *Morfogeneza liści*

Proces rozwoju liścia można podzielić na kilka etapów:

- i) utworzenie bocznego uwypuklenia promerystemu;
- ii) pojawienie się osi liścia;
- iii) wytworzenie blaszki liściowej.

W wyniku intensywnych podziałów komórkowych i wydłużaniu się komórek wierzchołka powstaje boczne uwypuklenie merystemu, które stopniowo przekształca się w palcowaty wyrostek. Podziały komórkowe zostają zatrzymane, gdy zawiązek liściowy osiąga długość ok. 3 mm [Gabryś i wsp. 2002]. Dalszy rozwój liścia prowadzi do wykształcenia osi liścia w wyniku wydłużania się zawiązki liściowej, następnie zostają zainicjowane podziały komórkowe wzdłuż osi. W wyniku tych podziałów powstaje merystem marginalny (brzeżny), który jest odpowiedzialny za grzbietowo-brzuszną symetrię liścia [Efroni i wsp. 2010]. Komórki pochodne submarginalnych komórek inicjalnych biorą udział w powstawaniu tkanek wewnętrznych liścia takich jak warstwy miękiszu palisadowego, gąbczastego oraz w tworzeniu się wiązek przewodzących. Natomiast poprzez funkcjonowanie submarginalnych i marginalnych komórek inicjalnych merystemu brzeżnego następuje wewnętrzne różnicowanie zawiązka liściowego w efekcie prowadząc do powstania skórki (epidermy) górnej i dolnej strony liścia. Na skutek kolejnych różnicowań komórkowych tworzą się rozgałęzione pasma tkanek przewodzących [Efroni i wsp. 2010]. Tak powstała sieć drobnych wiązek przewodzących jest połączona z wiązkami grubszymi, a także z nerwem głównym powstałym z prokambium we wczesnym etapie rozwoju liścia. Różnicowanie tkanek przewodzących w liściu przebiega od podstawy w kierunku wierzchołka. Kambium wiązkowe zostaje wytworzone z prokambium i ma postać warstwy komórek merystematycznych. Daje początek wtórnej tkance przewodzącej odkładającej się na zewnątrz komórki floemu, natomiast do wnętrza ksylemu [Rodriguez i wsp. 2014].

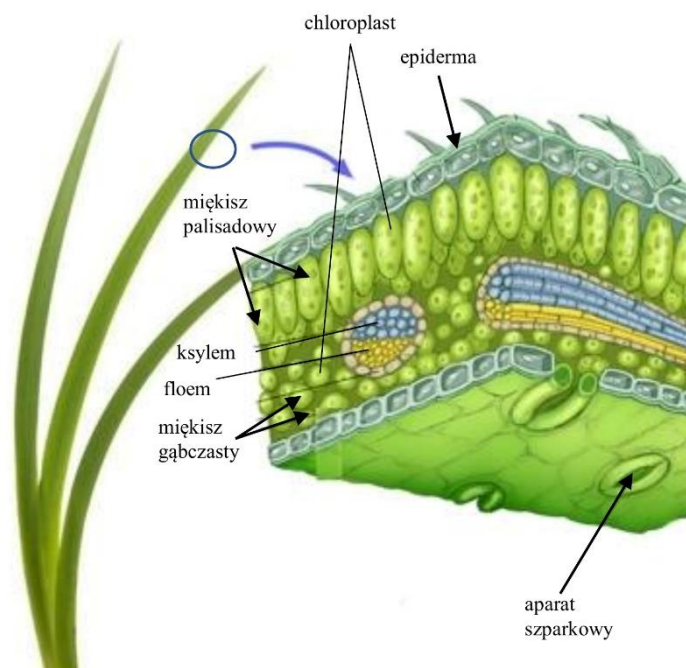


Fig. 4. Morfologia liścia [według: Gabryś i wsp. 2002] (modyfikacja własna).

#### 1.10. Organizacja przestrzenna komórki – chloroplasty

Charakterystycznymi strukturami dla roślin są plastydy, które w komórkach mogą różnić się morfologią i budową ultrastrukturalną. Jeden typ plastydów może reorganizować się w inny w zależności od panujących warunków środowiskowych, jak również zależeć od jego lokalizacji w komórce. W czasie deetioplacji (proces zielenienia się roślin) etioplasty pod wpływem światła przekształcają się w chloroplasty [Gabryś i wsp. 2002].

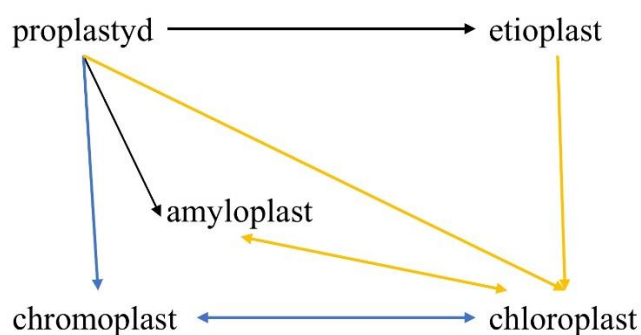


Fig. 5. Typy przekształceń plastydów; →- ciemność →- światło →- brak określonych warunków

Chloroplasty to organella, które wytwarzają energię poprzez fotosyntezę tym samym podtrzymując wzrost roślin i wydajność upraw. Dodatkowo są odpowiedzialne za biosyntezę związków aktywnych, takich jak aminokwasy, fitohormony, nukleotydy, witaminy, lipidy i metabolity wtórne [Daniell i wsp. 2016]. Ponadto chloroplasty pełnią istotną rolę w aklimatyzacji roślin do stresów środowiskowych [Zhang i wsp. 2020; Littlejohn i wsp. 2021]. Organella te są wrażliwe na stresy temperaturowe i w wyniku gwałtownych zmian środowiskowych może zostać zaburzona ich homeostaza, powodując uruchomienie kaskady sygnałów wstecznych docierających do jądra komórkowego. Ostatecznie dochodzi do przemodelowania metabolizmu i ekspresji genów, aby dostosować się do stresów zewnętrznych [Watson i wsp. 2018; Fernandez i wsp. 2019]. Aby ułatwić przetrwanie roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych, chloroplasty regulują ich strukturę, ekspresję genów, przebudowę białek i powiązane szlaki metaboliczne, w tym oksylipiny pochodzące z chloroplastów, hormony, nadtlenek wodoru i tlen singletowy [Huo i wsp. 2019].

Chloroplasty otoczone są podwójną, selektywnie przepuszczalną, błoną lipoproteinową. W skład podwójnej błony wchodzi błona wewnętrzna, która charakteryzuje się niewielką przepuszczalnością dla jonów oraz błona zewnętrzna o większej przepuszczalności. Wewnątrz organelli znajduje się matriks (białkowa stroma) mający charakter koloidalny. Błona wewnętrzna wnika do stromy tworzy liczne wpuklenia błonowe zwane tylakoidami (płaskie pęcherzyki), które tworzą liczne grana (stosy) oraz błony międzygranowe [Staehelin 2003]. Chloroplasty posiadają struktury umożliwiające zachodzenie procesu fotosyntezy. Jedną z nich jest błona fotosyntetyczna (tylakoidów), która zawiera barwniki fotosyntetyczne, a także białka tworzące aparat fotosyntetyczny (anteny PSI i PSII). Błony tylakoidów zbudowane są w znacznym stopniu z lipidów (35-40 %) w tym głównie z galaktolipidów takich jak mono- i digalaktozylodiacylloglicerole (ok. 75 %), dodatkowo obecne są fosfolipidy takie jak fosfatydylocholina, fosfatydyloglicerol, fosfatydyloinozytol oraz fosfatydyloetanolamina, a także sulfolipidy, witamina K,  $\alpha$ - tokoferol i plastochinon [Strzałka 2002]. W błonach tylakoidów występują również białka integralne mające charakter amfipatyczny (hydrofilowo- hydrofobowy) oraz hydrofobowy, na powierzchni natomiast występują białka powierzchniowe o właściwościach hydrofilowych m.in. ferredoksyna (zawierająca niehemowe żelazo i siarkę) i plastocyjanina (zawierająca miedź). Błony chloroplastów oprócz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawierają również niewielkie ilości steroli, co sprawia, że są jednymi z najbardziej płynnych spośród wszystkich błon



biologicznych. W błonach tylakoidów gran niekontaktujących się ze stromą znajduje się kompleks antenowy zbierający światło fotoukład II (fotosystem II, PSII).

Fotoukład I (fotosystem I, PSI) rozmieszczony jest w błonach tylakoidów kontaktujących się ze stromą, zaś kompleks cytochromowy znajduje się zarówno w błonach kontaktujących jak i niekontaktujących się ze stromą [Strzałka 2002].

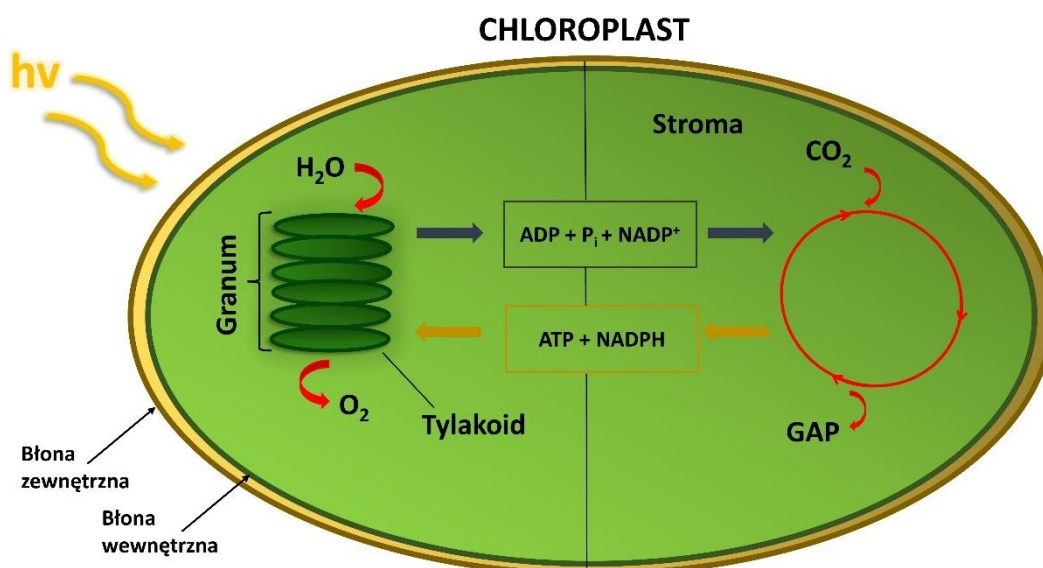


Fig. 6. Budowa chloroplastu. Reakcje zachodzące w poszczególnych częściach chloroplastu.

### 1.10.1. Fotosystem II (PS II)

W fotosystemie II następuje rozszczepienie cząsteczek wody na tlen, protony i elektrony. Energia światła, przechwycona przez chlorofile antenowe i karotenoidy, jest ostatecznie przeniesiona do centrum reakcji PSII, gdzie odbywa się separacja ładunku indukowana między pierwotnym donorem a akceptorem elektronów. Kompleks PSII jest jednym z kompleksów wielu podjednostek w tylakoidach i składa się z ponad 30 białek kodowanych zarówno przez genomy jądrowe, jak i chloroplastowe [Rokka i wsp. 2005]. PSII jest dimerem o masie cząsteczkowej około 650 kDa [Cady i wsp. 2008]. W skład jego wchodzi trimeryczne anteny zewnętrzne zbierające światło (LHCII), anteny wewnętrzne CP43 i CP47, centrum reakcji złożone z cząsteczek chlorofilu a o maksimum absorpcji 680 nm (P680), feofityny, białko D1 (miejsce wiązania plastochinonu  $Q_B$ ) oraz białko D2 (miejsce wiązania plastochinonu  $Q_A$ ). LHCII kompleks barwnikowo-białkowy jest trimerem, a każdy budujący go monomer złożony jest z łańcucha polipeptydowego składającego się z 232 reszt aminokwasowych, sześciu chlorofili b, ośmiu cząsteczek

chlorofilu a oraz czterech cząsteczek karotenoidów [Garstka 2007]. W błonach tylakoidów kompleksy te mają zdolność bocznej migracji w zależności od stanu ufosforylowania oraz mogą przekazywać energię wzbudzenia do centrum fotosystemu II w formie nieufosforylowanej.

Kompleks rozkładający wodę (OEC) jest to klaster utworzony z czterech jonów manganu i wapnia ligowanych przez reszty aminokwasowe z białka D1 ( $Mn_4CaO_n$ ). W fazie jasnej fotosyntezy jest odpowiedzialny za czteroelektronowe rozszczepienie dwóch cząsteczek wody do tlenu cząsteczkowego, jonów wodorowych oraz wolnych elektronów.

Odbywa się to w czterech etapach:

- i) od kompleksu w stanie  $S_0$  odrywa się elektron, powodując utlenienie manganu na +1 stopień utleniania i przejście kompleksu do stanu  $S_1$ ;
- ii-iv) kolejne odrywania jonów powodują zmiany stopnia utlenienia manganu do +2, +3 i +4 tym samym kompleksy odpowiednio zmieniają stan na  $S_2$   $S_3$  i  $S_4$ ;
- iv) w stanie  $S_4$  kompleks manganowy reaguje z cząsteczkami wody rozszczepiając je na cząsteczkę tlenu, cztery elektrony oraz cztery protony.

Uwolnione elektrony powstałe po fotolizie wody przyłączają się do jonów manganu prowadząc do powrotu kompleksu do stanu  $S_0$ . Zakłada się, istnienie stanów przejściowych ( $Mn^{4+}-O\cdot$  lub  $Mn^{4+}=O$ ), które przeprowadzają atak nukleofilowy na cząsteczkę wody prowadząc do rozszczepienia cząsteczek wody. Po zajściu reakcji elektrony redukują utlenione atomy manganu, protony uwalniane są do wnętrza pęcherzyka tylakoidu, a tlen usuwany jest z chloroplastu przez dyfuzję.

W całym procesie rozkładu wody ważną funkcję pełni reszta tyrozyny znajdująca się w łańcuchu aminokwasowym białka D1. Może ona ulec utlenieniu przy udziale  $P680^+$  przez co zapobiega rekombinacji pierwotnego rozdziału ładunku [McConnell i wsp. 2010]. Tyrozyna znajduje się w odległości ok. 7 Å od OEC i stanowi pomost pomiędzy manganowym centrum aktywnym OEC a centrum reakcji PSII, w celu przeciwdziałania zmianie kierunku przepływu elektronów pomiędzy centrami [McConnell i wsp. 2010].

## 2. CEL PRACY

Kwestie środowiskowe związane z zanieczyszczeniem upraw przez metale ciężkie stanowią poważny problem w krajach rozwiniętych i rozwijających się. Wraz z szybkim trendem industrializacji i urbanizacji dochodzi do podwyższenia zawartości metali zarówno w wodzie, powietrzu oraz glebie. Na obszarach rolniczych pobieranie metali ciężkich przez system gleba-uprawa może odgrywać główną rolę w narażeniu człowieka na metale ciężkie. Mangan, który jako mikroelement jest zaliczany do pierwiastków niezbędnych do prawidłowego rozwoju i optymalnego plonowania roślin może akumulować się w tkankach roślin w ilościach znacznie przewyższających zapotrzebowanie komórek prowadząc do zmian metabolizmu komórkowego.

Pomimo prowadzenia licznych badań naukowych nadal nie został precyzyjnie opisany mechanizm działania nadmiaru jonów manganu na poziomie komórkowym. Dlatego celem podjętych badań było wykazanie różnic w działaniu jonów Mn w dawce toksycznej na siewki jarych zbóż różniące się wrażliwością na czynniki stresowe. Dodatkowym aspektem badań było sprawdzenie czy jony selenu mogą niwelować/zmniejszać skutki wywołane ekspozycją na zwiększone stężenia jonów manganu poprzez stymulację mechanizmów obronnych komórek w podobnym stopniu jak w przypadku zastosowania innych czynników stresogennych, w tym metali ciężkich. Do badań wybrano trzy gatunki roślin uprawnych: pszenicę (Parabola i Nimfa – odmiany tolerancyjne, Raweta i Alibi – odmiany wrażliwe), jęczmień (CAM/B1 - odmiana tolerancyjna, Maresi – odmiana wrażliwa) i owies (Bingo - odmiana tolerancyjna, Siwek - odmiana wrażliwa).

W tym celu sformułowano następujące pytania szczegółowe:

- i) Jak zmieniają się wartości świeżej i suchej masy koleoptyli zbóż: pszenicy, jęczmienia i owsa w warunkach nadmiaru jonów manganu?
- ii) W jakim stopniu zastosowane stężenie jonów manganu powoduje różnice w akumulacji manganu pomiędzy odmianami badanych gatunków roślin?
- iii) Czy działanie jonów manganu wpływa na aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz antyoksydantów niskocząsteczkowych tj. kwas askorbinowy, glutation?

- iv) W jakim stopniu jony manganu wpływają na różnice w zawartości osmoprotektantów tj. prolina oraz enzymy jej syntezy oraz degradacji, cukrów rozpuszczalnych?
- v) Jak zmieniają się wartości parametrów chlorofilu a i b oraz kwasu salicylowego w warunkach nadpodaży jonów Mn?

*dla wybranych odmian pszenicy:*

- vi) Czy nadmiar jonów Mn powoduje różnice wartości parametrów intensywności stresu oksydacyjnego pomiędzy badanymi odmianami?
- vii) W jakim stopniu toksyczne stężenie jonów Mn wpływa na zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego badanych siewek?
- viii) Czy jony manganu wpływają na pobieranie i akumulację mikro- i makroelementów, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania roślin?
- ix) Czy aplikacja jonów selenu – jako potencjalnego protektanta powoduje zmiany w akumulacji jonów manganu w badanych odmianach?
- x) W jakim stopniu zmienia się zawartość polifenoli w siewkach, w warunkach toksycznego stężenia jonów manganu oraz po suplementacji selenem?
- xi) Czy są widoczne różnice w obserwacjach mikroskopowych liści i korzeni siewek po traktowaniu jonami manganu indywidualnie oraz w obecności jonów selenu wraz z manganem?
- xii) W jakim stopniu zmienia się ilość 5 met-C w tkankach badanych siewek pomiędzy odmianami w warunkach stresu manganowego oraz po dodaniu jonów selenu?

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Przygotowanie materiału roślinnego

Nasiona pszenicy jarej cv. Raweta pozyskano z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie; cv. Parabola, cv. Nimfa i cv. Alibi otrzymano z Hodowli Roślin Strzelce – grupa IHAR; nasiona jęczmienia jarego cv. CAM/ B1 – odmiana syryjska oraz cv. Maresi półkarłowa niemiecka odmiana otrzymano w ramach projektu POLAPGEN z Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (IGR PAN) w Poznaniu; oraz nasiona owsa: cv. Bingo i cv. Siwek uzyskano odpowiednio z hodowli HR Strzelce i Małopolskiej Hodowli Roślin.

#### 3.1.2. Hodowla wazonowa

Nasiona zbóż sterylizowano według następującej procedury:

- 80% etanol stosowany przez 60 s,
- 10 % podchloryn sodu przez 10 min,
- woda redestylowana – płukanie powtarzane cztery razy.

Odkążone nasiona przenoszono do ciepłarki (20 °C) na szalkach Petrie'go, wyłożonych bibułą nasączoną wodą, która stanowiła kontrolę oraz roztworami 5 i 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Po 2 dniach 54 jednakowe siewki zostały umieszczone w donicach (po 9 w każdym wazonie) wypełnionych perlitem nasączonym 50% roztworem Hoghlanda z dodatkiem 5 lub 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Ziarna kontrolne hodowano bez dodatku Mn. Rośliny kontrolne podlewano codziennie 50 % pożywką wg Hoaglanda (50 ml/ 1 donica) oraz w/w medium zawierającym 5 i 10 mM MnCl<sub>2</sub>. W czasie trwania eksperymentu roślinom zapewniono optymalne warunki wzrostu: światło (6:00- 22:00: 800 μmol (fotonów) m<sup>-2</sup> ·s<sup>-1</sup>), temperatura (17/ 22 °C noc/ dzień), wilgotność mieszcząca się w zakresie od 45 do 50 %. Rośliny hodowano do etapu pojawienia się pierwszego liścia (ok. 2 cm). Po tym czasie zmierzono świeżą i suchą masę liści. Materiał roślinny ze wszystkich badanych roślin przechowywano w temperaturze - 80 °C. Eksperyment powtórzono trzy razy i wykonano pięć powtórzeń w ramach jednego eksperymentu dla każdej analizy biochemicznej.

### 3.1.3. Hodowla hydroponiczna

Steryлизację i kiełkowanie nasion przeprowadzono wg schematu podanego w rozdziale 3.2. Skiełkowane nasiona umieszczano w otworach wykonanych w płycie polistyrenowej, którą położono w 11 l pojemniku na 50 % medium wg Hoagland'a (kontrola), pozostałe pojemniki zawierały roztwory Hoagland'a wraz 10 mM MnCl<sub>2</sub>, oraz 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a także 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Roślinom zapewniono optymalne warunki wzrostu opisane w rozdziale 3.1.2. Po 12 dniach hodowli rośliny zebrano, oddzielono pędy od korzeni, zważono tkanki i zamrożono w ciekłym azocie do analiz biochemicznych. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono na świeżych liściach i korzeniach.

### 3.2. Oznaczenie enzymów antyoksydacyjnych

Wszystkie oznaczenia aktywności enzymów wykonano w temperaturze 4 °C. Homogenizację liści (1 g) przeprowadzono w 0.05 mM buforze fosforanowym (PB, pH=7) z 0.1 mM EDTA. Homogenat wirowano przez 10 minut przy 10 000 rpm. Uzyskany supernatant wykorzystano do analiz aktywności dysmutaz ponadtlenkowych, peroksydaz oraz katalazy. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych wyrażono jako U/ mg białka.

#### 3.2.1. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1) przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez McCord'a i Fridovich'a [1969]. Przez 90 minut napowietrzano mieszaninę reakcyjną składającą się z: buforu fosforanowego o pH= 7.8, 0.1 mM EDTA, 1 mM cytochromu c i 1 mM ksantyny, w celu osiągnięcia maksymalnego utlenienia cytochromu c. Aktywność SOD analizowano spektrofotometrycznie (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers) przez 2 minuty przy długości fali  $\lambda = 550$  nm, po zmieszaniu mieszaniny reakcyjnej (900 μl), oksydazy ksantynowej (4 μl) oraz supernatantu (4 μl). Miarę aktywności enzymu wyznaczono w oparciu o jednostkę cytochromową (1 Unit), niezbędną do przeprowadzenia 50% inhibicji cytochromu c (w obecności ksantyny oraz oksydazy ksantynowej).

### 3.2.2. Oznaczanie aktywności peroksydazy (POX) w komórkach roślinnych

Aktywność peroksydaz (POX, EC 1.11.1.9) analizowano spektrofotometrycznie (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers) w oparciu o technikę zaproponowaną przez Lück'a [1965]. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą 0.9 ml buforu PB o pH=7, 50 µl 1% p-fenylendiaminy, 5 µl supernatantu oraz 50 µl 0.05M roztworu nadtlenu wodoru. Pomiar absorbancji prowadzono przez 2 minuty przy długości fali  $\lambda = 460$  nm.

### 3.2.3. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) w komórkach roślinnych

Pomiar aktywności katalazy (CAT, EC 1.11.16) wykonano w oparciu o procedurę opracowaną przez Aebi [1984]. Sporządzono mieszaninę reakcyjną zawierającą 1.9 ml PB o pH = 7, 0.5 ml 0.05 M nadtlenu wodoru oraz 100 µl supernatantu. Odczyt absorbancji przy użyciu spektrofotometru UV-Vis (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers) prowadzono przez 2 minuty przy długości fali:  $\lambda = 240$  nm.

### 3.3. Oznaczanie koncentracji makro- oraz mikroelementów

Oznaczenie koncentracji mikro- i makroelementów wykonano zgodnie z procedurę opisaną przez Tobiasz i wsp. [2014]. Materiał roślinny (liście lub korzenie) suszono sublimacyjnie z wykorzystaniem liofilizatora - Freeze Dry System/ Freezone 4.5, Labconco, USA. Następnie przy użyciu roztwarzania mikrofalowego (*Multiwave 3000*, Anton Paar, Graz, Austria) następował rozkład próbek (0.02 g) w 60 ml ultraczystego stężonego kwasu azotowego (Merck, Darmstadt, Niemcy). Do oznaczenia ilości makroelementów (Mg, Ca, K, S i P) zastosowano ICP OES Optima 2100 (Perkin Elmer, Monachium, Niemcy). Analizę ilości mikroelementów wykonano przy następujących długościach fal (nm) 238.20 (Fe), 285.21 (Mg), 317.93 (Ca) i 766.49 (K). Oznaczenia S przy 181.97 nm i P przy 213.62 nm zostały wykonane przy maksymalnym przepływie argonu przez system monochromatora. Wzorce dla P i S otrzymano przez rozcieńczenie wzorca nr 5 (Perkin Elmer). Wzorce dla pozostałych badanych pierwiastków otrzymano przez rozcieńczenie wielopierwiastkowego wzorca nr IV firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).

Do oznaczenia zawartości mikroelementów (Mn, Cu, Zn, Se i Mo) wykorzystano ICP MS (Elan DRC-e, Perkin Elmer). Analizy stężenia Fe wymagały zastosowania dynamicznej komory reakcyjnej (przepływ metanu 0.6 dm<sup>3</sup>/ min; parametr rPq = 0.25). Hydrolizaty próbek oraz certyfikowane wzorce (CRM) rozcieńczono 10- krotnie

do oznaczeń Cu (63) i Zn (66) oraz 25-krotnie do analiz Fe w liściach, Mn (55) oraz Mo (98). Wzorce kalibracyjne przygotowano przez rozcieńczenie standardu nr 3 (Perkin Elmer), a stabilność pomiaru kontrolowano poprzez analizę rozcieńczonego wzorca wielopierwiastkowego. Analiza Se przez ICP MS może być zakłócana przez interferencje izobaryczne, dlatego Se oznaczano równolegle za pomocą atomowej spektrometrii fluorescencyjnej z generacją wodorków (AFS) wykorzystując spektrometr AFS-830 (Beijing Titan Instruments Co., Pekin, Chiny). Dokładność oznaczenia poszczególnych pierwiastków została oceniona na podstawie analizy CRM i została obliczona z 10 powtórzeń. Średnie względne odchylenie standardowe (RSD) dla ICP MS wahało się od 0.8 % do 2.9 %.

#### 3.4. *Oznaczanie zawartości MDA*

Ilość aldehydu dimalonowego (MDA) oszacowano na podstawie procedury zaprezentowanej przez Dhindsa i wsp. [1981]. Materiał roślinny (liście lub korzenie) (1 g) homogenizowano w 0.5 % roztworze kwasu trichlorooctowego (TCA). Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą 2.5 ml 20 % kwasu trichlorooctowego z 0.5% kwasem tiobarbiturowym oraz 0.5 ml uzyskanego po wirowaniu supernatantu. Mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90 °C przez 30 min. Pomiar absorbancji wykonano spektrofotometrycznie przy dwóch długościach fali:  $\lambda = 532$  nm i 600 nm (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers). Do obliczenia koncentracji MDA wykorzystano współczynnik ekstynkcji wynoszący  $155 \text{ nm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.5. *Oznaczanie zawartości białka*

Stężenie białka wyznaczono metodą opisaną przez Bradforda [1976]. 1g tkanki homogenizowano w schłodzonym (4 °C) 0.5 mM buforze fosforanowym o pH=7.0. Po odwirowaniu pobrano 4  $\mu\text{l}$  supernatantu do którego wprowadzono 200  $\mu\text{l}$  odczynnika Bradforda. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w ciemności przez 20 min. Absorbancję zmierzono spektrofotometrycznie (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers) przy długości fali:  $\lambda = 595$ nm. Do obliczeń ilościowych zastosowano krzywą z surowiczej albuminy wołowej (BSA) (1 mg/ ml) jako standard.



### 3.6. *Oznaczanie cukrów rozpuszczalnych i skrobi*

Zawartość cukrów rozpuszczalnych oznaczono techniką opisaną przez Janeczko i wsp. [2010]. 1 g materiału roślinnego (liście lub korzenie) homogenizowano z 1 ml schłodzonego (4 °C) 80% etanolu. 0.5 ml uzyskanego supernatantu ogrzewano (95 °C) z odczynnikiem antronowym rozpuszczonym w 72 % kwasie siarkowym przez 10 min. Pomiar absorbancji wykonano spektrofotometrycznie przy  $\lambda = 625$  nm (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers). Do obliczeń ilościowych zastosowano krzywą z glukozy (1 mg/ ml) jako standard.

Zawartość skrobi wyznaczono metodami łączonymi zaproponowanymi przez Hubera i Israela [1982] oraz Janeczko [2010]. 1 g materiału roślinnego (liście i korzenie) homogenizowano w 1 ml 2 M KOH. Po 30 minutowym ogrzewaniu dodano 1M kwas octowy w celu zobojętnienia mieszaniny. Depolimeryzację skrobi do glukozy prowadzono w roztworze zawierającym 0.5 jednostki  $\alpha$ -amylazy (EC 3.2.1.1) przez 15 godzin w temperaturze 50 °C. Następnie mieszaninę odwirowano (5 min, 6000 rpm), zawartość glukozy oznaczono metodą antronową, jak opisano powyżej.

### 3.7. *Oznaczanie nadtlenu wodoru*

1 g materiału roślinnego (liście lub korzenie) homogenizowano w 2 ml schłodzonego roztworu (4 °C) 0.1% TCA [Sergieiev i wsp. 1997]. Po wirowaniu do 0.5 ml supernatantu dodano 2,5 ml 1 M jodku potasu oraz 0.5 ml 10 mM buforem fosforanowego o pH= 7.2. Pomiar absorbancji wykonano spektrofotometrycznie przy  $\lambda = 390$  nm (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers). Obliczenia ilościowe przeprowadzono na podstawie krzywych kalibracyjnych dla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0 – 1.0  $\mu$ mol/ g) przygotowanych w 0.1 % TCA.

### 3.8. *Oznaczenie zawartości proliny*

Prolinę oznaczono według procedury opisanej przedstawionej przez Bates i wsp. [1973], zmodyfikowanej przez Grzesiaka i wsp. [2013]. 1 g materiału roślinnego (liście lub korzenie) gotowano w łaźni wodnej z 1.5 ml wody destylowanej przez 30 min. Po wirowaniu uzyskany ekstrakt (0.5 ml) zmieszano z 1 ml 1 % roztworu ninhydryny w 60 % kwasie octowym. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95 °C przez 20 min. Po schłodzeniu dodano 3 ml toluenu, wortexowano i odstawiono do rozdzielenia się faz.

Do spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda = 520$  nm (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers) pobrano górną warstwę. Zawartość proliny oznaczono ze wzoru:

$$C_{\text{pro}} = \frac{A * x}{A_{\text{pro}}} / g$$

gdzie:

A – absorbancja próbki

x – zawartość proliny w standardzie (0.5  $\mu$ M)

A<sub>pro</sub> – absorbancja standardu proliny

g – świeża masa liści [g]

### 3.9. Oznaczenie aktywności enzymów syntezy i degradacji proliny

1 g materiału roślinnego homogenizowano w 2 ml schłodzonego (4 °C) 100 mM buforu fosforanowego o pH= 7.4 zawierającego: 1 mM kwas etylenodiaminotetraoctowy, 10 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 1% poliwinylpolipirolidon, 5 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0.6 M KCl. Uzyskany supernatant wykorzystano do oznaczenia aktywności syntazy D1-pirolino-5-karboksylianowej (P5CS), D-aminotransferazy ornityny (OAT), oraz dehydrogenazy prolinowej (PDH).

Aktywność syntazy D1-pirolino-5-karboksylianowej (P5CS, EC 2.7.2.11) oznaczono wg techniki zaproponowanej przez Stines i wsp. [1999]. Przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z: 7.5 mM kwasu L-glutaminowego, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, 5 mM ATP oraz 0.4 mM NADPH. Reakcję rozpoczęto przez dodanie 0.5 ml nadsącza do 2 ml mieszniny reakcyjnej. Próbkę inkubowano przez 20 min. w temperaturze 37 °C. Absorbancję mierzono przy  $\lambda = 340$  nm z wykorzystaniem spektrofotometru (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers).

Oznaczenie aktywności D-aminotransferazy ornityny (OAT, EC 2.6.1.68) wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez Vogela i Kopaca [1960]. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 100 mM buforu PB o pH 8.0, 50 mM l-ornityny, 20 mM  $\alpha$ -ketoglutaranu i 1 mM pirydoksalu-5'-fosforanu. Do 0.8 ml mieszaniny dodano 0.2 ml supernatantu i następnie próbki inkubowano przez 30 min. w temp. 37 °C. Reakcję zatrzymano przez dodanie 0.5 ml 10% kwasu trichlorooctowego, a następnie dodano 0.5 % o-aminobenzaldehyd rozpuszczony w etanolu. Po godzinnej inkubacji zmierzono

spektrofotometrycznie (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers) absorbancją przy  $\lambda = 440$  nm.

Do oznaczenia dehydrogenazy prolinowej (PHD, EC 1.5.99.8) przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z: 0.15 M buforu  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$  o pH 10.3, 13 mM L- proliny oraz 1.5 mM  $\text{NAD}^+$  zgodnie z protokołem podanym przez Lutts i wsp. [1999]. Do 1 ml mieszaniny reakcyjnej dodano 0.5 ml supernatantu i wykonano pomiar absorbancji przy  $\lambda = 340$  nm z wykorzystaniem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers. Aktywność enzymów syntezy (P5CS oraz OAT) oraz degradacji (PHD) proliny wyrażono jako U/ mg białka stosując surowicę bydlęcą jako standard.

### 3.10. Wyznaczenie zawartości chlorofilu

Liście (1g) homogenizowano w 2 ml schłodzonego (4 °C) 80% acetonu. Po wirowaniu Supernatant oznaczono spektrofotometrycznie (Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers) przy następujących długościach fali:  $\lambda = 470$  nm,  $\lambda = 624$  nm,  $\lambda = 645$  nm,  $\lambda = 663$  nm i  $\lambda = 730$  nm). Stężenie chlorofilu a obliczono ze wzoru 1, a chlorofilu b ze wzoru 2.

$$\text{Chla} = 12,67(\text{A}_{663}-\text{A}_{730}) - 2,65(\text{A}_{645}-\text{A}_{730}) - 0,29(\text{A}_{645}-\text{A}_{730}) \quad (1)$$

$$\text{Chlb} = 23,6(\text{A}_{645}-\text{A}_{730}) - 4,23(\text{A}_{663}-\text{A}_{730}) - 0,33(\text{A}_{624}-\text{A}_{730}) \quad (2)$$

### 3.11. Oznaczenie totalnej aktywności antyoksydacyjnej

1g liści homogenizowano w 2 ml metanolu. Otrzymany po wirowaniu supernatant wykorzystano do badań: redukcji rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), wyznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC) oraz możliwości redukujących żelaza (FRAP).

#### 3.11.1 Wyznaczenie zdolności eliminacji rodnika DPPH

Test wychwytywania rodników DPPH (95%, Aldrich, Niemcy) przeprowadzono według procedury opisanej przez Brindzová i wsp. [2008]. Do 0.1 ml supernatantu wprowadzono 3 ml 0.04% metanolowego roztworu DPPH. Próbkę inkubowano w ciemności

w temperaturze pokojowej przez 30 min. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 517$  nm z użyciem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers. % inhibicji rodnika DPPH wyznaczono ze wzoru:

$$\%DPPH = \frac{A_o - A}{A_o} \cdot 100\%$$

gdzie:

% DPPH- procent inhibicji rodnika DPPH

A<sub>o</sub>- absorbancja kontrolna (0.04% DPPH+ metanol)

A- absorbancja próbki

### 3.11.2. Wyznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC)

Test całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAC) przeprowadzono zgodnie z protokołem zaproponowanym przez Umaheswari i Chatterjee (2008). Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 0.6 M kwas siarkowy (VI), 4 mM molibdenian amonu i 28 mM fosforan sodu. Do 3 ml mieszaniny wprowadzono 0.3 ml supernatantu i tak przygotowany roztwór inkubowano w temp. 95 °C przez 90 min. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 695$  nm z użyciem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers. Do obliczeń ilościowych zastosowano kwas askorbinowy (1 mg/ml) jako standard [Govindarajan i wsp. 2003].

### 3.11.3. Moc antyoksydacyjna redukująca żelazo (FRAP)

Analiza możliwości redukujących została przeprowadzona w oparciu o zmianę Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> zgodnie procedurą zaproponowaną przez Oyaizu [1986]. Do 2.5 ml 0.2 M buforu fosforanowego o pH=6.6 dodano 2.5 ml 1% roztworu żelazocyjanku potasu oraz 0.2 ml supernatantu. Przygotowana mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temp. 50°C przez 20 min. Po tym czasie aplikowano 2.5 ml 10% roztworu kwasu trichlorooctowego. Następnie z wierzchniej warstwy pobrano 2 ml roztworu, rozcieńczono 2 ml wody destylowanej i dodano 0.5 ml 0.1% chlorku żelaza. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 700$  nm z użyciem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers. Do obliczeń ilościowych zastosowano kwas askorbinowy (1 mg/ ml) jako standard.

### 3.12. Oznaczenie zawartości kwasu salicylowego

Ekstrakcję kwasu salicylowego z materiału roślinnego przeprowadzono zgodnie z protokołem opublikowanym przez Raskina i wsp. [1989]. 1g liści homogenizowano z 10 ml 90% metanolu. Uzyskany osad rozpuszczono w 10 ml 100% metanolu i wirowano. Otrzymany supernatant odparowano w 60 °C, a pozostały osad ponownie zawieszono w 5 ml 5% kwasu trichlorooctowego i odwirowano. Pozyskany supernatant dwukrotnie rozcieńczono octanem etylu [Raskin i wsp. 1989].

Zawartość kwasu salicylowego oznaczono według protokołu opisanego przez Warriera i wsp. [2013]. Do 1 ml ekstraktu dodano 1 ml 0.1% alkoholowego r-ru chlorku żelaza. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=540$  nm z użyciem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometers. Do obliczeń ilościowych zastosowano kwas salicylowy (1 mg/ ml) jako standard.

### 3.13. Oznaczenie zawartości kwasu askorbinowego

Oznaczenie stężenia kwasu askorbinowego wykonano z wykorzystaniem NBD-Cl (4-chloro7-nitrobenzenofurazan) opublikowaną przez Cieślewicz i Grzelakowska [2011]. 1 g materiału roślinnego (liście) homogenizowano z 5 ml 0.5% roztworu kwasu cytrynowego. Do uzyskanego w trakcie wirowania 0.5 ml nadsącza dodano 0.5 ml 0.1% acetonowego roztworu NBD-Cl oraz 0.5 ml 0.2 M roztworu NaOH. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=582$  nm z użyciem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible Spectrophotometers. Do obliczeń ilościowych zastosowano kwas askorbinowy (1 mg/ ml) jako standard.

### 3.14. Wyznaczenie ilości glutationu

1 g materiału roślinnego (liście) homogenizowano z 1 ml 0.1 M buforu fosforanowego o pH= 7.2, a następnie dodano 75 $\mu$ L 50% TCA. Po 30 sekundowym zmiksowaniu próbki wirowano. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 0.8 ml, 0.2 M buforu fosforanowego o pH= 8.2, 0.1 ml DTNB (kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) oraz 0.1 ml supernatantu. Absorbancję mierzono po 2 min od wprowadzenia supernatantu przy długości fali  $\lambda= 412$  nm z wykorzystaniem spektrofotometru Thermo Scientific™ Evolution™ 201/ 220 UV-Visible

Spectrophotometers. Do obliczeń ilościowych zastosowano 1 mM glutation w 2% TCA jako standard.

### 3.15. Obserwacje mikroskopowe

Próbki liści i korzeni utrwalano 4% paraformaldehydem (Polysciences) i 0.25 % aldehydem glutarowym (Sigma) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (pH= 7.2, 24 h, 4°C) i przygotowywano do zatapiania w żywicy BMM (metakrylan butylu, metakrylan metylu, 0.5% eter benzoiloetylowy z 10 mM dichlorodifenylotrichloroetanem (DDT) według procedury opisanej przez Niedojadło i wsp. [2015]. Próbki pocięto z wykorzystaniem ultramikrotomu Leica UCT na reprezentatywne skrawki o 1.5 µm przekroju poprzecznym, które zebrano na wysokiej jakości adhezyjnych szkiełkach mikroskopowych Thermo Scientific™ Polysine. Skrawki wybarwiono na gorąco błękitem metylenowym przez 10 minut. Kilkakrotnie przepłukano je wodą destylowaną, a następnie zamknięto w medium DPX mounting do badań histologicznych. Preparaty oceniano i dokumentowano z wykorzystaniem mikroskopu BX50 (Olympus) z oprogramowaniem NIS Elements AR 3.00 NIKON.

W celu zlokalizowania 5-metC usunięto żywicę poprzez dwukrotne płukanie w acetonie, a następnie szkiełka przemywano wodą destylowaną i PB o pH= 7.2. Skrawki inkubowano z 0.1% RNAzą w temp. 37 °C przez 30 min, i trzykrotnie płukano w PB o pH= 7.2 przez 5 min. Po 10 min. neutralizacji pożywki 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O w temperaturze pokojowej, skrawki inkubowano z pierwszorzędowym mysim przeciwciałem anti-5-metC (Abcam) (1:200 w 1% BSA (surowicza albumina wołowa) w PBS pH= 7.2 przez 12 godz. w 4 °C) i drugorzędowym kozim przeciwciałem anti-mysim Alexa Fluor 488 (Invitrogen) rozcieńczonym 1:1000 w 1% BSA – 1h w 37°C. DNA wybarwiono 4,6-diamidyno-2-fenyloindolem (DAPI; Fluka). Skrawki przemyto PBS o pH= 7.2, osuszono w temperaturze pokojowej i pokryto odczynnikiem przeciw blaknięciu ProLong™ Gold (Thermo Fisher Scientific). Reakcje kontrolne pomijały inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Skrawki półcienkie analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX50, z olejową soczewką immersyjną UPlanFI 1009 (N.A. 1.3) i filtrami wąskopasmowymi (U-MNU, U-MNG). Wyniki rejestrowano cyfrową kamerą Olympus XC50 z oprogramowaniem CellB (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Niemcy).

### *3.16. Analiza statystyczna*

Wyniki eksperymentów biologicznych podano jako średnią z pięciu powtórzeń biologicznych ( $\pm$ SD). Wykonano jednokierunkową analizę ANOVA, a następnie przeprowadzono porównania typu post-hoc (test Duncana) wykorzystując oprogramowanie Statistica Software w wersji 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Poziom istotności ustalono na  $p < 0.05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1. Pierwsza część badań

Do pierwszej części badań wykorzystano następujące obiekty badawcze: pszenica jara odmiany: Parabola (odmiana odporna) i Raweta (odmiana wrażliwa); jęczmień jary odmiany: CAM/B1 (odmiana odporna) i Maresi (odmiana wrażliwa); owies odmiany: Bingo (odmiana odporna) i Siwek (odmiana wrażliwa) uprawiane w hodowli wazonowej.

#### 4.1.1. Zawartość manganu

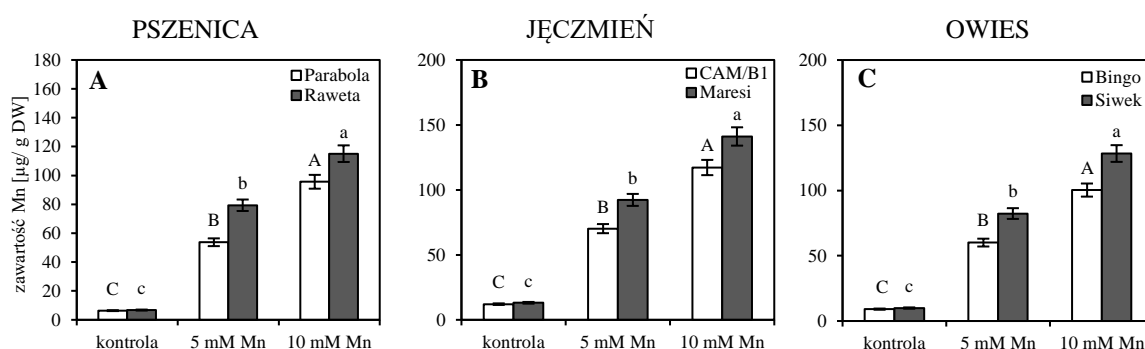


Fig. 7. Zawartość manganu [ $\mu\text{g/g DW}$ ] w ziarnach pszenicy jarej (Parabola i Raweta), jęczmienia jarego (CAM/ B1 i Maresi) oraz owsa (Bingo i Siwek) kielkowanych na wodzie (kontrola) oraz na roztworach 5 i 10 mM  $\text{MnCl}_2$ ; Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Zanim przystąpiono do analizy wpływu Mn na czynniki biochemiczne wskazujące na stresogenne działanie Mn określono poziom tego jonu w nasionach (po 24 h od namoczenia). Zawartość Mn w ziarnach kontrolnych wahała się u odmian tolerancyjnych od  $6.34 \pm 0.02 \mu\text{g/g DW}$  u Paraboli, do  $12.06 \pm 0.06 \mu\text{g/g DW}$  u Bingo oraz u odmian wrażliwych od  $6.77 \pm 0.03 \mu\text{g/g DW}$  u Rawety do  $13.11 \pm 0.03 \mu\text{g/g DW}$  u odmiany Siwek. We wszystkich badanych zbożach zastosowanie Mn zwiększyło akumulację tego pierwiastka wraz ze wzrostem zastosowanej ilości Mn. Przy stężeniu 5 mM  $\text{MnCl}_2$  zawartość Mn wzrosła ok. 7- krotnie w ziarnach genotypów tolerancyjnych i 9-krotnie dla wrażliwych, a przy 10 mM  $\text{MnCl}_2$  ok. 13- krotnie dla tolerancyjnych i 15-krotnie dla roślin wrażliwych. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w akumulacji Mn między wrażliwymi i tolerancyjnymi odmianami wszystkich badanych zbóż.



## 4.1.2. Parametry fizjologiczne

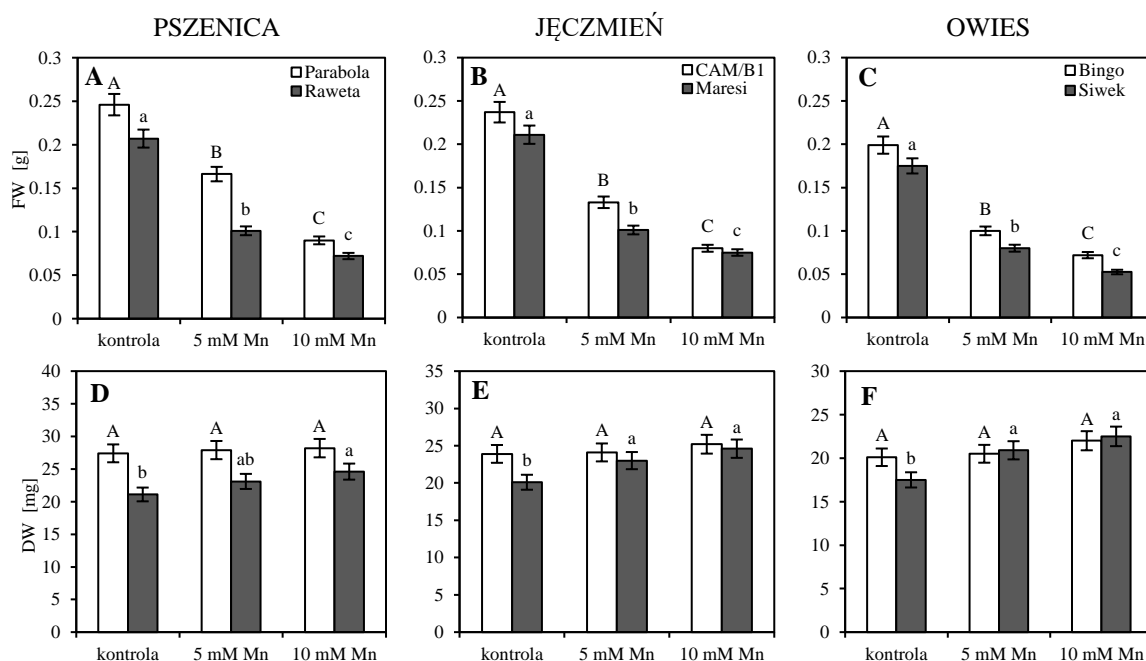


Fig. 8. Świeża masa [g] i sucha masa [mg] części nadziemnej z trzech gatunków jarych zbóż: pszenicy (Parabola i Raweta) - A; D, jęczmienia (CAM/ B1 i Maresi) - B; E oraz owsa (Bingo i Siwek) - C; F hodowanych na podłożu bez Mn (kontrola), z 5 mM MnCl<sub>2</sub> (5 mM Mn) oraz z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncan.

Świeża masa (FW) części nadziemnej siewek była wyższa u odmian tolerancyjnych w porównaniu z odmianami wrażliwymi (Fig. 8. A-C). Najwyższą wartość tego parametru zarejestrowano u odmiany tolerancyjnej pszenicy (Parabola). Po aplikacji jonów Mn nastąpiło obniżenie masy siewek u wszystkich testowanych zbóż. Jednak najmocniejszy efekt był obserwowany u odmian wrażliwych: ok. 50 % spadek masy roślin narażonych na 5 mM Mn oraz 65- 70 % w przypadku 10 mM Mn. Najmniejsza redukcja masy była obserwowana u odmiany Parabola po zastosowaniu dawki 10 mM Mn, co spowodowało spadek masy tylko o ok. 45 %.

Odmiany wytypowane do badań jako tolerancyjne charakteryzowały się wyższą zawartością suchej masy niż odmiany tolerancyjne w obiektach kontrolnych (Fig. 8. D-F). Bez względu na poziom zastosowanej dawki Mn odmiany tolerancyjne nie wykazywały statystycznie istotnych zmian masy. Natomiast u odmian wrażliwych odnotowano zwiększenie suchej masy głównie przy stężeniu 10 mM Mn. Największą zmianę wartości tego parametru zarejestrowano u odmiany wrażliwej owsa, gdzie przy stężeniu 10 mM Mn obserwowano wzrost na poziomie ok. 28 %.

## 4.1.3. Enzymy antyoksydacyjne

Tab. 2. Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych: SOD, POX i CAT [U/ mg białka] w pierwszym liściu zbóż jarych (pszenica: Parabola i Raweta, jęczmień: CAM/ B1 i Maresi, owies: Bingo i Siwek). Obiekty hodowane w wazonach podlewanych pożywką bez dodatku Mn (kontrola), z 5 mM MnCl<sub>2</sub> (5 mM Mn) oraz z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Odmiana	Traktowanie	SOD [U/ mg białka]	POX [U/ mg białka]	CAT [U/ mg białka]·10 <sup>-2</sup>
Pszenica				
Parabola	Kontrola	0.300±0.014 <sup>c</sup>	0.253±0.010 <sup>c</sup>	1.19±0.04 <sup>c</sup>
	5 mM Mn	0.377±0.019 <sup>b</sup>	0.312±0.008 <sup>b</sup>	1.29±0.05 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	0.437±0.018 <sup>a</sup>	0.484±0.012 <sup>a</sup>	1.75±0.07 <sup>a</sup>
Raweta	Kontrola	0.299±0.010 <sup>c</sup>	0.430±0.013 <sup>c</sup>	0.62±0.03 <sup>b</sup>
	5 mM Mn	0.426±0.011 <sup>b</sup>	0.548±0.012 <sup>b</sup>	0.64±0.07 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	0.575±0.010 <sup>a</sup>	0.702±0.013 <sup>a</sup>	1.40±0.10 <sup>a</sup>
Jęczmień				
CAM/ B1	Kontrola	0.234±0.012 <sup>c</sup>	0.220±0.010 <sup>c</sup>	3.40±0.11 <sup>c</sup>
	5 mM Mn	0.311±0.011 <sup>b</sup>	0.288±0.016 <sup>b</sup>	4.10±0.11 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	0.383±0.014 <sup>a</sup>	0.412±0.014 <sup>a</sup>	6.20±0.15 <sup>a</sup>
Maresi	Kontrola	0.212±0.013 <sup>c</sup>	0.354±0.012 <sup>c</sup>	2.51±0.09 <sup>c</sup>
	5 mM Mn	0.354±0.011 <sup>b</sup>	0.443±0.017 <sup>b</sup>	3.25±0.15 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	0.456±0.020 <sup>a</sup>	0.609±0.016 <sup>a</sup>	4.06±0.16 <sup>a</sup>
Owies				
Bingo	Kontrola	0.195±0.012 <sup>c</sup>	0.156±0.016 <sup>c</sup>	0.89±0.04 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	0.244±0.016 <sup>b</sup>	0.302±0.018 <sup>b</sup>	0.90±0.04 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	0.317±0.010 <sup>a</sup>	0.420±0.019 <sup>a</sup>	0.91±0.09 <sup>a</sup>
Siwek	Kontrola	0.155±0.011 <sup>c</sup>	0.261±0.008 <sup>a</sup>	0.72±0.02 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	0.282±0.012 <sup>b</sup>	0.202±0.010 <sup>b</sup>	0.63±0.03 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	0.385±0.011 <sup>a</sup>	0.183±0.007 <sup>c</sup>	0.23±0.05 <sup>c</sup>

Aktywność enzymatyczną SOD, POX oraz CAT w koleoptylach wszystkich badanych zbóż przedstawiono w Tabeli 2. Wśród obiektów kontrolnych pszenica charakteryzowała się najwyższą aktywnością SOD i POX, w przeciwieństwie do owsa, u którego obserwowano najniższą aktywację enzymów antyoksydacyjnych. Z kolei, u jęczmienia odnotowano najwyższą aktywność CAT w koleoptylach kontrolnych w porównaniu z resztą testowanych zbóż.

Po aplikacji jonów Mn odnotowano wzrost aktywności SOD we wszystkich zbożach. Zastosowanie 5 mM dawki Mn spowodowało ok. 25- 30 % wzrost aktywności dysmutaz, u odmian tolerancyjnych zbóż, który zwiększał się po zastosowaniu 10 mM Mn - u odmiany Parabola o ok. 45%, u CAM/B1 oraz u Bingo o ok. 60 %, w porównaniu do kontroli. Zdecydowanie wyższą aktywację SOD obserwowano u odmian wrażliwych, gdzie przy

dawce 5 mM u Rawety odnotowano wzrost na poziomie ok. 40 %, u Maresi ok. 66 % oraz u odmiany Siwek o ok. 82 % w stosunku do kontroli. Podobną tendencję wzrostową można było zaobserwować pod wpływem 10 mM Mn, przy którym zaobserwowano ok. 2- krotny wzrost u odmian: Raweta i Maresi oraz 2.5- krotny dla odmiany wrażliwej owsa w porównaniu do kontroli.

Aktywność POX u badanych odmian pszenicy zwiększała się wraz z ilością Mn w podłożu. Pod wpływem 10 mM Mn u Paraboli zarejestrowano 2-krotny wzrost aktywności tego enzymu natomiast u Rawety ok. 60 % w porównaniu do kontroli. W siewkach jęczmienia odnotowano podobną tendencję, w przypadku aplikacji 10 mM Mn obserwowano ok. 2- krotny wzrost niezależnie od tolerancji/wrażliwości odmian w porównaniu do kontroli. U odmiany odpornej owsa aktywność POX wzrastała przy zastosowanych dawkach Mn (odpowiednio 2 i 2.5- krotnie), w przeciwieństwie do odmiany wrażliwej, gdzie zaobserwowano zmniejszenie aktywności POX do ok. 50 % dla 10 mM Mn, w porównaniu z obiektami kontrolnymi.

W przypadku CAT wzrost aktywności zaobserwowano zarówno w tolerancyjnych jak i wrażliwych siewkach pszenicy oraz jęczmienia, zwłaszcza po traktowaniu 10 mM Mn, natomiast u tolerancyjnej odmiany owsa (Bingo) zmiany nie były istotne statystycznie niezależnie od zastosowanej dawki Mn w porównaniu do kontroli. U wrażliwej odmiany owsa (Siwek) odnotowano spadek aktywności CAT po zastosowaniu obydwu dawek Mn, najmocniejszy efekt (ok. 3- krotny) wyznaczono przy stężeniu 10 mM Mn.

## 4.1.4. Zawartości cukrów i skrobi

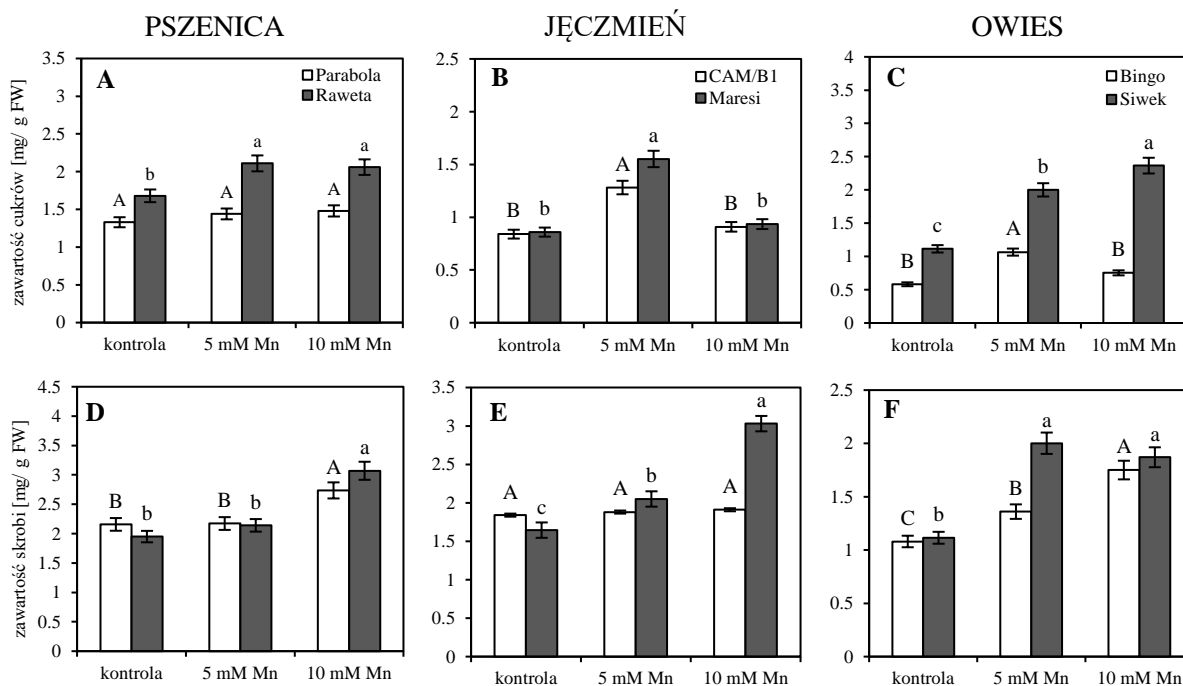


Fig. 9. Zawartość cukrów rozpuszczalnych oraz skrobi [mg/ g FW] w pierwszym liściu zbóż: pszenicy (Parabola i Raweta)- A; D, jęczmienia (CAM/ B1 i Maresi)- B; E oraz owsa (Bingo i Siwek)-C; F. Obiekty hodowane w wazonach podlewanych pożywką bez dodatku Mn (kontrola), z 5 mM  $MnCl_2$  (5 mM Mn) oraz z 10 mM  $MnCl_2$  (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm SE$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Zawartość cukrów rozpuszczalnych u roślin hodowanych w warunkach kontrolnych była wyższa u odmian wrażliwych niż u odmian tolerancyjnych (Fig. 9. A-C). Pod wpływem jonów manganu stężenie cukrów rozpuszczalnych zwiększało się, osiągając najwyższe wartości przy stężeniu 10 mM  $MnCl_2$ . Największą zmianę w ilości cukrów rozpuszczalnych (ok. 2- krotny wzrost) można było zaobserwować u odmiany Maresi przy dawce 5 mM Mn oraz u odmiany Siwek przy dawce 10 mM Mn. U odmian tolerancyjnych również obserwowano wzrost zawartości cukrów rozpuszczalnych (CAM/ B1 o ok. 40 %, Bingo o ok. 80% przy dawce 5 mM Mn). Wyjątek stanowiła odmiana Parabola, u której zastosowane stężenia Mn nie spowodowały istotnych zmian stężenia cukrów rozpuszczalnych.

Zawartość skrobi odnotowana w koleoptylach roślin kontrolnych była wyższa u odmian tolerancyjnych, z wyjątkiem owsa, gdzie stężenie skrobi było na podobnym poziomie u odmiany tolerancyjnej i wrażliwej (Fig. 9. D-F). U roślin eksponowanych na

działanie jonów manganu obserwowano wzrost akumulacji skrobi u obydwu odmian pszenicy przy dawce 10 mM  $MnCl_2$  (o ok. 25 % u Paraboli oraz o ok. 60 % u Rawety). U odmiany wrażliwej owsa (Siwek) najwyższy wzrost zawartości skrobi o ok. 80 % zarejestrowano przy dawce 5 mM. Natomiast w odmianie wrażliwej jęczmienia (Maresi) akumulacja skrobi wzrastała przy stężeniu 5 mM  $MnCl_2$  (o ok. 25 %), a przy 10 mM Mn (o ok. 85 %). U odmiany tolerancyjnej jęczmienia (CAM/ B1) nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie skrobi po zastosowaniu jonów manganu.

#### 4.1.5. Antyoksydanty niskocząsteczkowe

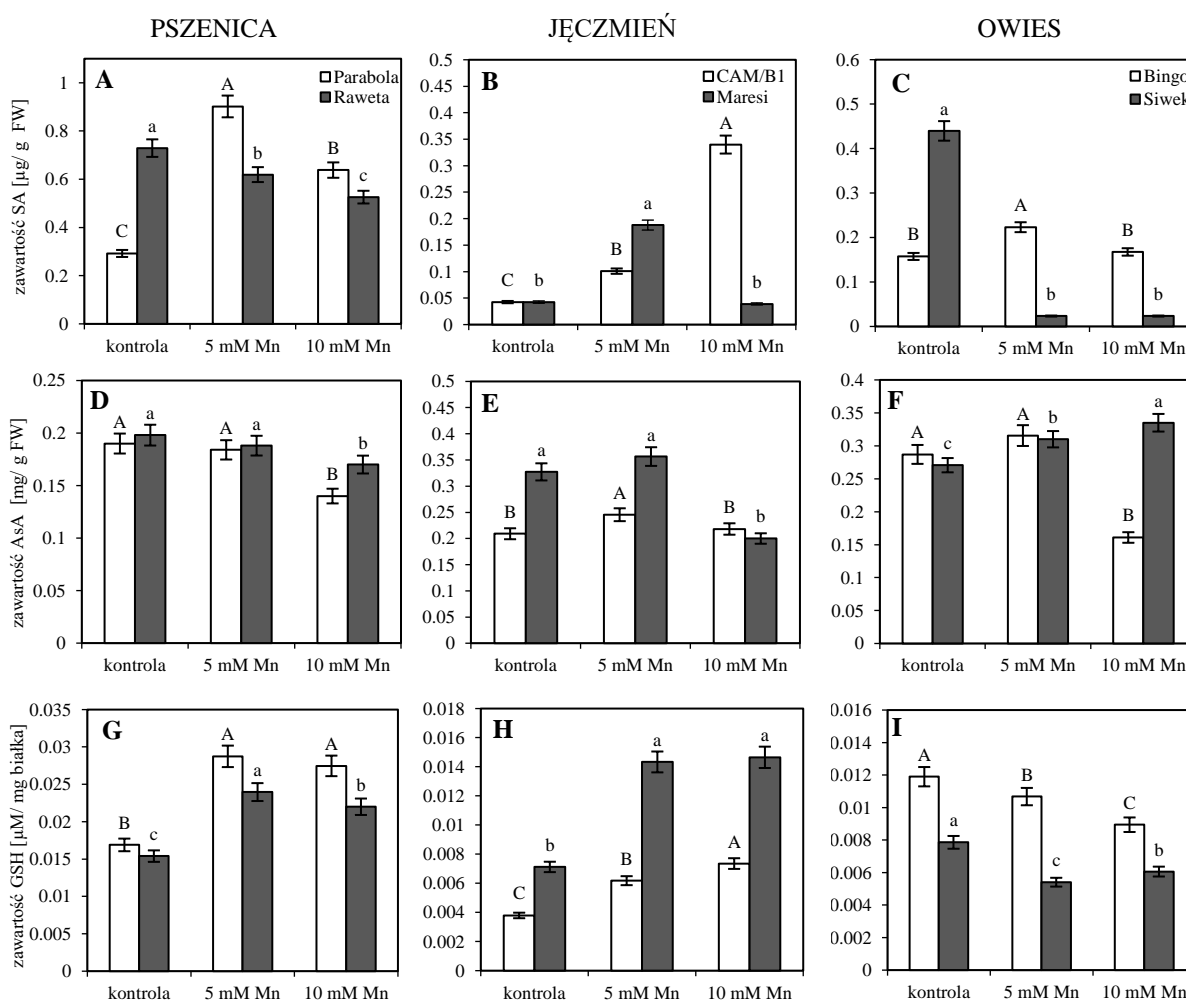


Fig. 10. Zawartość SA [ $\mu\text{g}/\text{g FW}$ ], zawartość AsA [ $\text{mg}/\text{g FW}$ ], zawartość GSH [ $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka] w pierwszym liściu zbóż: pszenicy (Parabola i Raweta)- A; D; G, jęczmieniu (CAM/ B1 i Maresi)- B; E; H oraz owsie (Bingo i Siwek)-C; F, I. Obiekty hodowane w wazonach podlewanych pożywką bez dodatku Mn (kontrola), z 5 mM  $MnCl_2$  (5 mM Mn) oraz z 10 mM  $MnCl_2$  (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm$ SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Stężenie kwasu salicylowego (SA) (Fig. 10. A-C) w roślinach kontrolnych pszenicy i owsa było wyższe u odmian wrażliwych. Wzrost koncentracji SA zarejestrowano u wszystkich odmian tolerancyjnych po zastosowaniu dawki 5 mM Mn. Największą zmianę ok. 3-krotną odnotowano u odmiany Parabola, a najmniejszą - ok. 30 % u odmiany Bingo w porównaniu z obiektami kontrolnymi. Narażenie na stężenie 10 mM Mn spowodowało dalszy wzrost zawartości SA ok. 3.5-krotny u odmiany CAM/ B1, podczas gdy u odmiany Parabola i Bingo wykazano spadek stężenia SA odpowiednio o ok. 30 % i 25 % w porównaniu z roślinami traktowanymi niższą dawką Mn. Obniżenie ilości SA pod wpływem 5 mM Mn zarejestrowano u odmiany wrażliwej pszenicy (Raweta) o ok. 15 % i owsa (Siwek) ok. 7-krotne, w przeciwieństwie do odmiany wrażliwej jęczmienia (Maresi), gdzie odnotowano ok. 3.5-krotny wzrost tego parametru w porównaniu do kontroli. Wyższa dawka Mn (10 mM Mn), u odmiany Raweta powodowała dalszy spadek stężenia SA (o ok. 12 %), natomiast u odmiany Siwek nie zarejestrowano statystycznie istotnych różnic w porównaniu z roślinami traktowanymi 5 mM Mn.

Najwyższe stężenie kwasu askorbionowego (AsA) (Fig. 10. D-F) wykazano u odmiany wrażliwej jęczmienia (Maresi) w koleoptylach kontrolnych. U wszystkich odmian, z wyjątkiem odmiany wrażliwej owsa oraz odmiany tolerancyjnej jęczmienia, najwyższa dawka Mn (10 mM Mn) spowodowała istotny spadek zawartości AsA - największe różnice obserwowano u odmiany Bingo – o ok. 50 % oraz u odmiany Maresi - o ok. 40 % w porównaniu do kontroli. Natomiast przy stężeniu 5mM Mn nie zarejestrowano zmian w ilości kwasu askorbinowego u tych odmian. U odmiany Siwek obie zastosowane dawki Mn (5 oraz 10 mM) spowodowały wzrost stężenia AsA odpowiednio o ok. 15 % i 23 % w porównaniu do kontroli. U odmiany CAM/B1 po aplikacji 5 mM Mn zaobserwowano wzrost zawartości AsA o ok 10 %, podczas gdy aplikacja 10 mM Mn nie spowodowała istotnych różnic w odniesieniu do roślin kontrolnych.

Najwyższą zawartość glutationu (GSH) (Fig. 10. G-I) odnotowano w kontroli w siewkach pszenic Parabola i Raweta. Ekspozycja na jony Mn spowodowała istotny wzrost stężenia GSH w koleoptylach pszenicy (Parabola ok. 65 %, Raweta ok. 50 %) i jęczmienia (CAM/ B1 ok. 60% i Maresi ok. 2-krotny) niezależnie od dawki w porównaniu do kontroli. Odwrotny efekt obserwowano u odmian owsa, gdzie dodatek manganu spowodował spadek zawartości GSH u odmiany Bingo o ok. 10 % (5 mM Mn) i o ok. 25 % (10 mM Mn) oraz u odmiany Siwek o ok. 30 % (5 mM Mn) i o ok. 23 % (10 mM Mn) w porównaniu do kontroli.

## 4.1.6. Prolina i metabolizm proliny

Tab. 3. Koncentracja proliny [ $\mu\text{mol}/\text{g FW}$ ] oraz aktywność enzymów syntezy proliny: P5CS [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] i OAT [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ], oraz rozkładu proliny - PHD [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ], w koleoptylach zbóż (pszenica: Parabola i Raweta, jęczmień: CAM/ B1 i Maresi, owies: Bingo i Siwek). Obiekty hodowane w wazonach podlewanych pożywką bez dodatku Mn (kontrola), z 5 mM  $\text{MnCl}_2$  (5 mM Mn) oraz z 10 mM  $\text{MnCl}_2$  (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Odmiana	Traktowanie	Prolina [ $\mu\text{mol}/\text{g FW}$ ]	P5CS [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] · 10 <sup>-2</sup>	OAT [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] · 10 <sup>-2</sup>	PHD [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] · 10 <sup>-3</sup>
Pszenica					
Parabola	kontrola	5.01±0.15 <sup>c</sup>	1.22±0.07 <sup>c</sup>	2.21±0.10 <sup>c</sup>	3.41±0.15 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	6.08±0.10 <sup>b</sup>	5.23±0.12 <sup>b</sup>	3.12±0.11 <sup>b</sup>	3.45±0.13 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	7.85±0.12 <sup>a</sup>	8.32±0.17 <sup>a</sup>	3.78±0.13 <sup>a</sup>	3.42±0.09 <sup>a</sup>
Raweta	kontrola	4.63±0.16 <sup>c</sup>	3.24±0.10 <sup>c</sup>	1.90±0.08 <sup>c</sup>	3.18±0.17 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	8.79±0.11 <sup>b</sup>	8.43±0.14 <sup>b</sup>	3.89±0.15 <sup>b</sup>	3.23±0.14 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	11.30±0.12 <sup>a</sup>	12.24±0.16 <sup>a</sup>	4.72±0.13 <sup>a</sup>	3.29±0.10 <sup>a</sup>
Jęczmień					
CAM/ B1	kontrola	5.16±0.20 <sup>c</sup>	1.73±0.07 <sup>c</sup>	1.89±0.12 <sup>c</sup>	3.30±0.10 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	6.22±0.15 <sup>b</sup>	5.33±0.12 <sup>b</sup>	2.69±0.11 <sup>b</sup>	3.42±0.15 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	8.20±0.17 <sup>a</sup>	8.22±0.13 <sup>a</sup>	3.41±0.18 <sup>a</sup>	3.21±0.14 <sup>a</sup>
Maresi	kontrola	6.09±0.10 <sup>c</sup>	2.19±0.14 <sup>c</sup>	1.72±0.11 <sup>c</sup>	3.22±0.16 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	8.37±0.16 <sup>b</sup>	8.13±0.21 <sup>b</sup>	2.81±0.16 <sup>b</sup>	3.29±0.13 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	12.50±0.17 <sup>a</sup>	10.01±0.19 <sup>a</sup>	4.88±0.10 <sup>a</sup>	3.31±0.13 <sup>a</sup>
Owies					
Bingo	kontrola	5.26±0.12 <sup>c</sup>	1.62±0.19 <sup>c</sup>	1.71±0.15 <sup>b</sup>	3.68±0.10 <sup>a</sup>
	5 mM Mn	6.41±0.18 <sup>b</sup>	8.12±0.21 <sup>b</sup>	2.24±0.08 <sup>a</sup>	3.76±0.11 <sup>a</sup>
	10 mM Mn	9.80±0.16 <sup>a</sup>	11.11±0.18 <sup>a</sup>	2.26±0.12 <sup>a</sup>	3.69±0.08 <sup>a</sup>
Siwek	kontrola	6.11±0.11 <sup>c</sup>	4.83±0.10 <sup>c</sup>	1.73±0.15 <sup>b</sup>	3.60±0.07 <sup>b</sup>
	5 mM Mn	9.02±0.16 <sup>a</sup>	8.10±0.10 <sup>a</sup>	2.14±0.13 <sup>a</sup>	3.49±0.10 <sup>b</sup>
	10 mM Mn	8.63±0.13 <sup>b</sup>	6.07±0.12 <sup>b</sup>	2.12±0.09 <sup>a</sup>	5.10±0.15 <sup>a</sup>

Stężenie proliny u wszystkich odmian tolerancyjnych w warunkach kontrolnych plasowało się na podobnym poziomie. U odmian wrażliwych testowanych zbóż poziom proliny w warunkach kontrolnych był wyższy zwłaszcza w siewkach jęczmienia i owsa w porównaniu do odmian tolerancyjnych. Zastosowanie jonów Mn spowodowało wzrost zawartości proliny we wszystkich badanych obiektach wraz ze zwiększeniem stężenia Mn (ok. 1.5- krotnie i ok. 2-krotnie, odpowiednio pod wpływem dawki 5 i 10 mM  $\text{MnCl}_2$ ). Wyjątek stanowiła odmiana wrażliwa owsa (Siwek), gdzie odnotowano niewielki spadek zawartości proliny przy stężeniu 10 mM Mn w porównaniu z dawką 5 mM Mn.

Zmiany aktywności enzymów biorących udział w szlakach syntezy i rozkładu proliny przedstawiono w Tabeli 3. Zaobserwowano istotne różnice w aktywności syntazy D1-pirolino-5-karboksylianowej (P5CS) między badanymi odmianami w tkankach kontrolnych, jednakże obniżona aktywacja P5CS była rejestrowana u obiektów

tolerancyjnych. Aplikacja jonów Mn spowodowała istotny wzrost aktywności P5CS u wszystkich odmian w porównaniu z kontrolą. Po zastosowaniu dawki 5 mM Mn wartości te były wyższe ok. 4- krotnie i 2.5- krotnie (odpowiednio dla Paraboli i Rawety), 5- krotnie i 2- krotnie (odpowiednio dla Bingo i Siwka) oraz około 3-krotnie i 4-krotnie dla CAM/B1 i Maresi. Pod wpływem 10 mM Mn odnotowano większe zmiany aktywności P5CS (z wyjątkiem Siwka) około 6- krotne i 3.5- krotne odpowiednio dla Paraboli i Rawety, 7- krotne dla Bingo oraz odpowiednio 5- krotne 4.5- krotne dla CAM/B1 i Maresi.

Aktywność d-aminotransferazy ornityny (OAT) we wszystkich testowanych obiektach kontrolnych była obserwowana na podobnym poziomie, niezależnie od odmiany i rodzaju zboża. W obecności jonów Mn w pszenicy i jęczmieniu aktywność tego enzymu zwiększała się wraz ze wzrostem dawki. U odmian owsa dawka 5 mM Mn spowodowała wzrost aktywności OAT (o ok. 30 %), natomiast podwyższanie dawki Mn do 10 mM nie wpłynęło na dalsze zwiększanie aktywności tego enzymu.

Aktywność dehydrogenazy prolinowej (PHD) w próbach kontrolnych była najwyższa w liściach owsa (o ok. 7 – 8 %) w porównaniu z pszenicą i jęczmieniem. Aplikacja manganu zwiększyła aktywność tego enzymu jedynie u wrażliwej odmiany owsa o ok. 40 % przy dawce 10 mM Mn, natomiast w pozostałych badanych odmianach nie odnotowano istotnych różnic w aktywacji PHD.



## 4.1.7. Zawartość chlorofilu a oraz b

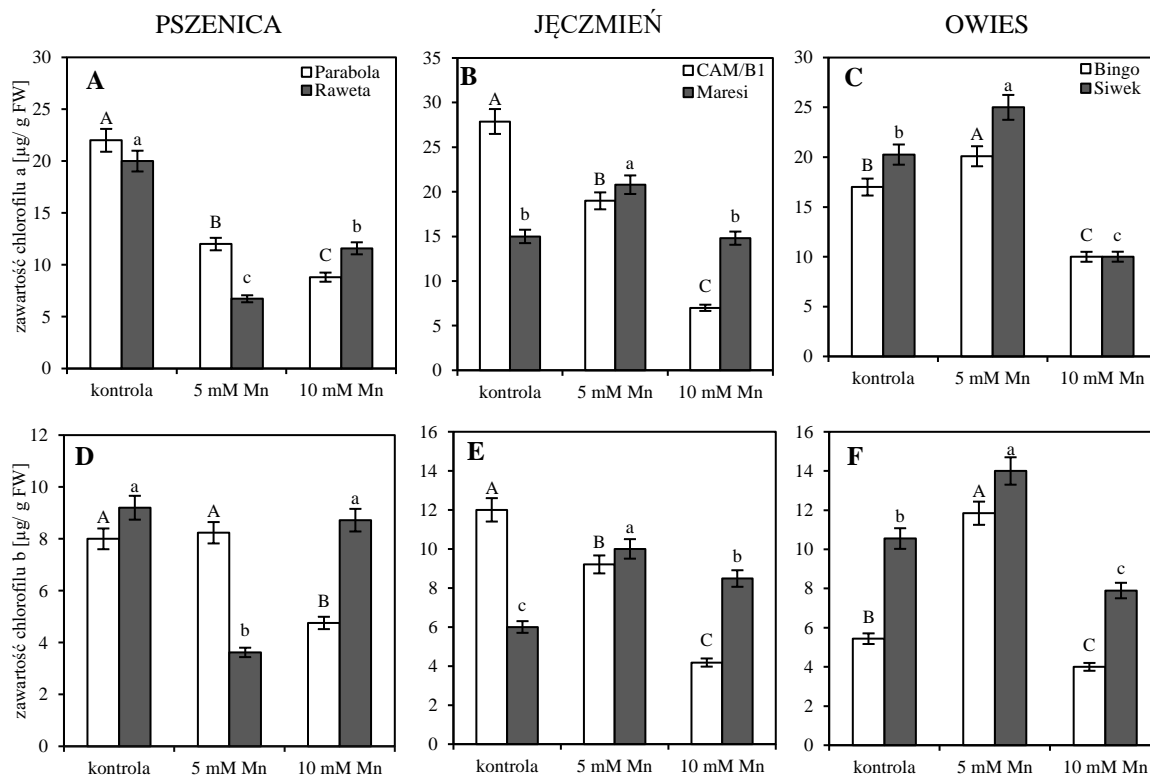


Fig. 11. Zawartość chlorofilu a i b [ $\mu\text{g/g FW}$ ] w koleoptylach pszenicy (*Parabola* i *Raweta*)- A; D, jęczmienia (*CAM/ B1* i *Maresi*)- B; E oraz owsa (*Bingo* i *Siwek*)-C; F. Obiekty hodowane w wazonach podlewanych pożywką bez dodatku Mn (kontrola), z 5 mM  $\text{MnCl}_2$  (5 mM Mn) oraz z 10 mM  $\text{MnCl}_2$  (10 mM Mn). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

W roślinach kontrolnych najwyższą zawartość chlorofilu a oraz b odnotowano u jęczmienia odmiany *CAM/ B1*, podczas gdy najniższą ilość barwników zaobserwowano u tolerancyjnej odmiany owsa (*Bingo*). W roślinach hodowanych na podłożach z dodatkiem jonów Mn odnotowano spadek zawartości chlorofilu a u obydwu odmian pszenicy oraz u odmiany tolerancyjnej jęczmienia (*CAM/ B1*) (Fig. 11. A - B) w porównaniu do kontroli. Przy czym u odmiany *Parabola* oraz *CAM/B1* spadek zawartości barwnika był zależny od zastosowanej dawki Mn, natomiast w koleoptylach odmiany *Raweta* ok. 3- krotny spadek zaobserwowano po aplikacji 5 mM  $\text{MnCl}_2$ . W siewkach odmiany wrażliwej jęczmienia po podaniu 5 mM Mn wykazano wzrost zawartości chlorofilu a w porównaniu do kontroli. Podobną tendencję odnotowano u obydwu odmian owsa (Fig. 11. C), gdzie aplikacja 5 mM Mn wpłynęła na podwyższenie zawartości chlorofilu a (u odmiany *Bingo* o ok. 20 %, u odmiany *Siwek* o ok. 25 %), równocześnie przy 10 mM Mn wykazano spadek stężenia tego barwnika (u *Bingo* o ok. 10 %, u *Siwek* o ok. 25 %) w stosunku do kontroli.

W tkankach testowanych pszenic zawartość chlorofilu b (Fig. 11. D) obniżała się, przy czym istotną zmianę u odmiany tolerancyjnej zaobserwowano jedynie po zastosowaniu 10 mM Mn (o ok. 40 %), podczas gdy u odmiany wrażliwej tylko pod wpływem dawki 5 mM Mn (ok. 2.5- krotne obniżenie). U odmiany CAM/ B1 zawartość chlorofilu b była zależna od zastosowanej dawki Mn i zmniejszała się wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia Mn (ok. 3- krotny spadek po ekspozycji na stężenie 10 mM Mn) (Fig. 11. E). Narażenie na jony Mn spowodowało zwiększenie zawartości chlorofilu b u odmiany Maresi, przy czym najwyższy - ok. 66 % wzrost obserwowano po podaniu 5 mM Mn w porównaniu do kontroli. U obydwu odmian owsa odnotowano podobny kierunek zmian (Fig. 11. F) aplikacja 5 mM Mn spowodowała wzrost zawartości chlorofilu b (ok. 2- krotny u odmiany Bingo, i o ok. 32 % u odmiany Siwek) natomiast podanie dawki 10 mM Mn skutkowało redukcją ilości chlorofilu b o ok. 25 % zarówno u tolerancyjnej jak i wrażliwej odmiany owsa w stosunku do kontroli.

#### 4.2. Druga część badań

Zdolność roślin do akumulacji selenu (Se) jest warunkowana w zależności od gatunku lub nawet odmiany. Zwiększenie absorpcji Se w produktach roślinnych może być sposobem na wprowadzenie dodatkowych ilości tego pierwiastka do łańcucha troficznego: roślina - zwierzę / człowiek. Pomimo tego, że selen nie jest niezbędnym pierwiastkiem dla roślin wyższych to w niskich stężeniach działa korzystnie poprzez stymulowanie wzrostu oraz aklimatyzacji do warunków środowiskowych [Pilon-Smits i wsp. 2009]. Pozytywny efekt Se został wykazany jako zmniejszenie peroksydacji lipidów oraz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Przypuszcza się, że mechanizm ochrony opartej na zastosowaniu jonów Se polega na blokowaniu wychwytu i transportu substancji toksycznych oraz zmniejszeniu nadprodukcji RFT [Koselski i wsp. 2019].

Rośliny narażone na stres suszy, którym aplikowano Se wykazywały zwiększoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych przede wszystkim CAT i POX, a także wzrost stężenia antyoksydantów AsA i GSH oraz węglowodanów [Proietti i wsp. 2013; Ibrahim 2014; Emam i wsp. 2014]. Istnieją również doniesienia, że Se może nasilać spontaniczne dysproporcjonowanie rodników ponadtlenkowych, a tym samym zmniejszać zapotrzebowanie na aktywność dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) jednak mechanizmy takiego efektu są nadal w dużej mierze nieznane [Filek i wsp. 2008].

Dodatkowo stosowanie selenu może zmniejszać akumulację metali ciężkich i w ten sposób ograniczać ich toksyczne działanie [Filek i wsp. 2009; Bernat i wsp. 2014]. Filek i wsp. [2010] wykazali, że Se wpływa na wzrost wydajności fotosyntezy u roślin w warunkach stresu metali ciężkich. Ze względu na to, że w poprzednim eksperymencie wskazano siewki pszenicy jako najbardziej odporne wśród badanych zbóż, dlatego następne badania zaplanowano tylko na siewkach pszenicy odmian różniących się odpornością na stres oksydacyjny. W celu sprawdzenia czy selen będzie działał ochronnie również w warunkach stresu manganowego przeprowadzono eksperyment hydroponiczny na siewkach pszenicy odmian: Nimfa i Alibi.

## 4.2.1. Markery stresu

Tab. 4. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) [ $\mu\text{mol/g}$ ] oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  [ $\mu\text{mol/g FW}$ ] w liściach i korzeniach pszenicy dwóch odmian: Nimfa i Alibi. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM  $\text{MnCl}_2$  (Mn), 10 mM  $\text{MnCl}_2$  + 15  $\mu\text{M}$   $\text{Se}_2\text{Cl}_2$  (Mn+ Se) oraz z 15  $\mu\text{M}$   $\text{Se}_2\text{Cl}_2$  (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Odmiana	Traktowanie	MDA [ $\mu\text{mol/g FW}$ ]	$\text{H}_2\text{O}_2$ [ $\mu\text{mol/g FW}$ ]
LIŚCIE			
Nimfa	Kontrola	0.008 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
	Mn	0.028 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	Mn+ Se	0.025 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
	Se	0.008 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Alibi	Kontrola	0.008 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
	Mn	0.029 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	Mn+ Se	0.022 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>
	Se	0.007 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
KORZENIE			
Nimfa	Kontrola	0.008 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	Mn	0.018 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	Mn+ Se	0.013 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	Se	0.007 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Alibi	Kontrola	0.008 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
	Mn	0.015 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	Mn+ Se	0.010 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
	Se	0.007 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

Peroksydacja lipidów, rejestrowana jako poziom MDA, była nieco wyższa u odmiany Alibi i różniła się w zależności od rodzaju tkanki (korzenie > liście) (Tab. 4.). Po aplikacji Mn ilość MDA wzrosła około trzykrotnie w liściach i około 1.5- 2 razy w korzeniach obydwu odmian pszenicy. Rośliny hodowane na pożywkach Mn + Se wykazywały niższe wartości MDA w porównaniu z tymi, które zostały wystawione na działanie wyłącznie jonów Mn. Wyjątek stanowiły liście odmiany Nimfa, w których nie stwierdzono istotnych różnic między traktowaniem Mn+Se i Mn. Odmiana Nimfa wyhodowana na pożywkę zawierającej tylko Se miała podobny poziomy MDA w stosunku do kontroli zarówno w liściach jak i korzeniach, podczas gdy w liściach Alibi zarejestrowano spadek MDA w porównaniu z kontrolą.

Stężenie  $\text{H}_2\text{O}_2$  było wyższe w liściach w porównaniu do korzeni u obydwu badanych odmian (Tab. 4.). W roślinach kontrolnych nie stwierdzono istotnych różnic zawartości tego związku pomiędzy badanymi roślinami. Po aplikacji Mn obie odmiany wykazały podwyższoną koncentrację  $\text{H}_2\text{O}_2$  w liściach o około 60 %, podczas gdy w korzeniach

zawartość  $H_2O_2$  wzrosła od około 3- do 5- krotnie (wyższe parametry zarejestrowano w odmianie Nimfa). W przypadku roślin hodowanych na pożywce z Mn i Se nastąpiła redukcja ilości  $H_2O_2$  w liściach obydwu odmian w stosunku do roślin eksponowanych wyłącznie na jony Mn, jednakże większe zmiany obserwowano dla odmiany Alibi. W korzeniach roślin hodowanych w obecności zarówno Mn i Se poziom nadtlenku wodoru obniżał się w porównaniu z Mn podanym indywidualnie. Obecność samego Se w pożywce nie wpływała istotnie na poziom  $H_2O_2$  badanych obiektów, a jego stężenie zarówno w liściach, jak i korzeniach było zbliżone do kontrolnego.

#### 4.2.2. Prolina i metabolizm proliny

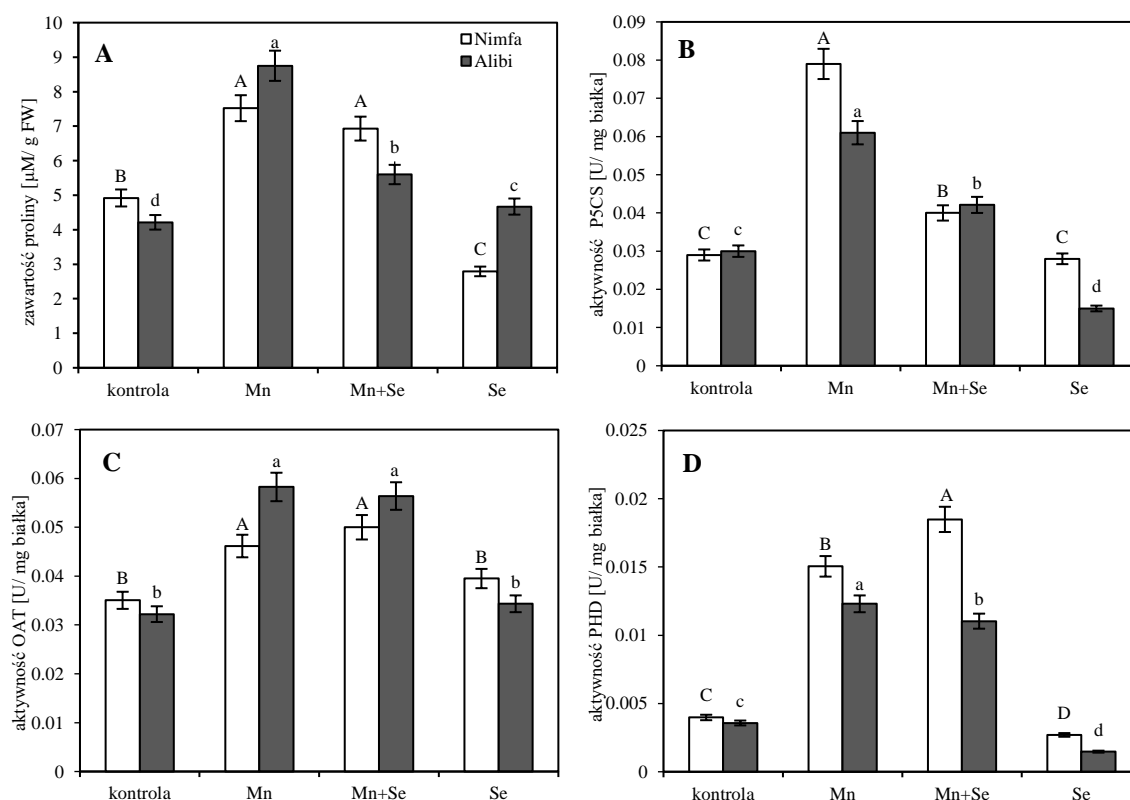


Fig. 12. Poziom proliny [ $\mu\text{M}/\text{g FW}$ ] - A oraz aktywność enzymów P5CS [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] - B i OAT [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] - C oraz PHD [ $\text{U}/\text{mg białka}$ ] - D, w liściach pszenicy odmian Nimfa i Alibi. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z  $10\text{ mM MnCl}_2$  (Mn),  $10\text{ mM MnCl}_2 + 15\text{ }\mu\text{M Se}_2\text{Cl}_2$  (Mn+ Se) oraz z  $15\text{ }\mu\text{M Se}_2\text{Cl}_2$  (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncan.

W roślinach kontrolnych wyższą zawartość proliny odnotowano u odmiany Nimfa (Fig. 12. A). Zastosowanie Mn podwyższyło poziom proliny u badanych odmian jednak większy wzrost ok. 2- krotny odnotowano u odmiany Alibi. Jednoczesne stosowanie Mn i Se

zmniejszyło ilość proliny u odmiany Nimfa, natomiast w siewkach Alibi nie zarejestrowano istotnych różnic w porównaniu z roślinami traktowanymi samym Mn. Selen dodawany pojedynczo do pożywki nie wywoływał istotnych zmian w porównaniu z kontrolą.

Zaobserwowano podobny poziom aktywacji P5CS w roślinach kontrolnych (Fig. 12. B). Aplikacja Mn zwiększyła aktywność P5CS zarówno u odmiany Nimfa (ok. 2.5- krotnie) jak i Alibi (ok. 2- krotnie). Dodanie 15  $\mu$ M Se z 10 mM Mn hamowało aktywność P5CS w siewkach obydwu odmian (Nimfa o ok. 50 %, Alibi o ok. 31 %) w porównaniu do roślin narażonych na działanie jonów Mn. Traktowanie Se obniżyło aktywność P5CS u odmiany Alibi w porównaniu z kontrolą.

Nie odnotowano różnic w aktywności OAT pomiędzy odmianami hodowanymi w warunkach kontrolnych (Fig 12. C). Po zastosowaniu pożywki z jonami Mn zaobserwowano znaczny wzrost aktywności OAT u odmiany Nimfa o ok. 31 %, u odmiany Alibi o ok. 80 %. Dodatek Se do pożywki wzbogaconej Mn nie wpłynął znacząco na aktywność OAT w porównaniu z traktowaniem samymi jonami Mn w testowanych odmianach. W siewkach obydwu odmian, obecność Se spowodowała nieznaczne zwiększenie aktywności OAT w porównaniu z kontrolą.

Podobny poziom aktywności PHD zarejestrowano w siewkach kontroli Nimfa i Alibi (Fig. 12. D). Zastosowanie manganu zwiększyło aktywność tego enzymu ok. 3.5- krotnie zarówno u odmiany Nimfa jak i Alibi w porównaniu do kontroli. Obecność Mn w połączeniu z Se hamowała aktywność PDH u odmiany Alibi (ok. 10 %), w przeciwieństwie do siewek odmiany Nimfa, w których zaobserwowano istotny ok. 22 % wzrost aktywności tego enzymu w porównaniu do roślin narażonych wyłącznie na jony Mn. Se dodany indywidualnie zmniejszał aktywność PHD w siewkach badanych odmian w stosunku do kontroli.

## 4.2.3. Potencjały antyoksydacyjne

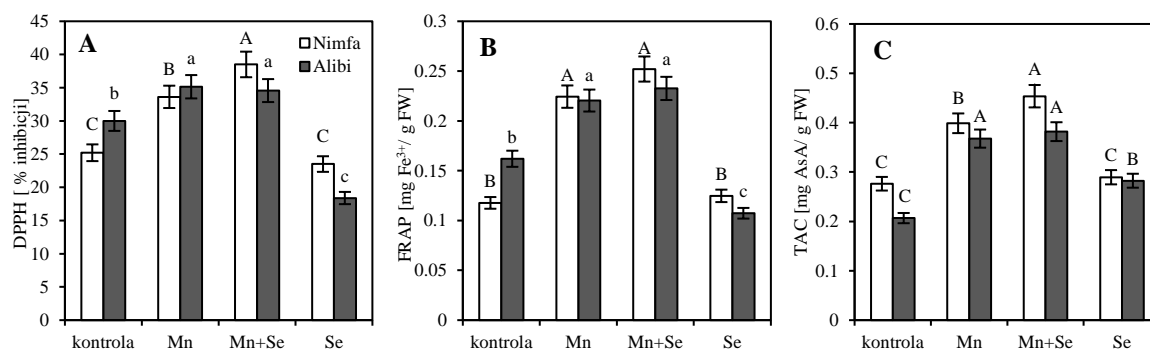


Fig. 13. Potencjał antyoksydacyjny: DPPH [% inhibicji] – A, FRAP [mg Fe<sup>3+</sup>/g FW] – B i TAC [mg AsA/g FW] – C, w liściach pszenicy odmian: Nimfa i Alibi. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (Mn), 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Mn+ Se) oraz z 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą (P ≤ 0.05) wg testu Duncana.

W warunkach kontrolnych niższy poziom inhibitowanego DPPH (Fig. 13. A) zarejestrowano dla odmiany Nimfa. Siewki eksponowane na jony Mn wykazywały wyższy % inhibicji rodnika DPPH w stosunku do kontroli. Dodatek Se do pożywki z Mn zwiększył zdolność do redukcji rodnika DPPH u odmiany Nimfa w porównaniu z roślinami traktowanymi samymi jonami Mn. Samo dodanie Se indywidualnie zmniejszyło skuteczność antyoksydantów do reagowania z rodnikiem DPPH u odmiany Alibi w porównaniu z kontrolą, natomiast u odmiany Nimfa nie odnotowano istotnych różnic.

Wśród siewek kontroli wyższe stężenie jonów żelaza (III) zarejestrowano u odmiany Alibi (Fig. 13. B). Po aplikacji jonów Mn i Mn+Se odnotowano wzrost zawartości Fe<sup>3+</sup> większy u odmiany Nimfa (ok. 2- krotny). Dodatek Se do pożywki zawierającej jony Mn nie spowodował statystycznie istotnych różnic w porównaniu do roślin wystawionych na toksyczne działanie związku Mn. Po indywidualnym zastosowaniu Se zaobserwowano obniżenie stężenia jonów Fe<sup>3+</sup> tylko u odmiany Alibi natomiast u odmiany Nimfa nie odnotowano różnic w stosunku do kontroli.

Pomiary potencjału antyoksydacyjnego (TAC- total antioxidant capacity) wykazały wyższą zdolność do dezaktywacji rodników u odmiany Nimfa hodowanej w warunkach kontroli (Fig. 13. C). Skuteczność antyoksydacyjna wzrosła po zastosowaniu jonów Mn i w połączeniu z Se, większa zmiana ok. 2- krotna została zarejestrowana u odmiany Alibi w porównaniu do kontroli. Wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej po zastosowaniu

samego Se odnotowano u odmiany Alibi, natomiast u odmiany Nimfa nie zaobserwowano istotnych różnic w porównaniu do kontroli.

#### 4.2.4. Zawartość manganu oraz selenu

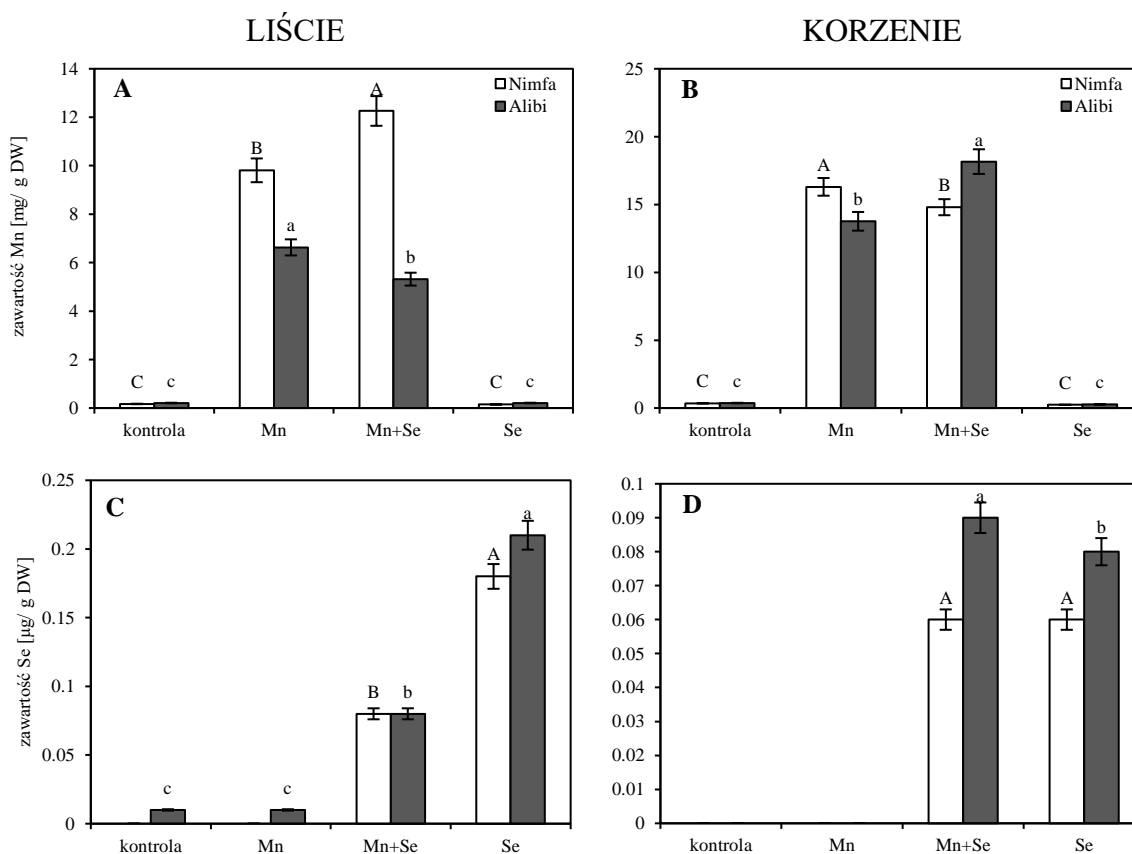


Fig. 14. Zawartość manganu (A, B) oraz selenu (C, D) w liściach [mg/ g DW] oraz korzeniach [µg/ g DW] pszenicy odmian: Nimfa i Alibi. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (Mn), 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 15 µM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Mn+ Se) oraz z 15 µM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Siewki kontrolne obydwu odmian gromadziły większą ilość Mn w korzeniach niż w liściach (Fig. 14. A-B). Dodatek Mn do pożywki spowodował znaczny wzrost zawartości tego pierwiastka zarówno w liściach jak i korzeniach, przy czym wyższą koncentrację Mn ok. 57- krotną zarejestrowano w liściach, podczas gdy 45- krotną w korzeniach odmiany Nimfa w porównaniu do kontroli. W liściach Alibi zaobserwowano ok. 31- krotny wzrost Mn natomiast w korzeniach ok 37- krotny wzrost tego pierwiastka w stosunku do roślin kontroli. Równoczesna aplikacja Mn i Se spowodowała nieznaczne podwyższenie poziomu Mn w liściach oraz obniżenie w korzeniach u odmiany Nimfa, natomiast u Alibi



zaobserwowano odwrotny efekt (w porównaniu do siewek traktowanych Mn). Suplementacja Se nie wpływała na zawartość Mn w liściach badanych odmian, ale zmniejszała stężenie Mn w tkankach korzeni.

Analiza zawartości Se w badanych obiektach wykazała jedynie śladowe ilości tego pierwiastka w liściach odmiany Alibi w wariancie kontrolnym oraz po narażeniu na Mn (Fig. 14. C-D). W korzeniach dodatek Se, zarówno samego, jak i z Mn, zwiększył zawartość Se od około 6- do 9- krotnie odpowiednio dla odmian Nimfa i Alibi. W liściach obydwu odmian obecność jonów Mn z jonami Se ponad dwukrotnie zmniejszyła wychwyt samego Se w porównaniu z aplikacją jonów Se indywidualnie.

#### 4.2.5. Makroelementy

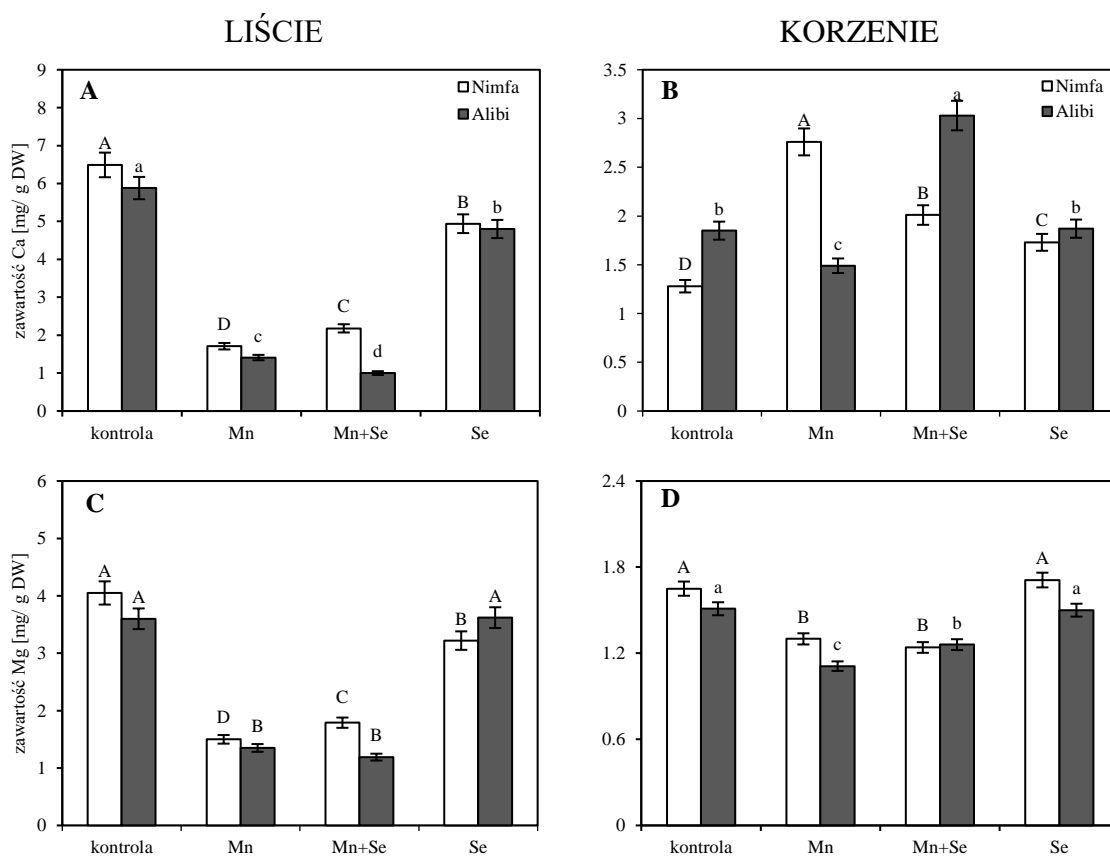


Fig. 15. Stężenia makroelementów [mg/ g DW] w liściach oraz korzeniach siewek pszenicy: wapnia (Ca)- A, B, magnezu (Mg)-C, D. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (Mn), 10 mM MnCl<sub>2</sub> +15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Mn+ Se) oraz z 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą (P ≤ 0.05) wg testu Duncana.

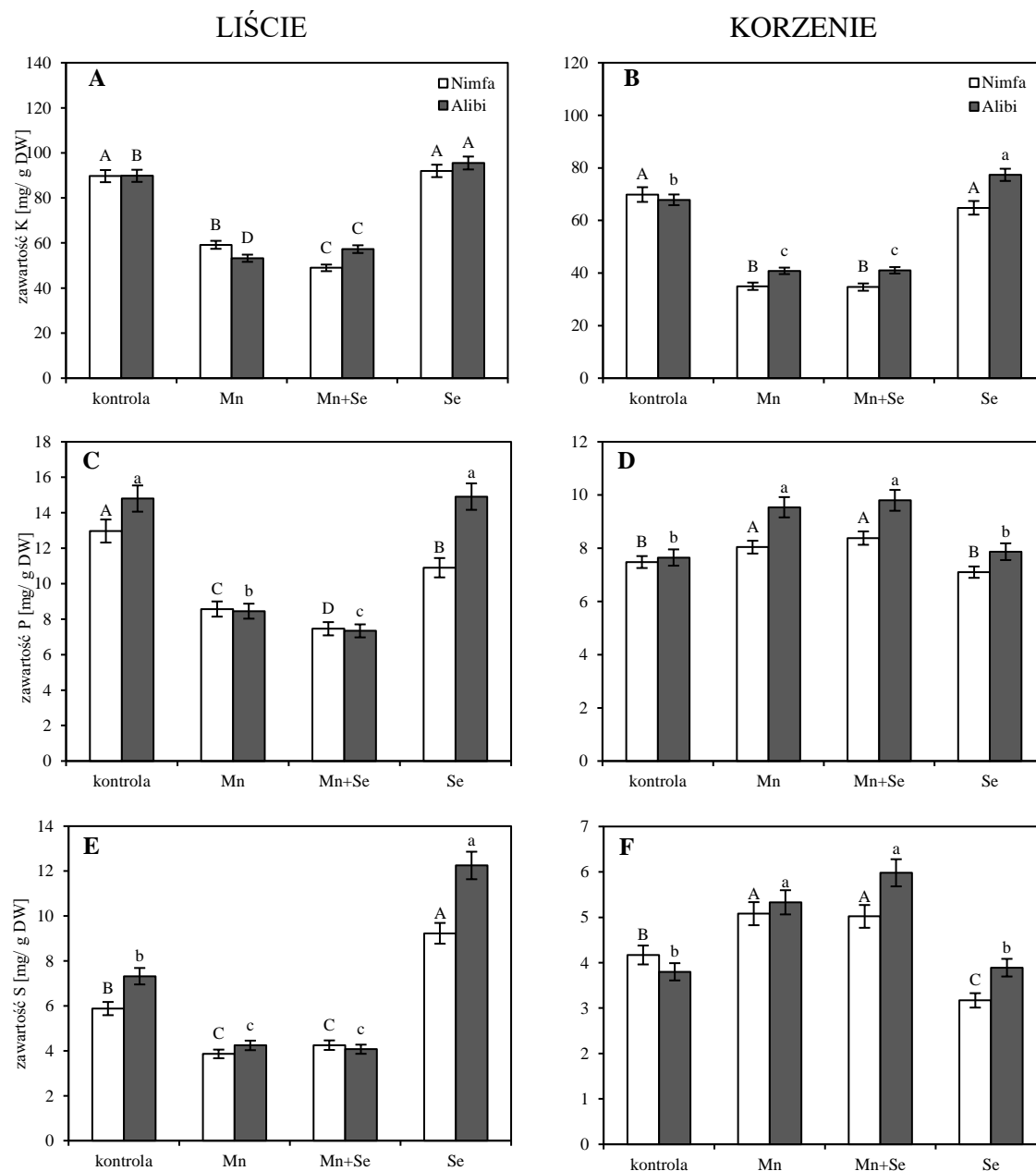


Fig. 16. Stężenia makroelementów [mg/ g DW] w liściach oraz korzeniach siewek pszenicy: potasu (K)- A, B, fosforu (P)-C, D i siarki (S)- E, F. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM MnCl<sub>2</sub> (Mn), 10 mM MnCl<sub>2</sub> + 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Mn+ Se) oraz z 15 μM Se<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń ±SE. Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Testowane rośliny różniły się zawartością makroelementów. W kontrolnych liściach u odmiany Nimfa zarejestrowano wyższe stężenie Ca, natomiast niższe K i S niż u odmiany Alibi (Fig. 15. A, Fig. 16. A, E). Dodanie do pożywki jonów Mn istotnie redukowało zawartość wszystkich makroelementów w liściach testowanych roślin, u odmiany Alibi zarejestrowano większy spadek zawartości K, P i S (ok. 40%) niż u odmiany Nimfa

(ok. 30 %) (Fig 16. A, C, E). U obydwu odmian zarejestrowano podobne obniżenie stężenia Mg o ok. 60 % oraz Ca o ok. 70 % u roślin traktowanych jonami Mn w porównaniu do kontroli (Fig. 15. A, C). Dodatek jonów Se do pożywki zawierającej Mn spowodował zmniejszenie zawartości P w liściach obydwu odmian o ok. 15 %, a także K u odmiany Nimfa o ok. 15 %, natomiast u odmiany Alibi zarejestrowano spadek zawartości Ca o ok. 30 % i Mg o ok. 10 % w porównaniu z roślinami narażonymi na działanie samego Mn (Fig. 15. A, C; Fig. 16. A, C). Dodatek do pożywki samych jonów Se u odmiany Nimfa spowodował spadek zawartości Ca i Mg o ok. 25 % oraz P o ok. 15 %, przy równoczesnym wzroście stężenia S o ok. 58 % w stosunku do kontroli. U odmiany Alibi zarejestrowano spadek koncentracji Ca o ok. 17 % oraz wzrost stężenia S o ok. 69 % w roślinach w porównaniu do kontroli.

W systemie korzeniowym zarejestrowano wyższą koncentrację Ca u odmiany Alibi, a Mg i S u odmiany Nimfa w roślinach kontroli (Fig. 15. B, D; Fig. 16. F). W obecności nadmiaru jonów Mn odnotowano wzrost zawartości P i S w korzeniach odpowiednio o ok. 25% i 40% u odmiany Nimfa oraz o ok. 10 % i 20 % u odmiany Alibi (Fig. 16. D, F). Dodatkowo w korzeniach odmiany Nimfa wykazano zmniejszenie akumulacji Ca (ok. 2- krotnie) w porównaniu do kontroli (Fig. 15. B). Se dodany do pożywki z Mn nie wpływał na pobieranie K, P, S u obydwu badanych odmian pszenicy w porównaniu do wariantu z dodatkiem samego Mn, (Fig. 16. F). U odmiany Nimfa odnotowano zmniejszenie ilości Ca o ok. 25% w przeciwieństwie do Alibi, gdzie nastąpił ok 2- krotny wzrost zawartości tego pierwiastka (Fig. 15. B). Biofortyfikacja Se spowodowała wzrost stężenia Ca o ok. 35 % oraz obniżenie koncentracji S o ok. 25 % u odmiany Nimfa (Fig. 15. B; Fig. 16. F), przy jednoczesnym podwyższeniu ilości K o ok. 15 % u odmiany Alibi w stosunku do roślin hodowanych na podłożu kontrolnym (Fig. 16. B).

## 4.2.6. Mikroelementy

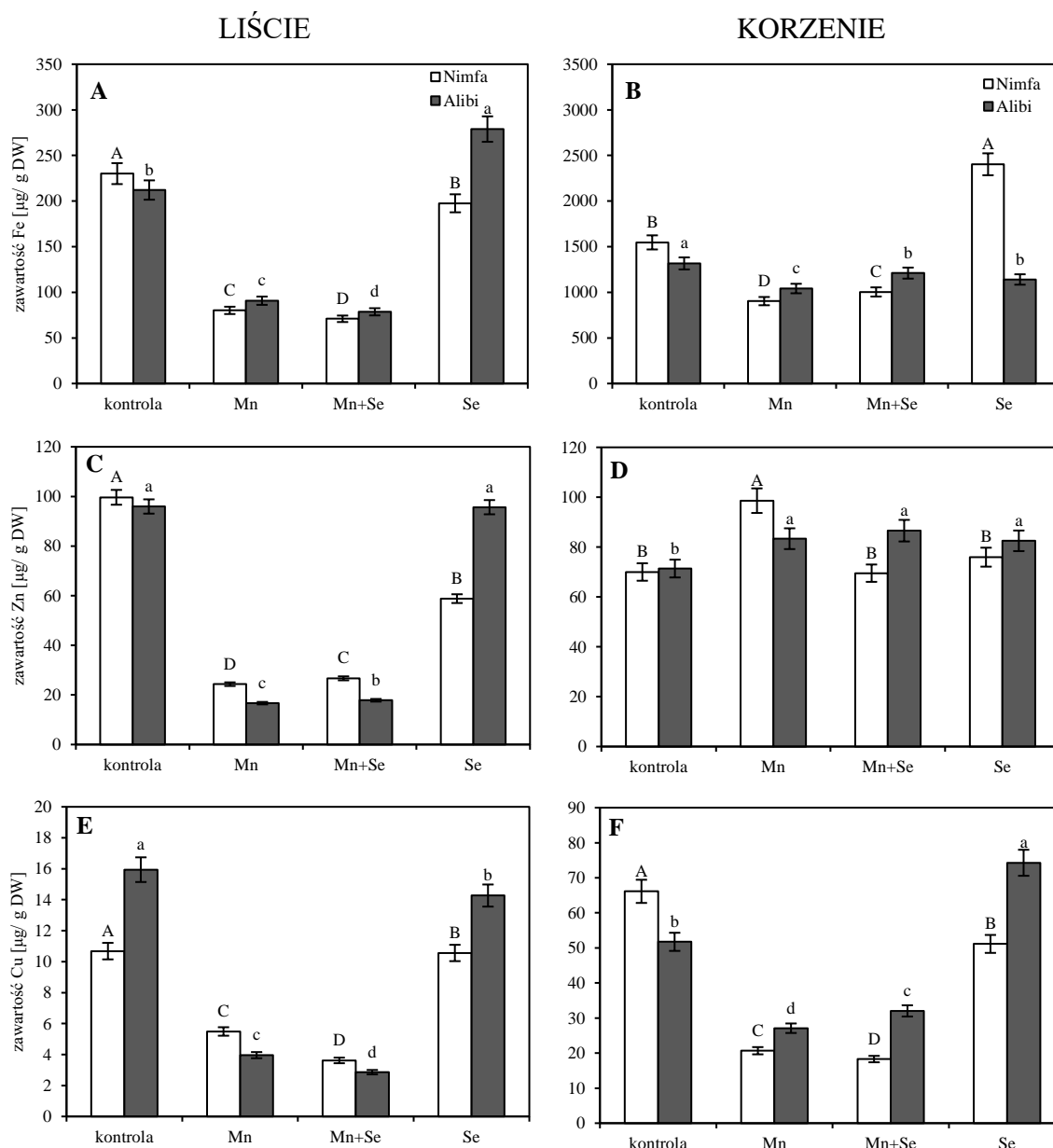


Fig. 17. Stężenia mikroelementów [ $\mu\text{g/g DW}$ ] w liściach oraz korzeniach siewek pszenicy: żelaza (Fe)- A, B, cynku (Zn)-C, D oraz miedzi (Cu)- E, F. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM  $\text{MnCl}_2$  (Mn), 10 mM  $\text{MnCl}_2$  + 15  $\mu\text{M}$   $\text{Se}_2\text{Cl}_2$  (Mn+ Se) oraz z 15  $\mu\text{M}$   $\text{Se}_2\text{Cl}_2$  (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm\text{SE}$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Podobny poziom mikroelementów zaobserwowano w liściach kontroli badanych odmian, z wyjątkiem stężenia Cu, które było wyższe u odmiany Alibi (Fig. 17. E). Dodatek jonów Mn do pożywki spowodował istotne obniżenie zawartości wszystkich mikroelementów w liściach testowanych odmian: Fe ok. 3- krotne, Zn 4- krotne oraz

Cu 2- krotne u odmiany Nimfa, podczas gdy u odmiany Alibi: Fe 2- krotne, Zn 6- krotne, Cu 4- krotne w porównaniu do kontroli (Fig. 17. A, C, E). Obecność jonów Se w pożywce zawierającej jony Mn spowodował dalszy spadek stężenia jonów Fe o ok. 12 % oraz Cu o ok. 30 % u obydwu odmian, a także wzrost zawartości Zn o ok. 10 % u odmiany Nimfa i o ok. 8 % u odmiany Alibi w stosunku do roślin hodowanych z dodatkiem Mn. Suplementacja jonami Se spowodowała spadek zawartości Fe (o ok. 15 %) i Zn (o ok. 41 %) u odmiany Nimfa oraz wzrost zawartości o ok. 31 % Fe i spadek koncentracji o ok. 10 % Cu u odmiany Alibi w porównaniu do kontroli.

W systemie korzeniowym roślin kontrolnych odnotowano wyższe stężenie mikroelementów u odmiany Nimfa z wyjątkiem Zn, który w obydwu odmianach był na podobnym poziomie (Fig. 17. D). W warunkach działania nadpodaży jonów Mn zarejestrowano spadek zawartości Fe o ok. 40 % oraz ok. 3- krotny Cu u odmiany Nimfa, odpowiednio o ok. 20 % i 2- krotny u odmiany Alibi (Fig. 17. B, F). Wzrost stężenia odnotowano jedynie przypadku Zn o ok. 40 % u odmiany Nimfa i ok. 16 % u odmiany Alibi w porównaniu do kontroli (Fig. 17. D). Aplikacja jonów Mn wraz z Se spowodowało wzrost zawartości Fe u obydwu odmian o ok. 11 % u Nimfa oraz o ok. 16 % u Alibi. Zarejestrowano również wzrost stężenia Cu o ok. 18 % u odmiany Alibi, a także obniżenie zawartości Zn oraz Cu (odpowiednio o ok. 30 % i 11 %) o w stosunku do traktowania samym Mn. Wprowadzenie do pożywki jonów Se indywidualnie powodowało podwyższenie poziomu Zn (o ok. 16 %) i Cu (o ok. 45 %) u odmiany Alibi oraz Fe (o ok. 55 %) u odmiany Nimfa, a także obniżenie zawartości Fe (o ok. 15 %) u odmiany Alibi oraz Cu (o ok. 25 %) u odmiany Nimfa.

## 4.2.7. Polifenole

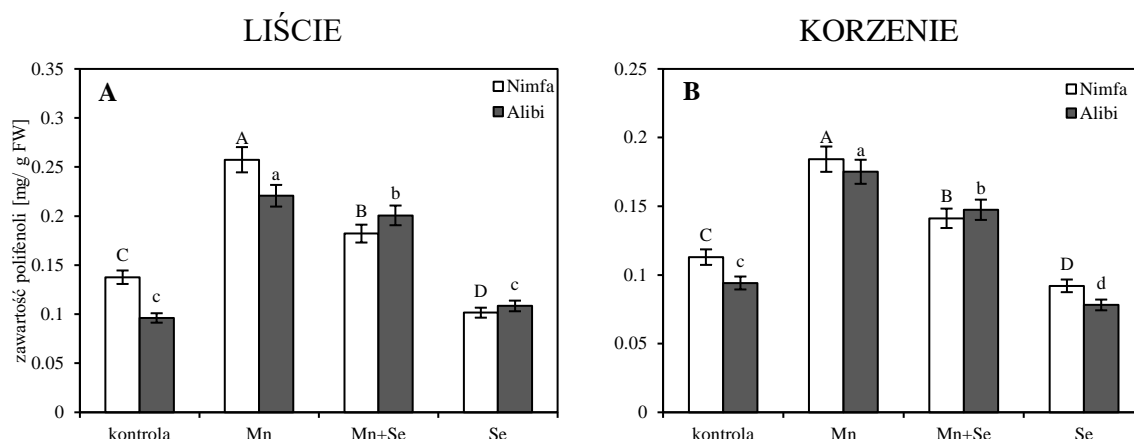


Fig. 18. Zawartość polifenoli [mg/ g FW] w liściach- A oraz korzeniach- B siewek odmiany Nimfa i Alibi. Obiekty hodowane w hydroponice na pożywkach wg Hoagland'a bez Mn (kontrola), z 10 mM  $MnCl_2$  (Mn), 10 mM  $MnCl_2$  + 15  $\mu M$   $Se_2Cl_2$  (Mn+ Se) oraz z 15  $\mu M$   $Se_2Cl_2$  (Se). Wyniki stanowią średnią z 5 powtórzeń  $\pm SE$ . Wartości średnie, pomiędzy traktowaniami, które zostały oznaczone jednakowymi literami nie różnią się statystycznie między sobą ( $P \leq 0.05$ ) wg testu Duncana.

Wyższe stężenie polifenoli odnotowano u odmiany Nimfa w kontroli zarówno w liściach jak i korzeniach (Fig. 18. A). Aplikacja jonów Mn w liściach spowodowała wzrost koncentracji polifenoli ok. 2- krotny zarówno u odmiany Nimfa jak i u odmiany Alibi. Dodatek jonów Se do pożywek zawierających jony Mn spowodował spadek stężenia polifenoli u obydwu odmian, odpowiednio o ok. 30 % u odmiany Nimfa oraz o ok. 10 % u odmiany Alibi w porównaniu z roślinami narażonymi na Mn. Obniżenie koncentracji polifenoli u odmiany Nimfa o ok. 30 % odnotowano podczas biofortyfikacji Se natomiast u odmiany Alibi nie zarejestrowano istotnych różnic w porównaniu z roślinami hodowanymi w warunkach kontrolnych.

Nadpodaż jonów Mn indukuje wzrost koncentracji polifenoli w systemie korzeniowym badanych odmian, wyższy o ok. 90 % u odmiany Alibi i o ok. 60 % u odmiany Nimfa w porównaniu z kontrolą (Fig. 18. B). Aplikacja jonów Se razem z jonami Mn spowodowała spadek zawartości polifenoli o ok. 20 % i 10 % odpowiednio u odmiany Nimfa i Alibi w porównaniu z roślinami hodowanymi na podłożu z jonami Mn. Suplementacja Se spowodowała redukcję syntezy polifenoli u obydwu odmian odpowiednio o ok. 20 % i 10 % w stosunku do kontroli.

## 4.2.8. Obserwacje mikroskopowe

## 4.2.8.1. Obserwacja mikroskopowa liści

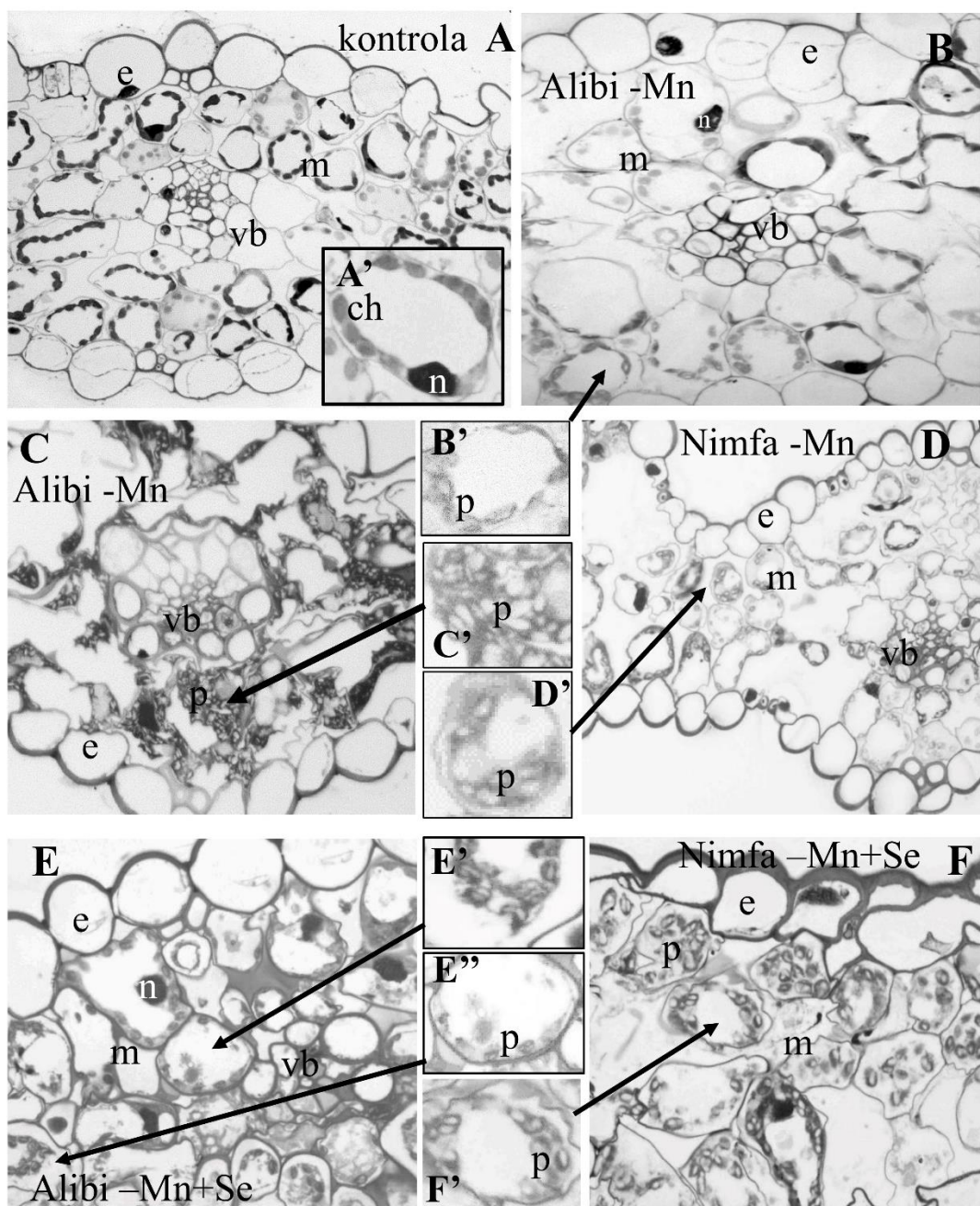


Fig. 19. Obserwacje mikroskopowe skrawków liści pszenicy odmian Nimfa i Alibi hodowanych w warunkach kontrolnych (kontrola) a także po ekspozycji na 10 mM  $MnCl_2$  (Mn) oraz 10 mM  $MnCl_2$  wraz z 15  $\mu M$   $Se_2Cl_2$  (Mn+ Se). e – naskórek, m – komórki mezofilu, vb – wiązka naczyniowa, ch – chloroplast, p – plastyd, n – jądro.

Obserwacje mikroskopowe po barwieniu błękitem toluidynowym ujawniły liczne chloroplasty w komórkach mezofilu obydwu odmian hodowanych w warunkach

kontrolnych (Fig. 19. A). Figura 19. A' przedstawia chloroplasty zlokalizowane pod błoną równomiernie wybarwione błękitem toluidynowym. Niezabarwione obszary plastydów wskazują na obecność ziaren skrobi. Jony Mn indukowały widoczne zmiany w chloroplastach, ponieważ zwiększały akumulację skrobi i tworzenie amyloplastów w komórkach mezofilu (Fig. 19. B, C, D). U odmiany Alibi odpowiedź była wyraźnie zróżnicowana, od niewielkich zmian w plastydach, w których gromadziła się skrobia (Fig. 19. B') do całkowitej degeneracji liści z licznymi amyloplastami w ich komórkach (Fig. 19. C, C'). U odmiany Nimfa, wiele plastydów wykazywało zaburzenia prowadzące do akumulacji skrobi (Fig. 19. D, D'). Plastidy u odmiany Alibi hodowanej w warunkach stresu manganowego z dodatkiem roztworu Se (Mn+Se) były głównie amyloplastami (Fig. 19. E') lub małymi, prawie jednolicie zabarwionymi strukturami (Fig. 19. E''). U odmiany Nimfa, w komórkach miąższu asymilacyjnego zaobserwowano tylko amyloplasty (Fig. 19. F, F'). Obecność Se nie zmieniła obrazu mikroskopowego liści żadnej z odmian, który był taki sam jak ten zarejestrowany dla kontroli (dane nie pokazane).



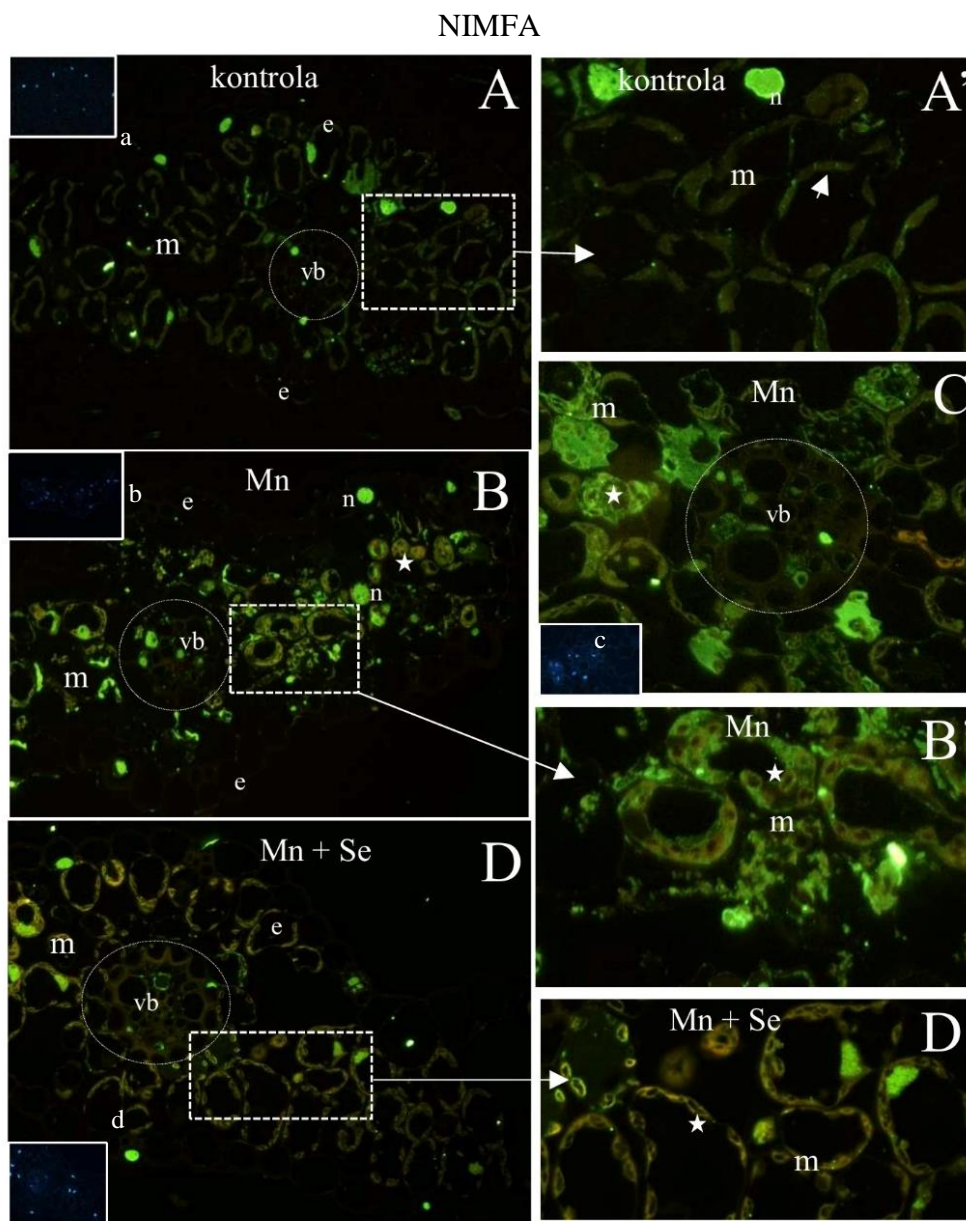


Fig. 20. Lokalizacja 5-metC w liściach kontroli (A, A'), w warunkach nadmiaru jonów Mn (B, B', C), a także przy równoczesnej aplikacji Mn i Se (D, D') u odmiany Nimfa; a-d barwienie DAPI (vb – wiązka naczyniowa, m – komórka mezofilu, e – naskórek, n – jądro, ★ – plastyd).

## ALIBI

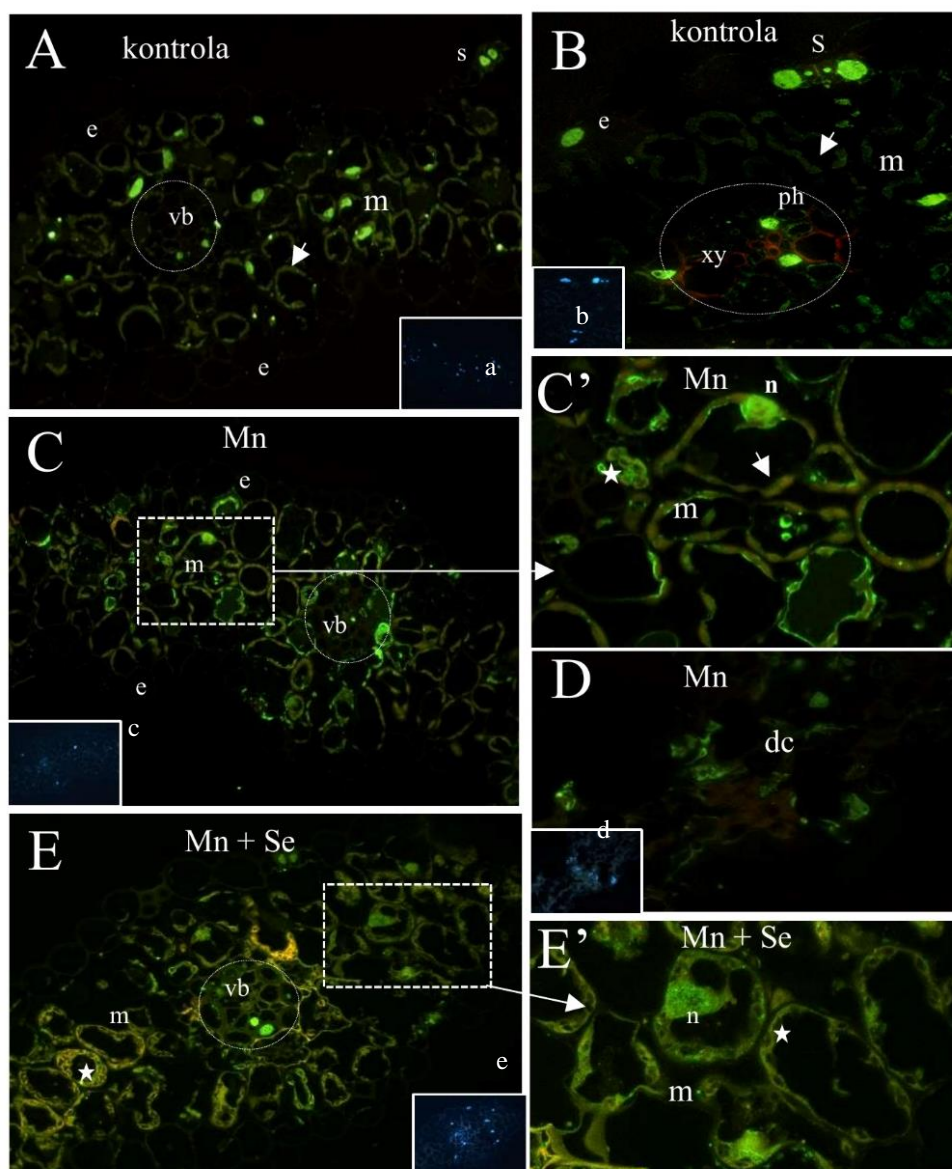


Fig. 21. Lokalizacja 5-metC w liściach kontroli (A, B), w warunkach nadmiaru jonów Mn (C, D), a także przy równoczesnej aplikacji Mn i Se (E) u odmiany Alibi; a-e DAPI. (vb – wiązka naczyniowa, m – komórka mezofilu, e – naskórek, n – jądro, ★ – plastyd).

W liściach obydwu odmian pszenicy 5metC lokalizowano w jądrach komórkowych wszystkich tkanek, tj. w epidermie, miękiszu asymilacyjnym oraz wiązce przewodzącej (Fig. 20; Fig. 21). W komórkach miękiszu asymilacyjnego roślin kontroli, zarówno u odmiany Nimfa jak i Alibi, obecne były liczne chloroplasty (Fig. 20. A, A'; Fig. 21. A-B). Nie obserwowano znaczących różnic w intensywności sygnału w liściach kontrolnych oraz hodowanych w obecności Mn oraz Mn+ Se. Jednakże mikroskopowa analiza preparatów ujawniła, że efektem pobierania Mn są zmiany w plastydach. Obecność Mn prowadziła

do uszkodzania chloroplastów, często do gromadzenia w nich skrobi i tworzenia amyloplastów (Fig. 20. B, C; Fig 21. C.). U odmiany Nimfa zdecydowana większość plastydów wykazywała zmiany (Fig. 20. B', C). Wiele z nich lokalizowano w komórkach wokół wiązek przewodzących (Fig. 20. B'). Natomiast u odmiany Alibi zaobserwowano cały szereg zmian– od niewielkich deformacji plastydów, w których gromadziła się skrobia (Fig. 21. C') do całkowitej degeneracji liści (Fig. 21. D). Błony tak przekształconych plastydów wykazywały autofluorescencję, co może wskazywać na zmiany w ich budowie (Fig. 20. C; Fig. 21. C). W liściach roślin hodowanych w obecności Mn i Se również obserwowano zmiany w plastydach. U obydwu odmian w komórkach mięszki asymilacyjnej lokalizowano przede wszystkim amyloplasty (Fig. 20. D, D'; Fig 21. E, E').

#### 4.2.8.2. Obserwacja mikroskopowa korzenia

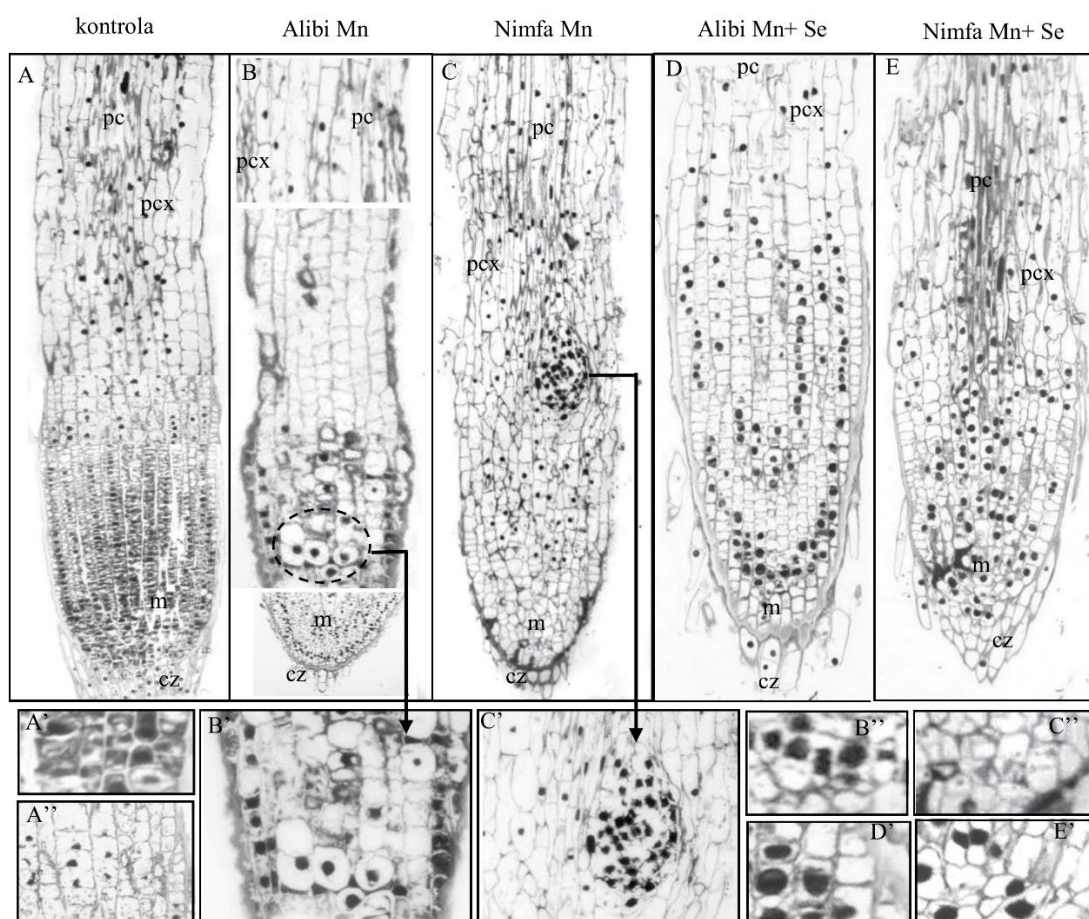


Fig. 22. Obserwacje mikroskopowe korzeni pszenicy odmian: Nimfa i Alibi hodowanych na pożywkach bez Mn (kontrola), w warunkach nadmiaru  $MnCl_2$  (Mn), a także przy równoczesnej aplikacji Mn i Se (Mn+Se). cz – komórki czapeczki, m – merystem, pc – prokambium, pcx – prokora.

Anatomia wierzchołka korzeni roślin uprawianych w warunkach kontrolnych (Fig. 22. A) była typowa – komórki czapeczki, tkanka merystematyczna złożona z rzędów prostopadłościennych komórek (Fig. 22. A'), powyżej obszaru różnicowania (Ryc. 22. A'') oraz strefa wydłużenia, w której widoczne stają się prokambium i kora. W korzeniach Alibi poddanych stresowi Mn (Fig. 22. B) komórki merystematyczne nie miały regularnego kształtu (Fig. 22. B''), a wierzchołek był otoczony mniejszą ilością komórek czapeczki, często o nieregularnym kształcie i zdeformowanych jądrach. Ponadto w obszarze pomiędzy merystemem a strefą różnicowania znajdowały się grupy komórek o owalnym kształcie, które były większe niż otaczające komórki, nieobecne w kontroli i były większe niż reszta otaczających je komórek (Fig. 22. B'). Ich obecność może wskazywać na potencjalną zmianę kierunku różnicowania komórek w tym obszarze korzeniowym. W strefie wydłużenia komórki były często nieregularne, niektóre bez widocznych jąder. Akumulacja Mn doprowadziła do drastycznych zmian anatomicznych w korzeniach Nimfa (Fig. 22. C) prowadząc do śmierci głównych szczytów wzrostu. W takich korzeniach komórki merystematyczne miały nieprawidłowe kształty, a w zdegenerowanych jądrach komórkowych barwienie błękitem metylenowym nie ujawniło chromatyny (Fig. 22. C'). Podobnie jak w przypadku Alibi, komórki czapeczki były mniej liczne niż w kontroli (Fig. 22. C). Charakterystyczną cechą obserwowaną w tej odmianie pszenicy była obecność grupy małych komórek z dużymi jądrami i skondensowaną chromatyną na granicy merystemu i strefy różnicowania (Fig. 22. C'). Zastosowanie Se wraz z Mn w dużym stopniu zapobiegło zmianom pojawiającym się tylko w obecności samych jonów Mn (Fig. 22. D- C). W obszarze pomiędzy merystemem a strefą różnicowania i elongacji nie zaobserwowano zwartych grup komórek o budowie odmiennej od struktury komórek otaczających. Również merystem nie wykazywał istotnych deformacji. U odmiany Alibi (Fig. 22. D) kształt komórek merystematycznych był podobny do tego, który był obserwowany dla tkanek kontroli (Fig. 22. E'). W obydwu odmianach we wszystkich wariantach (Mn lub Mn + Se) zaobserwowano mniejszą liczbę komórek czapeczki na wierzchołku korzenia.

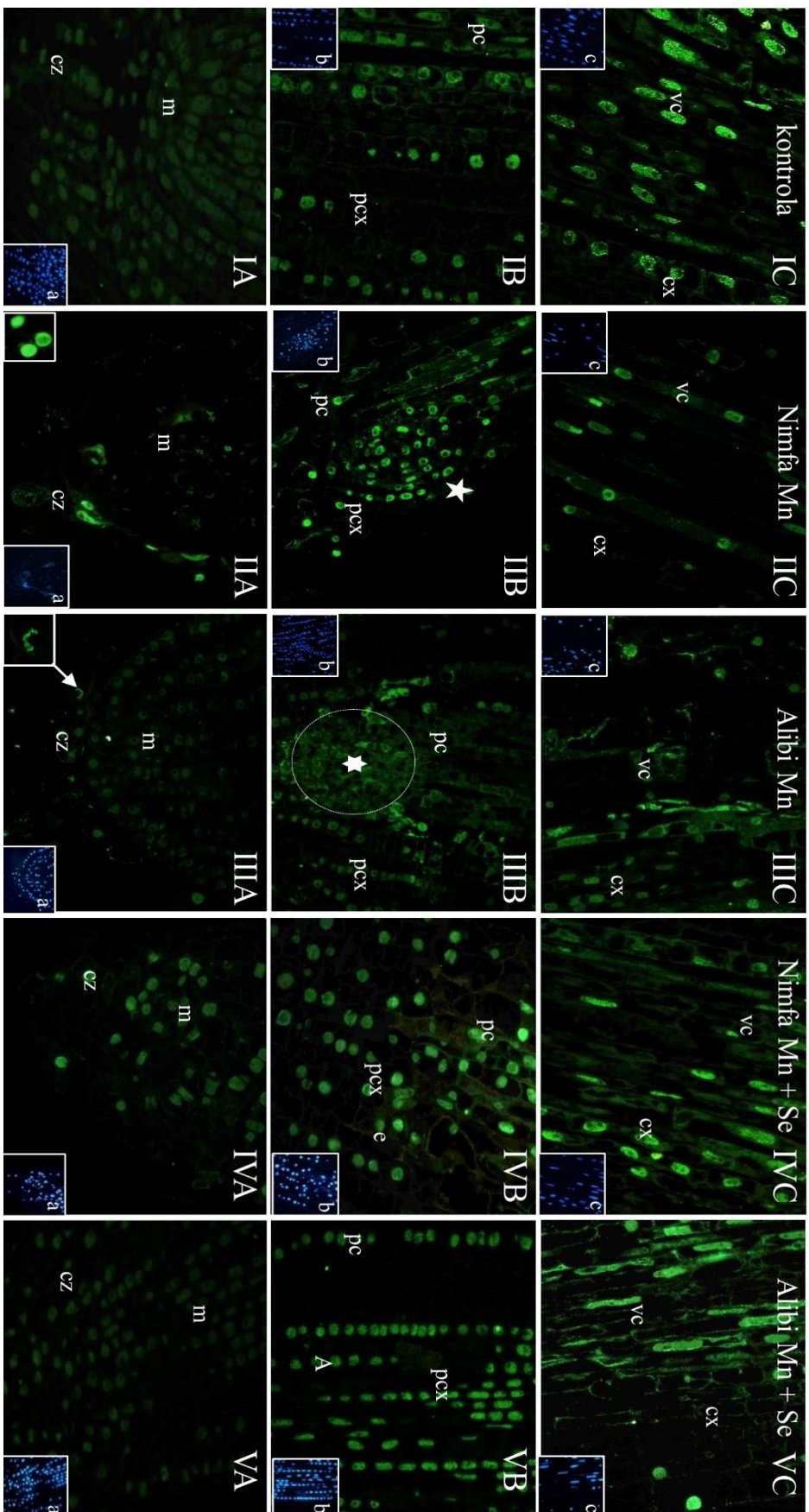


Fig. 23. Lokalizacja 5-metC w korzeniach roślin kontroli (IA-C), w warunkach nadmiaru MnCl<sub>2</sub> (Nimfa (IIA-C), Alibi (IIIA-C)), oraz hodowanych w obecności Mn i Mn + Se (Nimfa (IVA-C) i Alibi (VA-C)); a-e DAPI. (cz- komórki czapeczki, vc – wiązka naczyniowa, m – komórka mezofilu, pc- prokambium, pcx- prokora, e- naskórek, n – jądro, ★-plastyd, cx- kora).

W korzeniach obydwu badanych odmian pszenicy hodowanych w warunkach kontrolnych obserwowano taki sam wzorec lokalizacji 5metC. Bardzo słaby sygnał 5metC lokalizowano w komórkach merystematycznych oraz w krótko-żyjących komórkach czapeczki (Fig. 23. IA). Wzrost fluorescencji lokalizowano w jądrach komórek, które wchodziły na drogę różnicowania (Fig. 23. IB). W strefie wydłużania korzenia najwyższy poziom sygnału obserwowano w jądrach różnicującej się wiązki przewodzącej (Fig. 23. IC). W korzeniach roślin odmiany Nimfa hodowanych w obecności Mn wzrost poziomu metylacji DNA obserwowano dopiero od strefy różnicowania komórek (Fig. 23. IIA-C). U tej odmiany akumulacja Mn często prowadziła do zamierania głównych wierzchołków wzrostu i różnicowania korzeni bocznych. W takich korzeniach komórki merystematyczne miały nieprawidłowe kształty, a ich jądra nie były widoczne, zdegenerowane były też nieliczne komórki czapeczki (Fig. 23. IIA). Tylko na granicy merystem – czapeczka lokalizowano pojedyncze komórki z jądrami o silnie zmetylowanym DNA. Charakterystyczną cechą obserwowaną u tej odmiany pszenicy było występowanie na granicy strefy różnicowania i wydłużania grupy niewielkich komórek o wyraźnie podwyższonym poziomie metylacji DNA.

W korzeniach roślin odmiany Alibi hodowanych w obecności Mn - podobnie jak w kontroli – podwyższanie poziomu metylacji DNA obserwowano dopiero od strefy różnicowania komórek (Fig. 23. IIIA-C). W komórkach merystematycznych DNA pozostawało nisko zmetylowane (Fig. 23. IIIA), jednakże w tkankach występowały zaburzenia anatomiczne, którym towarzyszyły zmiany wzorca metylacji DNA (Fig. 23. IIIB- C). Czapeczka posiadała mniejszą liczbę komórek, często o nieregularnych kształtach i zdeformowanych jądrach komórkowych, w których lokalizowano podwyższony poziom metC (Fig. 23. IIIA). W obszarze różnicowania prokambium i prokory obecne były grupy komórek o nieregularnych kształtach i niskim sygnale 5metC (Fig. 23. IIIB). Podwyższony poziom 5metC występował tylko w komórkach na granicy prokambium – prokora. Komórki walca osiowego były nieregularne, niektóre bez widocznych jąder komórkowych, w jądrach innych komórek lokalizowano wysoki poziom 5metC. Hodowla roślin w obecności Mn z dodatkiem jonów Se, zapobiegała obserwowanym wcześniej zaburzeniom w różnicowaniu tkanek korzenia. U odmiany Alibi budowa i poziom metylacji DNA komórek strefy merystematycznej oraz czapeczki były podobne jak w kontroli (Fig. 23. VA). U odmiany Nimfa anatomia tej strefy tylko w niektórych korzeniach była nieznacznie zaburzona (Fig. 23. IVA). W komórkach tych poziom metC był też nieco wyższy niż w roślinach kontrolnych. U obydwu odmian nie stwierdzono znaczących

zaburzeń w strefie różnicowania i wydłużania korzenia (Fig. 23. IVB-C, VB-C) i podobnie jak w warunkach kontroli, w różnicujących się komórkach obserwowano postępujący wzrost metylacji DNA.

## 5. DYSKUSJA

Dostępność w glebie pierwiastków ma istotne znaczenie dla wzrostu, rozwoju oraz plonowania roślin. Jednakże każde odchylenie od normy zarówno w kierunku niedoboru jak również nadmiaru uruchamia kaskadę sygnałów, której efektem jest zmiana metabolizmu, umożliwiającą przeżycie organizmu w stresujących warunkach. Słaby monitoring gleby pod względem ilości dostępnych pierwiastków może prowadzić do stresu jonowego w roślinach i wywoływać wiele bezpośrednich lub pośrednich skutków, które mogą zaburzać wszystkie fizjologiczne funkcje komórek. Toksyczność manganu jest istotnym ograniczeniem produktywności roślin, zwłaszcza na obszarach, gdzie występują gleby kwaśne oraz słabo napowietrzane.

Istnieje wiele wskaźników świadczących o pojawieniu się zaburzeń fizjologicznych tj. utrata świeżej masy, żółknięcie lub brązowienie liści lub korzeni, a także deformacja i skrócenie tkanek bez względu na rodzaj bodźca stresowego [Mishra i wsp. 2006; Selvaraj 2018; Huang i wsp. 2019]. Jednym z markerów świadczących o toksycznym działaniu nadpodaży jonów Mn była redukcja świeżej masy rozwijających się koleoptyli (Fig. 8. A- C). Większy spadek świeżej masy u odmian zaklasyfikowanych jako wrażliwe na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w stresie suszy, potwierdził ich większą podatność na nadmiar Mn. Owies wskazano za najbardziej wrażliwy, zaś pszenicę jako najbardziej odporną wśród badanych zbóż.

Toksyczny wpływ danego pierwiastka różni się w zależności od gatunku roślin, ich odmian uprawnych i warunków środowiskowych [Broadley w wsp. 2012; Fühns i wsp. 2009, 2012]. Ziarna wszystkich testowanych zbóż akumulowały jony Mn, co świadczy o zdolności tych gatunków do pobierania manganu z pożywki, przy czym odmiany wrażliwe pobierały większe ilości tego pierwiastka (Fig. 7). Chatterjee i Nagarajan [2006], badali rośliny pszenicy o różnej podatności na stres oksydacyjny inicjowany przez suszę i wnioskowali, że nasiona odmiany tolerancyjnej wykazywały mniejszą przepuszczalność dla jonów niż odmiany wrażliwe. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Kornaś i wsp. [2019], którzy zarejestrowali większy wypływ jonów z błony u odmian uznawanych za wrażliwe, co sugeruje niższą integralność błon komórkowych, w konsekwencji wpływając na ich lepszą przepuszczalność. Przypuszcza się, że akumulacja większej ilości stresorów (jonów metali, toksyn) w tkankach odmian wrażliwych w porównaniu z odpornymi jest główną przyczyną ich większego uszkodzenia [Sieprawska i wsp. 2017]. Natomiast Yao i wsp. [2012], przez analizę pobierania Mn przez wybrane odmiany winogrona wykazali,



że w zależności od odmiany, większe ilości tego pierwiastka były zatrzymywane w korzeniach, albo transportowane do liści, nawet u odmian uznawanych za odporne.

Na podstawie obserwacji mikroskopowych u odmian: Nimfa i Alibi (Fig. 14. A, B) wykazano, że większa ilość Mn absorbowana się w systemie korzeniowym w porównaniu do liści, co skutkowało pojawieniem się większych zmian w budowie i architekturze systemu korzeniowego. Jednakże, wyższy poziom Mn (zarówno w liściach, jak i korzeniach) stwierdzono u odmiany Nimfa w porównaniu do odmiany Alibi, chociaż to w odmianie Alibi zaobserwowano wyraźniejsze zmiany morfologiczne. Wydaje się zatem, że nie można jednoznacznie stwierdzić, że większa akumulacja Mn jest jedynym wskaźnikiem różnicującym wrażliwość badanych odmian na ten stresor. Należy również wziąć pod uwagę specyficzne właściwości błon badanych odmian (zwłaszcza przepuszczalność, zależną od zawartości lipidów nienasyconych).

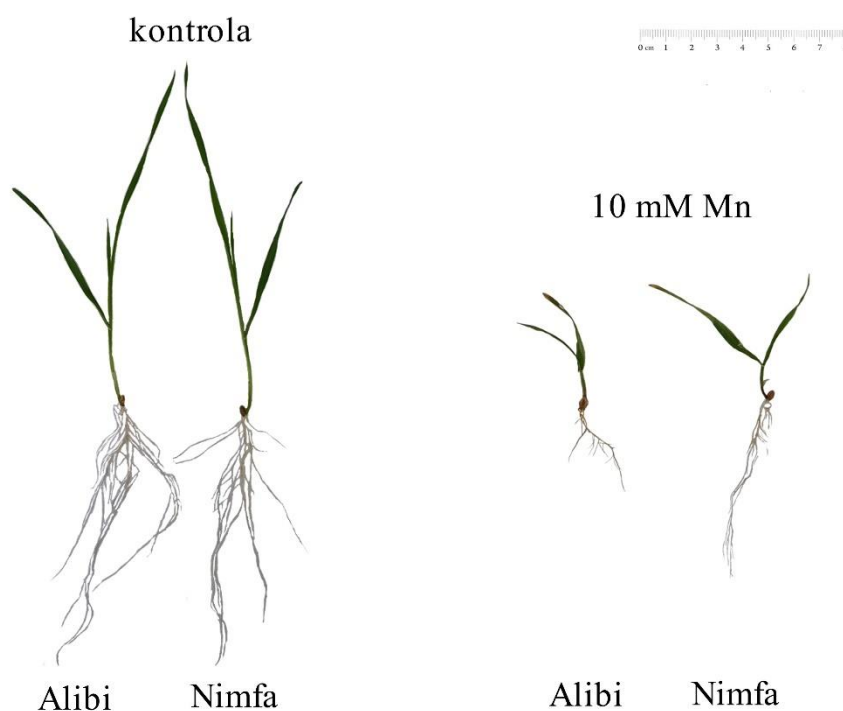


Fig. 24. Porównanie pszenicy odmiana Nimfa i Alibi hodowanych w warunkach kontrolnych i pod wpływem 10 mM  $MnCl_2$

O występowaniu stresu oksydacyjnego świadczy aktywacja enzymów antyoksydacyjnych [Sharma i Dubey 2005]. SOD, CAT i POX są odpowiedzialne za neutralizację nadmiernej ilości RFT [Hasanuzzaman i wsp. 2019]. Działanie tych enzymów może zmniejszyć możliwe reakcje RFT z wewnątrzkomórkowymi

biocząsteczkami, prowadząc do ich zniszczenia. Zwiększona aktywność sumarycznych dysmutaz w warunkach toksyczności Mn może być spowodowana podwyższoną akumulacją Mn w komórkach, który stanowi kofaktor dla MnSOD [Skórka i wsp. 2020]. Ekspozycja na jony Mn wpłynęła na aktywność enzymów antyoksydacyjnych we wszystkich testowanych zbożach. Siewki pszenicy wykazały najwyższą aktywność SOD wśród badanych obiektów, również w warunkach kontrolnych. Może to sugerować większą zdolność pszenicy do wychwytywania rodników ponadtlenkowych w porównaniu z pozostałymi zbożami (Tab. 2.) oraz potwierdzić wcześniejsze przypuszczenie o wysokiej odporności pszenicy na stres Mn [Shewry 2009].

Rozkład nadtlenu wodoru jest zależny od dwóch enzymów katalizujących ten proces CAT i POX. Wśród testowanych zbóż w pszenicy oraz w owsie proces ten był kontrolowany głównie przez POX, podczas gdy w jęczmieniu zarówno POX jak i CAT były zaangażowane w rozkład nadtlenu wodoru, co może świadczyć o skuteczniejszym usuwaniu RFT wywołanym stresem Mn. Sugerowana wcześniej wysoka wrażliwość owsa na nadmiar Mn [Sharma i wsp. 2012] może być związana z jego stosunkowo niską zdolnością do aktywacji wszystkich enzymów antyoksydacyjnych, zwłaszcza w warunkach stresowych. Zmniejszona aktywność POX i CAT we wrażliwej odmianie owsa może wskazywać na możliwe uszkodzenia ich struktury białkowej przez silne działanie RFT, co może stanowić pośredni dowód na niską tolerancję u tej odmiany.

W wyniku narażenia na warunki stresowe rośliny gromadzą metabolity, przede wszystkim aminokwasy i cukry, które odgrywają ważną rolę w procesach metabolicznych i prawidłowym rozwoju. Najniższa synteza cukrów rozpuszczalnych zarejestrowana w owsie, których obecność, wiąże się z utrzymaniem optymalnych warunków osmotycznych, może wskazywać, że niska tolerancja owsa przypuszczalnie będzie związana z zaburzeniami bilansu wodnego w komórce (Fig. 9. A-C). Z kolei większe nagromadzenie skrobi, wywołane aplikacją Mn występowało głównie u odmian wrażliwych, co może potwierdzać teza postawiona przez Thalmann i Santelia [2017], że wzmożona akumulacja skrobi może wskazywać na zakłócenie procesów metabolicznych zapoczątkowanych przez warunki stresowe (Fig. 9. D-F). Jak wykazali Filek i wsp. [2015] zwiększona akumulacja skrobi w odpowiedzi na czynniki stresowe (stres suszy) jest związana z wystąpieniem zaburzeń w procesie fotosyntezy. Regulacja metabolitów wtórnych może być również związana z endogennym poziomem kwasu salicylowego i w pośredni sposób może wpływać na utrzymanie homeostazy fizjologicznej.

Kwas salicylowy wpływa m.in. na modulację pobierania i metabolizm ważnych składników mineralnych, powodując poprawę wzrostu i rozwoju roślin poddanych stresowi abiotycznemu [Gunes i wsp. 2007; Tufail i wsp. 2013; Nazar i wsp. 2015]. Ponadto stwierdzono ochronną rolę SA na integralność błony komórkowej oraz w regulacji jonów, w tym pobierania składników odżywczych [Gunes i wsp. 2007]. Wzrost syntezy SA pod wpływem zwiększonej akumulacji Mn u odmian tolerancyjnych korelował z niższą akumulacją Mn w komórkach w przeciwieństwie do wrażliwych odmian, u których wykazano zmniejszoną zawartość SA pod wpływem stresu i zwiększone pobieranie Mn (Fig. 10. A-C; Fig. 7). Podobne zależności zostały opisane przez Wang i wsp. [2011], którzy sugerowali, że kwas salicylowy może kontrolować wychwyty niektórych pierwiastków takich jak Mn, Cu, Fe i Zn.

Kwas askorbinowy (AsA) i glutation (GSH) to dwa główne antyoksydanty, które w warunkach stresu oksydacyjnego, chronią komórki roślin przed szkodliwym działaniem rodników ponadtlenkowych, nadtlenu wodoru i rodników hydroksylowych [Akram i wsp. 2017]. W warunkach stresu Mn zwłaszcza przy najwyższej dawce (10 mM Mn) obserwowany był spadek zawartości kwasu askorbinowego (Fig. 10. D-F), podobna tendencja była obserwowana w pszenicy poddanej stresowi suszy [Secenji i wsp. 2010]. Taki spadek zawartości AsA może być spowodowany bezpośrednim zmiataniem RFT, ponieważ uważa się, że ta cząsteczka służy jako pierwsza linia obrony w warunkach stresu oksydacyjnego. Zmniejszenie zawartości AsA odnotowano również w *Brassica napus* L. pod wpływem jonów Cd, przy jednoczesnym wzroście stężenia GSH [Hasanuzzaman i wsp. 2012]. W przeciwieństwie do AsA, zawartość GSH wzrosła z wyjątkiem odmian owsa, gdzie zarejestrowano spadek zawartości GSH u siewek traktowanych jonami Mn (Fig. 10. G-I). Wzrost stężenia GSH w odpowiedzi na stres Mn może wynikać z jego roli w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Ponadto GSH przyczynia się do chelatacji metali ciężkich [Hasanuzzaman i wsp. 2019], co może tłumaczyć wyższy wzrost koncentracji GSH u odmian wrażliwych, który był związany z wyższą akumulacją jonów Mn w komórkach tych odmian.

Do silnych zmiataczy RFT i kluczowych składników szlaku sygnalizacji komórkowej w roślinach Chen i Dickman [2005] wskazali prolinę, która wykazuje właściwości osmoprotekcyjne. Zwiększona akumulacja proliny może wystąpić, gdy rośliny obniżają przewodnictwo aparatów szparkowych w celu zmniejszenia pobierania metali ciężkich [Meena i wsp. 2019]. Wzorzec poziomów proliny (skok/ spadek) może być specyficzny dla gatunku rośliny lub zależny od specyfiki działającego stresora

środowiskowego. Nio i wsp. [2011] zarejestrowali zwiększenie zawartości proliny w pszenicy przy deficycie wody, co sugeruje pewien poziom dostosowania osmotycznego. Również Zhu i wsp. [2011] postulowali, że prolina może działać jako zmiatacz rodników hydroksylowych, absorber energii, a także jako regulator potencjału redoks, łagodząc tym samym stres oksydacyjny u kukurydzy. Wzrost zawartości proliny pod wpływem stresu metalicznego sugerowali także Sharma i Dubey [2005]. Nagromadzenie większych ilości proliny obserwowane pod wpływem stresu Mn w odmianach wrażliwych może świadczyć o intensywnym działaniu stresu w tych obiektach (Tab. 3). Akumulacja proliny wywołana stresem jest wynikiem wzajemnego oddziaływania dwóch szlaków –syntetyzujących prolinę wykorzystujących w tym celu enzymy P5CS i OAT oraz szlaku odpowiedzialnego za degradację proliny w którym bierze udział enzym PHD [Lin i wsp. 2002]. Podwyższona akumulacja proliny pod wpływem stresu Mn może być związana z aktywacją procesów związanych z syntezą tego metabolitu i jest to ważny mechanizm przeciwdziałania zmianom osmotycznym wywoływanym w komórkach roślinnych przez ten stresor. Szepesi i Craigon i wsp. [2004] wykazali, że pod wpływem stresu inicjowanego przez metale ciężkie (Pb i Zn) enzymy kilku szlaków mogą być w różnym stopniu zaangażowane w syntezę proliny. W pszenicy i jęczmieniu został zarejestrowany wzrost aktywności zarówno P5CS jak i OAT, natomiast w owsie wzrastała aktywność jedynie P5CS. W związku z tym prawdopodobnie u testowanych odmian owsa główny szlak syntezy proliny zależy głównie od P5CS. Yamada i wsp. [2005] doszli do podobnego wniosku, sugerowali, że P5CS był kluczowym enzymem zaangażowanym w syntezę proliny pod wpływem stresu wodnego. Metabolizm i akumulacja proliny zależą również od szlaku jej degradacji, który jest katalizowany przez mitochondrialne PHD [Ruiz i wsp. 2005]. Ogólnie rzecz biorąc, niektóre rodzaje stresu (głównie susza i zasolenie) mogą hamować, lub nie wpływać na aktywność PHD [Hare i wsp. 1999], co potwierdzają nasze wyniki u pszenicy (Parabola i Raweta) i jęczmienia (CAM/B, Maresi). Po zastosowaniu dawki 10 mM Mn zarówno u pszenicy (Nimfa i Alibi) (Fig. 12. D) jak i u owsa (Bingo, Siwek) wykazano zwiększoną aktywność tego enzymu pod wpływem stresu Mn. W przypadku odmian Nimfa i Alibi wzmożoną aktywność enzymu degradującego prolinę kompensowano wyższą aktywnością enzymów odpowiedzialnych za syntezę tego aminokwasu (co generalnie skutkowało wzrostem zawartości proliny w obecności Mn) (Fig. 12. A-C). Natomiast w przypadku owsa wrażliwego wzrost aktywności PHD wykryty przy wyższej dawce Mn doprowadził do obniżenia poziomu proliny, co może sugerować utratą tolerancji na nadmiar Mn (Tab. 3).

Jednym z typowych objawów występowania stresu oksydacyjnego jest zmniejszenie zawartości chlorofilu, co może wynikać z jego degradacji lub być spowodowane niedoborem syntezy chlorofilu, spadkiem stosunku chlorofilu a do b lub zmianami struktury błon tylakoidów [Khaleghi i wsp. 2012]. Baldisserotto i wsp. [2007] zasugerowali, że obniżona zawartość chlorofilu może być spowodowana utlenianiem Mn w chloroplastach inicjowanym przez nadprodukcję RFT. Zakłócenie wydajności fotosyntezy i spadek zawartości chlorofilu pod wpływem nadmiaru Mn wykazali Liu i wsp. [2010]. W badanych odmianach zmiany zawartości chlorofilu były znaczne, co potwierdzają chlorozy występujące na liściach (Fig. 11). Może to wskazywać na wystąpienie zaburzeń funkcjonowania chloroplastów lub ich degradację wywołaną obecnością jonów Mn.

Poszukiwanie naturalnych związków ochronnych dla roślin uprawianych w dynamicznie zmieniających się warunkach środowiskowych jest obecnie w centrum zainteresowań wielu ośrodków naukowych. W wielu krajach, w tym w Polsce (0.27 mg/ g Se), występują gleby ubogie w selen, który odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu organizmu człowieka [Darecki i wsp. 2015]. W ciągu ostatnich lat wzrosło zainteresowanie badaniami nad Se w celu poprawy zdrowia publicznego, dlatego suplementacja Se roślin prowadząca do akumulowania tego pierwiastka w częściach jadalnych może łagodzić skutki jego niedoboru u ludzi. Dodatkowo selen w niskich stężeniach może stymulować mechanizmy ochronne komórek w tym zastępować inne pierwiastki w centrach aktywnych enzymów m.in. w peroksydazie glutationowej, pomimo tego, że jego obecność nie jest niezbędna do prawidłowego metabolizmu roślin [Sieprawska i wsp. 2015]. Po aplikacji Se do pożywki wzrosła koncentracja tego pierwiastka w badanych odmianach, przy czym Se był transportowany a następnie akumulowany głównie w liściach, co wskazuje na zdolność pszenicy do akumulacji oraz transportu tego pierwiastka (Fig. 14. C-D). Wykazano, że niskie dawki Se wykazują hamujący lub nieistotny wpływ na pobieranie metali ciężkich przez korzenie, natomiast działają stymulująco na większość parametrów morfologicznych korzeni u roślin [Luo i wsp. 2019; Qin i wsp. 2018]. Również Zhao i wsp. [2019] postulowali, że Se może zmieniać morfologię korzeni w roślinach, a tym samym wpływać na pobieranie metali ciężkich. W testowanych obiektach podobny efekt występował w korzeniach u odmiany Nimfa oraz w liściach u odmiany Alibi, gdzie zastosowanie jonów Se do pożywki zawierającej jony Mn spowodowało spadek koncentracji jonów Mn (Fig. 14. A-B). Natomiast w liściach u odmiany Nimfa i w korzeniach u odmiany Alibi zauważono przeciwny efekt, co może wskazywać, że zmiany zawartości jonów Mn w poszczególnych organach nie są spowodowane przez blokowanie/stymulację pobierania

tego pierwiastka w obecności jonów selenu, ale przez zmiany w transporcie pomiędzy organami (korzeń → liście). Wydaje się zatem, że nie można jednoznacznie stwierdzić, że ochronne działanie Se zależy od zmniejszenia pobierania/akumulacji metali ciężkich w roślinach narażonych na stres jonowy, jednak wpływ ten może zależeć od zastosowanych dawek Se [Feng i wsp. 2016] oraz od gatunków a nawet genotypów roślin. Dodatkowo u obydwu odmian zaobserwowano blokowanie transportu Se do liści, natomiast w korzeniach nie wykazano żadnych zmian przy traktowaniu roślin zarówno Mn i Se w porównaniu z aplikacją samych jonów Se. Może to sugerować, że jony Mn wpływają na transport Se do innych organów w roślinie.

Wzrost zawartości MDA jest uważany za wskaźnik peroksydacji lipidów świadczący o wystąpieniu stresu oksydacyjnego [Choudhary i wsp. 2007]. W warunkach nadmiaru jonów Mn nastąpił wzrost zawartości MDA w komórkach który sugeruje, indukcję stresu oksydacyjnego. Obecność jonów Se zmniejszała stężenie MDA u roślin traktowanych jonami Mn, wskazuje to na niższy poziom utleniania w komórkach, co może świadczyć o poprawie właściwości antyoksydacyjnych w warunkach toksyczności Mn (Tab. 4).

Ujemna zależność między akumulacją badanych pierwiastków w liściach a pobieraniem Mn (zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z Se) sugeruje „blokowanie transportu” pozostałych pierwiastków w warunkach nadpodaży jonów Mn (Fig. 15- Fig. 17). Jednak w korzeniach obu odmian rejestrowano oddziaływanie synergiczne pomiędzy Mn a Zn, P i S oraz z Ca w wariacie Mn+ Se. Zmniejszone pobieranie badanych pierwiastków pod wpływem stresu Mn wykazano wcześniej w liściach różnych gatunków roślin [Juice i wsp. 2006; Kleiber 2014]. Również w chloroplastach siewek pszenicy pod wpływem stresu Mn wykazano zmniejszoną akumulację Zn, Cu, Fe, Mg i Ca [Sieprawska i wsp. 2017]. Zmiany w stężeniach tych składników mogą zaburzać procesy metaboliczne i w konsekwencji hamować wzrost roślin, co objawia się spadkiem świeżej masy w obecności jonów Mn aplikowanych w nadmiarze. Dodatkowo wykazano zwiększone pobieranie Ca przez korzenie obu odmian poddanych działaniu jonów Mn wraz z jonami Se oraz w korzeniach Nimfa po aplikacji wyłącznie jonów Mn. Znaczenie jonów Ca jako cząsteczki sygnałowej pod wpływem działania czynników stresowych zostało opisane w wielu pracach [Thor 2019; Wilkins i wsp. 2016]. Jon ten jest pobierany z pożywki wzrostowej przez kanały błony plazmatycznej zlokalizowane w korzeniach [White i wsp. 2002]. To może wyjaśniać, dlaczego wzrost ilości jonów Ca był rejestrowany w korzeniach. Obecność jonów Se może również aktywować kanały wapniowe częściowo zablokowane przez Mn, jak pokazano w przypadku innego stresora [Koselski i wsp. 2019].

Dodatkowo, w korzeniach uszkodzonych przez nadmiar Mn, dodatkowy wychwyt Ca stymulowany przez Se może przyczynić się do „odbudowy” tkanek. Wzrost stężenia jonów Ca podczas inicjacji procesów rozwojowych wykazano w wielu badaniach [Hepler 2005; Lamport i Varnai 2013; Thor 2019]. Ta rola Ca może wyjaśniać pojawienie się centrów merystematycznych w korzeniach u odmiany Nimfa traktowanych jonami Mn (Fig. 15. B). Napływ Ca może być również regulowany przez wytwarzanie RFT podczas reakcji stresowych [Demidchik i wsp. 2007]. Wśród RFT  $H_2O_2$ , podobnie jak Ca, jest cząsteczką uznawaną za ważny element sygnalizacji komórkowej [Demidchik i wsp. 2007], niezależnie od jej zdolności do utleniania biomolekuł i zakłócania ich funkcjonowania. Zatem istotny wzrost stężenia  $H_2O_2$  w obecności Mn, szczególnie widoczny w korzeniach (w porównaniu z kontrolą), może świadczyć zarówno o większym natężeniu stresu w tych organach, jak i w przypadku jonów Ca, jego udziale w „procesie sygnalizacji chemicznej” prowadzącej do ograniczenia zaburzeń w tkance (korzeni) (Tab. 4; Fig. 15. B).

Jak wykazano wcześniej, jony Se mogą stymulować rozwój roślin w niesprzyjających warunkach środowiskowych [Sieprawska i wsp. 2017]. Egzogenna aplikacja Se nie zwiększała stężenia proliny w komórkach pszenicy (Fig. 12. A). Jednak podawany razem z Mn, Se obniżył poziom proliny w porównaniu z roślinami uprawianymi na podłożu z samym Mn. Schat i wsp. [2006] wykazali ponad 20-krotny wzrost stężenia tego aminokwasu w liściach *Silene vulgaris*. Stymulację poziomu proliny pod wpływem stresu metalami ciężkimi zaobserwowano w *Olea europaea* [Zouari i wsp. 2016a] oraz *Phoenix dactylifera* [Zouari i wsp. 2016b]. Nie wyjaśniono jednak, czy akumulację tego aminokwasu można przypisać zwiększonej produkcji enzymów odpowiedzialnych za syntezę proliny czy zmniejszeniu aktywności enzymów związanych z jej degradacją, czy obydwie procesy zachodzą w równowadze ze sobą. U odmian Nimfa i Alibi, synteza proliny zależy w podobnym stopniu od dostępności substratów takich jak kwas glutaminowy i ornityna. Obecność manganu wraz z selenem wydawała się zmieniać (aktywować/hamować) zarówno szlak syntezy proliny inicjowanej glutaminą, jak i ornityną, w zależności od wrażliwości odmiany.

Często podkreśla się, że stres oksydacyjny nie ogranicza się tylko do uszkodzeń biomolekuł wywołanych przez wolne rodniki, ale obejmuje również zaburzenia komórkowego stanu redoks opisane jako „zakłócenie sygnalizacji i kontroli redoks”. Dlatego potencjał antyoksydacyjny oznacza więcej niż tylko wymiatanie wolnych rodników [López-Alarcón i Denicola 2013]. Analiza potencjału antyoksydacyjnego testowanych siewek pszenicy potwierdziła aktywację mechanizmów ochronnych komórek pod wpływem

stresu manganowego (Fig. 13). W testowanych obiektach hamowanie DPPH, całkowita aktywność antyoksydacyjna (TAC) oraz zdolność do redukcji żelaza (FRAP) uległy zwiększeniu po ekspozycji na stres Mn. Wskazuje to na sprawne uruchomienie systemów obronnych komórek i skuteczną neutralizację RFT, które utleniają ważne biomolekuły komórkowe w warunkach toksyczności Mn. Zwiększenie zdolności wychwytywania RFT może być częścią strategii adaptacyjnej siewek pszenicy w tych warunkach środowiskowych. Zastosowanie selenu wraz z manganem dodatkowo wzmocniło potencjał antyoksydacyjny siewek pszenicy. Może to sugerować, że przy większej pojemności antyoksydacyjnej występuje mniej zaburzeń osmotycznych, o czym świadczy niewielki spadek stężenia proliny pod wpływem stresu Mn.

W odpowiedzi na stesy abiotyczne w roślinach wzrasta biosynteza metabolitów wtórnych, w tym polifenoli. Polifenole nadają roślinom wyższą tolerancję na różne warunki stresowe w tym m. in. na podwyższoną zawartość metali ciężkich [Naikoo i wsp. 2019; Handa i wsp. 2019]. Mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników, zatem zwiększenie ich stężenia zarówno w korzeniach jak i liściach testowanych roślin w stresie Mn, może świadczyć o wzmożonej produkcji RFT (Fig. 18). U odmiany Alibi stwierdzono zwiększoną syntezę polifenoli, co sugeruje intensywniejsze działanie stresu Mn na tą odmianę. Biorąc pod uwagę, że selen dodany do pożywki z jonami Mn zmniejszał koncentrację polifenoli w badanych odmianach, może wskazywać na protekcyjne działanie tych jonów w warunkach toksyczności Mn. Zmiany te były wyraźniejsze u odmiany Nimfa co przypuszczalnie może być związane z większą akumulacją Se u tej odmiany.

Obserwacje mikroskopowe struktur liści wykazały mniejsze uszkodzenia tych organów w porównaniu do korzeni w obecności Mn (Fig. 19; Fig. 22). Główne zmiany w tkankach liści dotyczyły tworzenia chloroplastów oraz ilości i dystrybucji skrobi w tych organellach. Zmiany ilościowe i redystrybucję skrobi w chloroplastach stwierdzono pod wpływem różnych stresorów środowiskowych [Filek i wsp. 2010]. Wcześniejsze badania wykazały również zależny od genotypu wzrost akumulacji tego polisacharydu w chloroplastach pod wpływem jonów Mn [Sieprawska i wsp. 2017]. Niewielkie różnice dotyczące modyfikacji chloroplastów badanych roślin poddanych działaniu Mn były głównie rejestrowane jako zmiany w rozmieszczeniu tych organelli w komórkach. Może to wskazywać na porównywalną podatność obu odmian na nadpodaż Mn. Jednak u odmiany Alibi wykazano częściowo uszkodzone liście ze zmianami w chloroplastach typowymi dla mniej tolerancyjnych odmian roślin. Mniejsze mikroskopijne uszkodzenia liści, mogą potwierdzać udział Se w reakcjach ochronnych przed stresem Mn, jak sugerowano na



podstawie doświadczeń opisanych powyżej. W korzeniach zaobserwowano większe różnice anatomiczne pomiędzy badanymi obiektami narażonymi na działanie Mn. U odmiany Alibi, zauważono zmiany w kształcie komórek merystematycznych oraz zmniejszenie liczby i zakresu uszkodzeń strukturalnych komórek czapeczki, a także pojawienie się w obszarze między merystemem a strefą różnicowania dodatkowej (w porównaniu z kontrolą) grupy komórek owalnych, większych niż otaczające komórki (Fig. 22. B'). Ich obecność może wskazywać na potencjalną zmianę kierunku różnicowania komórek w tym obszarze korzenia. Ponadto w strefie wydłużenia komórki często miały nieregularny kształt, niektóre bez widocznych jąder. Takie modyfikacje mogą sugerować, że Mn indukował szybszą apoptozę komórek czapeczki i upośledzał różnicowanie tkanek korzenia. W korzeniach odmiany Nimfa pod wpływem jonów Mn zarejestrowano spadek liczby komórek czapeczki w porównaniu z kontrolą (Fig. 22. C). Charakterystyczną zmianą, obserwowaną tylko w tej odmianie, była obecność grupy małych komórek, z dużymi jądrami i skondensowaną chromatyną, widoczną na granicy merystemu i strefy różnicowania (Fig. 22. C'). Przymuszcza się, że to komórki prokory, które różnicują się w nowy wierzchołek korzenia. Powstawanie nowych wierzchołków korzeni u odmiany Nimfa może być elementem mechanizmów obronnych roślin pozwalających na regenerację roślin nawet po obumarciu korzeni pierwotnych. Może to być związane ze wzrostem zawartości Ca u tych obiektów w obecności Mn. Niezależnie od reakcji stresowych wywoływanych przez jony Mn, ochronna rola Se ujawniła się również w obserwacjach anatomicznych korzeni i spowodowała redukcję zmian wywołanych obecnością jonów Mn. Modyfikacjom anatomicznym indukowanym przez Mn w liściach badanych odmian, głównie w postaci gromadzenia skrobi w plastydach, nie towarzyszyły zmiany w metylacji DNA określone na podstawie globalnego poziomu 5-metC wykrywanego metodą immunocytochemiczną.

Jednocześnie analiza korzeni pszenicy wykazała, że globalny poziom 5-metC różnił się w różnych strefach korzeniowych i tkankach (Fig. 23). Kumpf i wsp. [2015] stwierdzili bardzo niski poziom metylacji DNA w dzielących się, niezróżnicowanych komórkach merystematycznych i krótko żyjących komórkach czapeczki, które wchodzą na ścieżkę apoptozy. Wykazano postępujący wzrost metylacji DNA od dzielących się komórek merystematycznych do różnicujących się i wydłużających się komórek cylindra naczyniowego i kory, mierzony globalnym poziomem 5-metC. Podwyższone poziomy 5-metC w komórkach merystemu i czapeczki w obecności Mn prawdopodobnie odzwierciedlają proces ich apoptozy. Wyższą zawartość 5-metC u odmiany Alibi zaobserwowano tylko w kilku komórkach czapeczki i merystemie, w przeciwieństwie

do odmiany Nimfa, gdzie we wszystkich jądrach komórkowych był widoczny 5-metC. Możemy zatem stwierdzić, że u tej odmiany absorpcja Mn może prowadzić do apoptozy komórek i obumierania głównego wierzchołka wzrostu. Zjawisko metylacji DNA podczas apoptozy zostało opisane w komórkach *Danio rerio* poddanych stresowi niedożywienia [Fan i wsp. 2020]. Ponadto obserwacje mikroskopowe wykazały, że w obu odmianach komórki strefy różnicowania miały potencjalną zdolność do zmiany swojego wzorca różnicowania w obecności Mn, prawdopodobnie w kierunku utworzenia dodatkowego wierzchołka wzrostu. Proces ten wydawał się przebiegać szybciej u odmiany Nimfa, w której stres Mn silnie uszkadzał merystematyczne komórki korzenia. Wychwył Mn powodował szybszą apoptozę komórek czapeczki i upośledzenie różnicowania tkanek korzeniowych. Procesom tym towarzyszyły zmiany w metylacji DNA. Wzrost sygnałów metylacji 5-metC po traktowaniu Mn może wynikać z aktywacji szlaków przeciwdziałających ruchowi transpozonów. Cechą charakterystyczną obserwowaną u obydwu odmian pod wpływem jonów Mn była obecność grup odrębnych komórek w strefie zróżnicowania merystemu. U odmiany Alibi były to większe komórki (Fig. 22. B') z nieznacznie obniżonym poziomem 5-metC. U odmiany Nimfa stanowiły grupę małych komórek o silnie skondensowanym DNA (Fig. 22. C') i zwiększonym poziomie metylacji DNA. Można przypuszczać, że są to komórki, których różnicowanie uległo zmianie. Indukowanymi jonami Mn zmianom kierunku różnicowania towarzyszyły zaburzenia w metylacji DNA. U odmiany Nimfa, wraz z obumarciem głównego wierzchołka, komórki prawdopodobnie różnicują się w nowe wierzchołki korzeni. Utworzenie nowego wierzchołka korzenia może służyć jako mechanizm obronny rośliny w przypadku zamierania głównego wierzchołka korzenia.

Uzyskane rezultaty wskazują, że zmiany powstałe w wyniku narażenia roślin na toksyczne ilości Mn mogą zostać częściowo odwrócone lub zmniejszone poprzez stosowanie jonów selenu, jednakże należy również zwrócić uwagę na systematyczny monitoring gleb pod kątem dostępności tych pierwiastków. Wynika to z faktu, że selen może również aktywować stres oksydacyjny u roślin, jeśli występuje w nadmiarze [Płoskonka i wsp. 2010]

## 6. WNIOSKI

Na podstawie opisanych eksperymentów można stwierdzić:

- i) Odmiany wrażliwe na stres oksydacyjny (Raweta, Maresi i Siwek) akumulowały wyższe ilości Mn w porównaniu do tolerancyjnych (Parabola, CAM/B1 i Bingo), czego fizjologicznym efektem było m.in. zahamowanie wzrostu.
- ii) Aplikacja jonów Mn w stężeniu toksycznym uruchomiła enzymatyczne reakcje ochronne, które były obserwowane z różną intensywnością u badanych zbóż. Peroksydazy były w większym stopniu odpowiedzialne na degradację nadtlenu wodoru w pszenicy i w owsie, podczas gdy w jęczmieniu większy udział miała katalaza.
- iii) Stres manganowy powodował zaburzenia osmotyczne, wykazane jako wzrost syntezy rozpuszczalnych cukrów i proliny, jednakże poziom ochrony był zależny od genotypu.
- iv) Zaburzenia metabolizmu komórkowego w warunkach stresu manganowego zostały potwierdzone przez obserwacje mikroskopowe jako zmiany w strukturach plastydów oraz nagromadzenie zwiększonych ilości skrobi.
- v) Zwiększone pobieranie jonów Mn przez system korzeniowy prowadziło do powstania zaburzeń struktury korzeni, zwłaszcza w ich częściach wierzchołkowych.
- vi) Jony Se mogą stymulować mechanizmy ochronne roślin również w przypadku zastosowania Mn jako czynnika stresowego. Jednak mechanizm działania jonów Se nie był związany z bezpośrednim blokowaniem dopływu Mn do komórek.
- vii) Biofortyfikacja selenem wraz z toksycznym stężeniem Mn zwiększyła aktywację układów odpowiedzialnych za ochronę komórek pszenicy przed wzmożoną generacją RFT w tych warunkach.
- viii) Stymulowany przez Se wychwyt jonów Ca wydaje się być ważnym elementem reakcji ochronnych, m.in. umożliwiającym regenerację tkanek korzeniowych.
- ix) Obserwacje mikroskopowe wskazały na potencjalną zdolność strefy merystematycznej korzeni do modyfikowania ich wzorca różnicowania pod

wpływem stresu Mn, zwłaszcza w przypadku silnego uszkodzenia komórek merystematycznych.

- x) Stres manganowy powoduje podwyższenie poziomu metylacji DNA mierzone jako globalny poziom 5-metC wskazując na prawdopodobną inicjację apoptozy w komórkach i obumieranie głównego wierzchołka wzrostu.

## 7. LITERATURA

1. Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 263-274.
2. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126).
3. Academic press. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2000). Toxicological profile for manganese. *U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service*.
4. Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid—a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 613.
5. Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., & Peiter, E. (2020). Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 300.
6. Alloway, B. J. (1995). Heavy metals in soils. 2.ed. *Blackie Academic & Professional*, (pp 368). Glasgow.
7. Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
8. Ariizumi, T., Lawrence, P. K., & Steber, C. M. (2011). The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant physiology*, 155(2), 765-775.
9. Arshad, T., Maqbool, N., Javed, F., Wahid, A., & Arshad, M. U. (2017). Enhancing the defensive mechanism of lead affected barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes by exogenously applied salicylic acid. *J Agric Sci*, 9(2), 139-146.
10. Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 1227-1238.
11. Arya, S. K., & Roy, B. K. (2011). Manganese induced changes in growth, chlorophyll content and antioxidants activity in seedlings of broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Environmental Biology*, 32(6), 707.
12. Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
13. Baldisserotto, C., Ferroni, L., Anfuso, E., Pagnoni, A., Fasulo, M. P., & Pancaldi, S. (2007). Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese. *Protoplasma*, 231(1), 65-82.
14. Balk, J., & Schaedler, T. A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 125-153.

15. Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Manganese. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 231-237.
16. Barkla, B. J., & Pantoja, O. (2011). Plasma membrane and abiotic stress. In *The plant plasma membrane* (pp. 457-470). Springer, Berlin, Heidelberg.
17. Bartosz, G. (2003). Total antioxidant capacity. *Advances in clinical chemistry*, 37, 219-292.
18. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
19. Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), S498-S501.
20. Becquer, T., Quantin, C., & Boudot, J. P. (2010). Toxic levels of metals in Ferralsols under natural vegetation and crops in New Caledonia. *European Journal of Soil Science*, 61(6), 994-1004.
21. Bernat, P., Gajewska, E., Bernat, T., & Wielanek, M. (2014). Characterisation of the wheat phospholipid fraction in the presence of nickel and/or selenium. *Plant Growth Regulation*, 72, 163-170.
22. Bittner, F. (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in plant science*, 5, 28.
23. Bityutskii, N., Yakkonen, K., Petrova, A., & Nadporozhskaya, M. (2017). Xylem sap mineral analyses as a rapid method for estimation plant-availability of Fe, Zn and Mn in carbonate soils: a case study in cucumber. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(2), 279-290.
24. Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 64-76.
25. Boojar, M. M. A., & Goodarzi, F. (2008). Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 692-699.
26. Borchman, D., & Sinha, S. (2002). Determination of products of lipid oxidation by infrared spectroscopy. In *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols* (pp. 21-28). Humana Press.
27. Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
28. Bowler, R. M., Kornblith, E. S., Gocheva, V. V., Colledge, M. A., Bollweg, G., Kim, Y., ... & Lobdell, D. T. (2015). Environmental exposure to manganese in air: Associations with cognitive functions. *Neurotoxicology*, 49, 139-148.

29. Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteomic approaches. *Journal of proteomics*, 74(11), 2324-2337.
30. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
31. Brindzova, L., Čertík, M., Rapta, P., Zalibera, M., Mikulajova, A., & Takacsova, M. (2008). Antioxidant activity,  $\beta$ -glucan and lipid contents of oat varieties. *Czech journal of food sciences*, 26(3), 163.
32. Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (pp. 191-248). Academic Press.
33. Brouwer, M., Hoexum Brouwer, T., Grater, W., & Brown-Peterson, N. (2003). Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochemical Journal*, 374(1), 219-228.
34. Cady, C. W., Crabtree, R. H., & Brudvig, G. W. (2008). Functional models for the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Coordination chemistry reviews*, 252(3-4), 444-455.
35. Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J. F., Mari, S., & Curie, C. (2010). High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *The Plant Cell*, 22(3), 904-917.
36. Cakmak, I., & Yazici, A. M. (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better crops*, 94(2), 23-25.
37. Carvalho, M., Goss, M., & Teixeira, D. (2015). Manganese toxicity in Portuguese Cambisols derived from granite: causes, limitations of soil analyses and possible solutions. *Revista de Ciências Agrárias*, 38, 518-527.
38. Chaitanya, K. V., Rasineni, G. K., & Reddy, A. R. (2009). Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 437-443.
39. Chao, Y. Y., Chen, C. Y., Huang, W. D., & Kao, C. H. (2010). Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant and Soil*, 329(1), 327-337.
40. Chatterjee, N., & Nagarajan, S. (2006). Evaluation of water binding, seed coat permeability and germination characteristics of wheat seeds equilibrated at different relative humidities. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 43, 233-238.

41. Cheah, M. H., Zhang, M., Shevela, D., Mamedov, F., Zouni, A., & Messinger, J. (2020). Assessment of the manganese cluster's oxidation state via photoactivation of photosystem II microcrystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(1), 141-145.
42. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *61*(2), 192-208.
43. Chen, C., & Dickman, M. B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(9), 3459-3464.
44. Chen, Z., & Gallie, D. R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*, *16*(5), 1143-1162.
45. Chen, Z., Sun, L., Liu, P., Liu, G., Tian, J., & Liao, H. (2015). Malate synthesis and secretion mediated by a manganese-enhanced malate dehydrogenase confers superior manganese tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiology*, *167*(1), 176-188.
46. Chen, Z., Yan, W., Sun, L., Tian, J., & Liao, H. (2016). Proteomic analysis reveals growth inhibition of soybean roots by manganese toxicity is associated with alteration of cell wall structure and lignification. *Journal of Proteomics*, *143*, 151-160.
47. Chi Lin, C., Ting Hsu, Y., & Huei Kao, C. (2002). The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, *36*(3), 275-285.
48. Choudhary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S., & Fatma, T. (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and environmental safety*, *66*(2), 204-209.
49. Cieślewicz, J., & Grzelakowska, A. (2011). Porównanie metod oznaczania zawartości witaminy C w materiale biologicznym na przykładzie papryki słodkiej (*Capsicum annuum* L.). *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology*, *16*.
50. Coahu, C. M., & Pilon, M. (2010). Cell biology of copper. In *Cell biology of metals and nutrients* (pp. 55-74). Springer, Berlin, Heidelberg.
51. Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1763*(7), 747-758.
52. Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, *11*(1), 1-14.
53. Cuellar-Ortiz, S. M., De La Paz Arrieta-Montiel, M. A., Costa-Gallegos, J. & Covarrubias, A. A. (2008). Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant, cell & environment*, *31*(10), 1399-1409.



54. Czarna, M., & Jarmuszkiewicz, W. (2006). Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowana śmierć komórki. *Postępy Biochemii*, 52(2), 145-156.
55. Daniell, H., Lin, C. S., Yu, M., & Chang, W. J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome biology*, 17(1), 1-29.
56. Daramola, B., & Adegoke, G. O. (2011). Bitter kola (*Garcinia kola*) seeds and health management potential. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 213-220). Academic Press.
57. Darecki, A., Saeid, A., & Górecki, H. (2015). Selen w perspektywie fortyfikacji roślin o znaczeniu gospodarczym dla Polski. *Wiadomości chemiczne*.
58. Darvill, J. E., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1980). Structure of Plant Cell Walls: XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1135-1139.
59. Das, A. P., Ghosh, S., Mohanty, S., & Sukla, L. B. (2015). Advances in manganese pollution and its bioremediation. In *Environmental microbial biotechnology* (pp. 313-328). Springer, Cham.
60. Davis, D. W., Hsiao, K., Ingels, R., & Shikiya, J. (1988). Origins of manganese in air particulates in California. *Japca*, 38(9), 1152-1157.
61. De Tullio, M. C., Paciolla, C., Dalla Vecchia, F., Rascio, N., D'Emérico, S., De Gara, L., ... & Arrigoni, O. (1999). Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta*, 209, 424-434.
62. Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and experimental botany*, 109, 212-228.
63. Demidchik, V., Shabala, S. N., Coutts, K. B., Tester, M. A., & Davies, J. M. (2003). Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-permeable channels in plant root cells. *Journal of cell science*, 116(1), 81-88.
64. Demidchik, V., Shabala, S. N., & Davies, J. M. (2007). Spatial variation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca<sup>2+</sup> flux and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels. *The Plant Journal*, 49(3), 377-386.
65. Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R., & Feller, U. (2004). Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 253-266.
66. Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., ... & Frommer, W. B. (2004). The role of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *The Plant Cell*, 16(12), 3413-3425.

67. Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
68. Doncheva, S. N., Poschenrieder, C., Stoyanova, Z., Georgieva, K., Velichkova, M., & Barceló, J. (2009). Silicon amelioration of manganese toxicity in Mn-sensitive and Mn-tolerant maize varieties. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2-3), 189-197.
69. Dowling, D. K., & Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1737-1745.
70. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.
71. Ducic, T., & Polle, A. (2005). Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 103-112.
72. Efroni, I., Eshed, Y., & Lifschitz, E. (2010). Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *The Plant Cell*, 22(4), 1019-1032.
73. Emam, M. M., Khattab, H. E., Helal, N. M., & Deraz, A. E. (2014). Effect of selenium and silicon on yield quality of rice plant grown under drought stress. *Australian Journal of Crop Science*, 8(4), 596-605.
74. Emery, L., Whelan, S., Hirschi, K. D., & Pittman, J. K. (2012). Protein phylogenetic analysis of Ca<sup>2+</sup>/cation antiporters and insights into their evolution in plants. *Frontiers in plant science*, 3, 1.
75. Fan, X., Hou, T., Guan, Y., Li, X., Zhang, S., & Wang, Z. (2020). Genomic responses of DNA methylation and transcript profiles in zebrafish cells upon nutrient deprivation stress. *Science of The Total Environment*, 722, 137980.
76. Fariduddin, Q., Ahmed, M., Mir, B. A., Yusuf, M., & Khan, T. A. (2015). 24-Epibrassinolide mitigates the adverse effects of manganese induced toxicity through improved antioxidant system and photosynthetic attributes in *Brassica juncea*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11349-11359.
77. Fecht-Christoffers, M. M., Braun, H. P., Lemaitre-Guillier, C., VanDorsselaer, A., & Horst, W. J. (2003). Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. *Plant physiology*, 133(4), 1935-1946.
78. Feng, R., Liao, G., Guo, J., Wang, R., Xu, Y., Ding, Y., ... & Li, N. (2016). Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 29-38.

79. Fernandez, J. C., & Burch-Smith, T. M. (2019). Chloroplasts as mediators of plant biotic interactions over short and long distances. *Current opinion in plant biology*, 50, 148-155.
80. Fernando, D. R., & Lynch, J. P. (2015). Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. *Annals of botany*, 116(3), 313-319.
81. Fichman, Y., Gerdes, S. Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., & Csonka, L. N. (2015). Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biological Reviews*, 90(4), 1065-1099.
82. Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z., & Golda, A. (2008). The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 165(8), 833-844.
83. Filek, M., Kościelniak, J., Łabanowska, M., Bednarska, E., & Bidzińska, E. (2010). Selenium-induced protection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements. *Photosynthesis research*, 105(1), 27-37.
84. Filek, M., Łabanowska, M., Kościelniak, J., Biesaga-Kościelniak, J., Kurdziel, M., Szarejko, I., & Hartikainen, H. (2015). Characterization of barley leaf tolerance to drought stress by chlorophyll fluorescence and electron paramagnetic resonance studies. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(3), 228-240.
85. Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Kornaś, A., Wietecka-Posłuszny, R., & Walas, P. (2009). Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96, 19-28.
86. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.
87. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
88. Führs, H., Behrens, C., Gallien, S., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Braun, H. P., & Horst, W. J. (2010). Physiological and proteomic characterization of manganese sensitivity and tolerance in rice (*Oryza sativa*) in comparison with barley (*Hordeum vulgare*). *Annals of Botany*, 105(7), 1129-1140.
89. Führs, H., Götze, S., Specht, A., Erban, A., Gallien, S., Heintz, D., ... & Horst, W. J. (2009). Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1663-1678.
90. Führs, H., Specht, A., Erban, A., Kopka, J., & Horst, W. J. (2012). Functional associations between the metabolome and manganese tolerance in *Vigna unguiculata*. *Journal of experimental botany*, 63(1), 329-340.

91. Furt, F., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2011). Lipids of the plant plasma membrane. In *The plant plasma membrane* (pp. 3-30). Springer, Berlin, Heidelberg.
92. Gabryś, H., Kacperska, A., Kopcewicz, J., Lewak, S., Starck, Z., Strzałka, K., & Tretyn, A. (2002). *Fizjologia roślin* (pp. 35-38, 498-502). Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
93. Gao, F., Kinnula, V. L., Myllärniemi, M., & Oury, T. D. (2008). Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, *10*(2), 343-354.
94. Gao, L., Peng, K., Xia, Y., Wang, G., Niu, L., Lian, C., & Shen, Z. (2013). Cadmium and manganese accumulation in *Phytolacca americana* L. and the roles of non-protein thiols and organic acids. *International journal of phytoremediation*, *15*(4), 307-319.
95. Garstka, M. (2007). Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy. *Postępy Biologii Komórki*, *34*(3), 445-476.
96. Gasyna, Z. (1975). Struktura i funkcje katalazy. *Postępy Biochemii*, *21*(2), 175-191.
97. Georgieva, M., Djilianov, D., Konstantinova, T., & Parvanova, D. (2004). Screening of Bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance in vitro. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *18*(2), 95-98.
98. Gest, N., Gautier, H., & Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule?. *Journal of Experimental Botany*, *64*(1), 33-53.
99. Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International journal of environmental science and technology*, *16*(3), 1807-1828.
100. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.
101. González-Cruz, J., & Pastenes, C. (2012). Water-stress-induced thermotolerance of photosynthesis in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants: The possible involvement of lipid composition and xanthophyll cycle pigments. *Environmental and Experimental Botany*, *77*, 127-140.
102. Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S., & Pushpangadan, P. (2003). Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological and pharmaceutical Bulletin*, *26*(10), 1424-1427.
103. Grygo-Szymanko, E., Tobiasz, A., & Walas, S. (2016). Speciation analysis and fractionation of manganese: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *80*, 112-124.

104. Grzesiak, M., Filek, M., Barbasz, A., Kreczmer, B., & Hartikainen, H. (2013). Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG-and NaCl-induced stresses. *Plant Growth Regulation*, 69(2), 177-189.
105. Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 190-198.
106. Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G., & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 728-736.
107. Gunier, R. B. (2013). Exposure to manganese from agricultural pesticide use and neurodevelopment in young children (Doctoral dissertation, UC Berkeley).
108. Gustin, J. L., Zanis, M. J., & Salt, D. E. (2011). Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 1-13.
109. Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1989). 1 Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's clinical haematology*, 2(2), 195-256.
110. Gzyl-Malcher, B., Rudolphi-Skórska, E., Sieprawska, A., & Filek, M. (2019). Manganese protects wheat from the mycotoxin zearalenone and its derivatives. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
111. Hafeez, B. M. K. Y., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of zinc in plant nutrition-a review. *American journal of experimental Agriculture*, 3(2), 374.
112. Hajiboland, R. (2012). Effect of micronutrient deficiencies on plants stress responses. In *Abiotic stress responses in plants* (pp. 283-329). Springer, New York, NY.
113. Hameed, A., Goher, M., & Iqbal, N. (2013). Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 57(2), 370-374.
114. Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(9), 3007-3017.
115. Handa, N., Kohli, S. K., Sharma, A., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., Abd\_Allah, E. F., ... & Ahmad, P. (2019). Selenium modulates dynamics of antioxidative defence expression, photosynthetic attributes and secondary metabolites to mitigate chromium toxicity in *Brassica juncea* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 180-192.

116. Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of experimental botany*, 50(333), 413-434.
117. Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Silva, J. A., & Fujita, M. (2012). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop stress and its management: perspectives and strategies* (pp. 261-315). Springer, Dordrecht.
118. Hasanuzzaman, M., Matin, M. A., Fardus, J., Hasanuzzaman, M., Hossain, M. S., & Parvin, K. (2019). Foliar application of salicylic acid improves growth and yield attributes by upregulating the antioxidant defense system in *Brassica campestris* plants grown in lead-amended soils. *Acta Agrobotanica*, 72(2).
119. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 249-268.
120. Hepler, P. K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17(8), 2142-2155.
121. Huang, H., Zhao, Y., Xu, Z., Zhang, W., & Jiang, K. (2019). Physiological responses of *Broussonetia papyrifera* to manganese stress, a candidate plant for phytoremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 181, 18-25.
122. Huang, X., Fan, Y., Shabala, L., Rengel, Z., Shabala, S., & Zhou, M. X. (2018). A major QTL controlling the tolerance to manganese toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular breeding*, 38(2), 1-9.
123. Huber, S. C., & Israel, D. W. (1982). Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr.) leaves. *Plant physiology*, 69(3), 691-696.
124. Huo, Y., Gao, L., Liu, B., Yang, Y., Kong, S., Sun, Y., ... & Wu, X. (2019). Complete chloroplast genome sequences of four *Allium* species: comparative and phylogenetic analyses. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
125. Ibrahim, H. I. M., & Al-Wasfy, M. M. (2014). The promotive impact of using silicon and selenium with potassium and boron on fruiting of Valencia orange trees grown under Minia region conditions. *World Rural Observations*, 6(2), 28-36.
126. Inze, D., & Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Current opinion in Biotechnology*, 6(2), 153-158.
127. Janda, K., Kasprzak, M., & Wolska, J. (2015). Vitamin C—structure, properties, occurrence and functions. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(4).
128. Janeczko, A., Biesaga-Kościelniak, J., Oklešt'ková, J., Filek, M., Dziurka, M., Szarek-Łukaszewska, G., & Kościelniak, J. (2010). Role of 24-epibrassinolide in

- wheat production: physiological effects and uptake. *Journal of agronomy and crop science*, 196(4), 311-321.
129. Jones, D., & Sies, H. (2007). Oxidative stress. *Encyclopedia of stress*, 3, 45-48.
130. Juice, S. M., Fahey, T. J., Siccama, T. G., Driscoll, C. T., Denny, E. G., Eagar, C., ... & Richardson, A. D. (2006). Response of sugar maple to calcium addition to northern hardwood forest. *Ecology*, 87(5), 1267-1280.
131. Kanai, M., Higuchi, K., Hagihara, T., Konishi, T., Ishii, T., Fujita, N., ... & Tadano, T. (2007). Common reed produces starch granules at the shoot base in response to salt stress. *New Phytologist*, 176(3), 572-580.
132. Kaniuczak, J., & Augustyn, Ł. (2011). Zawartość jonów metali w wodach powierzchniowych przeznaczonych do zaopatrzenia ludności w wodę do spożycia. *Inżynieria Ekologiczna*, 27, 33-45.
133. Karsznicka, A. M., & Grzesik, M. (2004). Reakcja nasion astra chińskiego na stres oksydacyjny wywołany niekorzystnymi warunkami przechowywania i metody poprawiania ich wigoru. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 496(1).
134. Kaur, G., & Asthir, B. J. B. P. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia plantarum*, 59(4), 609-619.
135. Kerchev, P. I., Pellny, T. K., Vivancos, P. D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S., ... & Foyer, C. H. (2011). The transcription factor ABI4 is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3319-3334.
136. Khaleghi, E., Arzani, K., Moallemi, N., & Barzegar, M. (2012). Evaluation of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters and relationships between chlorophyll a, b and chlorophyll content index under water stress in *Olea europaea* cv. Dezful. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 6(8), 636-639.
137. Khokon, M. A. R., Okuma, E. I. J. I., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., ... & Murata, Y. (2011). Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 34(3), 434-443.
138. Kleiber, T. (2014). Effect of Manganese Nutrition on Content of Nutrient and Yield of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) in Hydroponic. *Ecological Chemistry and Engineering*, 21(3), 529.
139. Kornaś, A., Filek, M., Sieprawska, A., Bednarska-Kozakiewicz, E., Gawrońska, K., & Miszalski, Z. (2019). Foliar application of selenium for protection against the first stages of mycotoxin infection of crop plant leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 482-485.

140. Koselski, M., Dziubińska, H., Trębacz, K., Sieprawska, A., & Filek, M. (2019). The Role of SV Ion Channels Under the Stress of Mycotoxins Induced in Wheat Cells—Protective Action of Selenium Ions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1255-1259.
141. Kováčik, J., Tomko, J., Bačkor, M., & Repčák, M. (2006). *Matricaria chamomilla* is not a hyperaccumulator, but tolerant to cadmium stress. *Plant Growth Regulation*, 50(2), 239-247.
142. Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
143. Kumar, M. (2013). Crop plants and abiotic stresses. *J. Biomol. Res. Ther*, 3(1).
144. Kumar, V., & Radziemska, M. (2021). Impact of physiochemical properties, microbes and biochar on bioavailability of toxic elements in the soil: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-18.
145. Kumpf, R. P., & Nowack, M. K. (2015). The root cap: a short story of life and death. *Journal of experimental botany*, 66(19), 5651-5662.
146. Lamport, D. T., & Várnai, P. (2013). Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist*, 197(1), 58-64.
147. Lattanzio, V., Cardinali, A., & Linsalata, V. (2012). Plant phenolics: a biochemical and physiological perspective. *Recent advances in polyphenol research*, 3, 1-39.
148. Lavres Junior, J., Malavolta, E., Nogueira, N. D. L., Moraes, M. F., Reis, A. R., Rossi, M. L., & Cabral, C. P. (2009). Changes in anatomy and root cell ultrastructure of soybean genotypes under manganese stress. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33, 395-403.
149. Le Martret, B., Poage, M., Shiel, K., Nugent, G. D., & Dix, P. J. (2011). Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9(6), 661-673.
150. Li, J., Jia, Y., Dong, R., Huang, R., Liu, P., Li, X., ... & Chen, Z. (2019). Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5096.
151. Li, X., Chanroj, S., Wu, Z., Romanowsky, S. M., Harper, J. F., & Sze, H. (2008). A distinct endosomal  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  pump affects root growth through the secretory process. *Plant physiology*, 147(4), 1675-1689.
152. Liang, T., Ding, H., Wang, G., Kang, J., Pang, H., & Lv, J. (2016). Sulfur decreases cadmium translocation and enhances cadmium tolerance by promoting sulfur



- assimilation and glutathione metabolism in *Brassica chinensis* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 124, 129-137.
153. Lindsay, W. L. (1979). *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons Ltd..
154. Liou, P. J. (1983). Air pollution emission profiles of toxic and trace elements from energy related sources: status and needs. *Neurotoxicology*, 4(3), 103-112.
155. Littlejohn, G. R., Breen, S., Smirnoff, N., & Grant, M. (2021). Chloroplast immunity illuminated. *New Phytologist*, 229(6), 3088-3107.
156. Liu, P., Tang, X., Gong, C., & Xu, G. (2010). Manganese tolerance and accumulation in six Mn hyperaccumulators or accumulators. *Plant and soil*, 335(1), 385-395.
157. López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763, 1-10.
158. Lu, M., Yang, G., Li, P., Wang, Z., Fu, S., Zhang, X., ... & Xia, J. (2018). Bioinformatic and functional analysis of a key determinant underlying the substrate selectivity of the Al transporter, Nrnt1. *Frontiers in plant science*, 9, 606.
159. Lück, H. (1965). Peroxidase. *Methods of enzymatic analysis*, (Vol. 1, pp. 895-897). Academic press.
160. Luo, Y., Wei, Y., Sun, S., Wang, J., Wang, W., Han, D., ... & Fu, Y. (2019). Selenium modulates the level of auxin to alleviate the toxicity of cadmium in tobacco. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3772.
161. Lutts, S., Majerus, V., & Kinet, J. M. (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 450-458.
162. Lynch, J. P., & Clair, S. B. S. (2004). Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research*, 90(1), 101-115.
163. Maathuis, F. J., & Diatloff, E. (2013). Roles and functions of plant mineral nutrients. *Plant mineral nutrients*, 1-21.
164. Macfie, S. M., & Taylor, G. J. (1992). The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. *Physiologia Plantarum*, 85(3), 467-475.
165. Mafakheri, A., Siosemardeh, A. F., Bahramnejad, B., Struik, P. C., & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian journal of crop science*, 4(8), 580-585.

166. Malhotra, H., Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In *Plant nutrients and abiotic stress tolerance* (pp. 171-190). Springer, Singapore.
167. Marques, E., Darby, H. M., & Kraft, J. (2021). Benefits and limitations of non-transgenic micronutrient biofortification approaches. *Agronomy*, *11*(3), 464.
168. Martinez-Finley, E. J., Gavin, C. E., Aschner, M., & Gunter, T. E. (2013). Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *62*, 65-75.
169. Maziarka, D., & Krogulska, B. (2018). Mangan w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Główny Inspektorat Sanitarny*.
170. McConnell, I., Li, G., & Brudvig, G. W. (2010). Energy conversion in natural and artificial photosynthesis. *Chemistry & biology*, *17*(5), 434-447.
171. McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, *244*(22), 6049-6055.
172. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., ... & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, *5*(12), e02952.
173. Mendoza, M. P., Llopis, C. M., Sánchez, J., & Boix, L. R. (2006). Heavy metal content of agricultural soils in a Mediterranean semiarid area: the Segura River Valley (Alicante, Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, *(4)*, 363-372.
174. Millaleo, R., Rao, M., Ulloa-Inostroza, E., Duran, P., & Mora, M. D. L. L. (2018). Early responses to manganese (Mn) excess and its relation to antioxidant performance and organic acid exudation in barley cultivars. *Journal of soil science and plant nutrition*, *18*(4), 1206-1223.
175. Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*, *586*(5), 585-595.
176. Mills, R. F., Doherty, M. L., López-Marqués, R. L., Weimar, T., Dupree, P., Palmgren, M. G., ... & Williams, L. E. (2008). ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. *Plant physiology*, *146*(1), 116-128.
177. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., & Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant physiology and biochemistry*, *44*(1), 25-37.
178. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), 405-410.

179. Miyake, C., & Asada, K. (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, 33(5), 541-553.
180. Mohan, R., Vijayan, P., & Kolattukudy, P. E. (1993). Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (tap1) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant molecular biology*, 22(3), 475-490.
181. Mora, M. D., Rosas, A., Ribera, A., & Rengel, Z. (2009). Differential tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass genotypes: involvement of antioxidative enzymes and root exudation of carboxylates. *Plant and Soil*, 320(1), 79-89.
182. Morales, C. G., Pino, M. T., & Del Pozo, A. (2013). Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 162, 234-241.
183. Moroni, J. S., Scott, B. J., & Wratten, N. (2003). Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. *Plant and Soil*, 253(2), 507-519.
184. Murphy, A. S., Peer, W., & Schulz, B. (Eds.). (2010). *The plant plasma membrane* (Vol. 19). Springer Science & Business Media.
185. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Illustrated Biochemistry*.
186. Nádaská, G., Lesný, J., & Michalík, I. (2010). Environmental aspect of manganese chemistry, *Hungarian Journal of Sciences, ENV-100702-A*, 1-16.
187. Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., ... & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules*, 157-168.
188. Nazar, R., Umar, S., Khan, N. A., & Sareer, O. (2015). Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. *South African Journal of Botany*, 98, 84-94.
189. Nevo, Y., & Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 609-620.
190. Nickelsen, J., & Rengstl, B. (2013). Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annual review of plant biology*, 64, 609-635.
191. Niedojadło, K., Hyjek, M., & Bednarska-Kozakiewicz, E. (2015). Spatial and temporal localization of homogalacturonans in *Hyacinthus orientalis* L. ovule cells before and after fertilization. *Plant cell reports*, 34(1), 97-109.

192. Nio, S. A., Cawthray, G. R., Wade, L. J., & Colmer, T. D. (2011). Pattern of solutes accumulated during leaf osmotic adjustment as related to duration of water deficit for wheat at the reproductive stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1126-1137.
193. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
194. Palmer, C. M., & Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature chemical biology*, 5(5), 333-340.
195. Paľove-Balang, P., Kisová, A., Pavlovkin, J., & Mistrík, I. (2006). Effect of manganese on cadmium toxicity in maize seedlings. *Plant Soil Environ*, 52, 143-149.
196. Pandey, M., Shrestha, J., Subedi, S., & Shah, K. K. (2020). Role of nutrients in wheat: a review. *Tropical Agrobiodiversity*, 1(1), 18-23.
197. Parashar, A., Yusuf, M., Fariduddin, Q., & Ahmad, A. (2014). Salicylic acid enhances antioxidant system in Brassica juncea grown under different levels of manganese. *International journal of biological macromolecules*, 70, 551-558.
198. Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
199. Pawęska, K., Malczewska, B., Bawiec, A., & Bauerek, A. (2016). Zawartość żelaza i manganu oraz wybranych metali ciężkich na przykładzie wód ze studni gospodarczych w gminie Gorzyce. *Inżynieria Ekologiczna*, 49, 131-135.
200. Peng, K., Luo, C., You, W., Lian, C., Li, X., & Shen, Z. (2008). Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator—*Phytolacca Americana* L. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 674-681.
201. Pinheiro, C., Chaves, M. M., & Ricardo, C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1063-1070.
202. Pilon-Smits, E. A., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 267-274.
203. Pittman, J. K. (2005). Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist*, 167(3), 733-742.
204. Płoskonka, J., Rudolphi-Szydło, E., & Sieprawska, A. (2010). The influence of selenium on the accumulation of K and Ca ions in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, (545).

205. Proietti, P., Nasini, L., Del Buono, D., D'Amato, R., Tedeschini, E., & Businelli, D. (2013). Selenium protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. *Scientia Horticulturae*, *164*, 165-171.
206. Qian, H. F., Peng, X. F., Han, X., Ren, J., Zhan, K. Y., & Zhu, M. (2014). The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian journal of plant physiology*, *61*(4), 467-475.
207. Qin, X., Nie, Z., Liu, H., Zhao, P., Qin, S., & Shi, Z. (2018). Influence of selenium on root morphology and photosynthetic characteristics of winter wheat under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, *150*, 232-239.
208. Rahman, A., Hossain, M., Mahmud, J. A., Nahar, K., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2016). Manganese-induced salt stress tolerance in rice seedlings: regulation of ion homeostasis, antioxidant defense and glyoxalase systems. *Physiology and molecular biology of plants*, *22*(3), 291-306.
209. Rajpoot, R., Srivastava, R. K., Rani, A., Pandey, P., & Dubey, R. S. (2021). Manganese-induced oxidative stress, ultrastructural changes, and proteomics studies in rice plants. *Protoplasma*, *258*(2), 319-335.
210. Raskin, I., Turner, I. M., & Melander, W. R. (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(7), 2214-2218.
211. Razaq, M., Zhang, P., & Shen, H. L. (2017). Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of Acer mono. *PloS one*, *12*(2), e0171321.
212. Requena, L., & Bornemann, S. (1999). Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *Biochemical Journal*, *343*(1), 185-190.
213. Rimmer, D. L., Reichman, S. M., & Menzies, N. W. (2001). Bioavailability of Cu, Zn, and Mn in contaminated soils and speciation in soil solution. In *Trace Elements in Soil* (pp. 93-106). CRC Press.
214. Rinalducci, S., Murgiano, L., & Zolla, L. (2008). Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*, *59*(14), 3781-3801.
215. Rodriguez, R. E., Debernardi, J. M., & Palatnik, J. F. (2014). Morphogenesis of simple leaves: regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *3*(1), 41-57.
216. Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N., & Aro, E. M. (2005). Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochemical Journal*, *388*(1), 159-168.
217. Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., & Bevan, M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, cell & environment*, *29*(3), 426-434.

218. Rosas, A., Rengel, Z., & de la Luz Mora, M. (2007). Manganese supply and pH influence growth, carboxylate exudation and peroxidase activity of ryegrass and white clover. *Journal of Plant Nutrition*, 30(2), 253-270.
219. Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24.
220. Ruiz, J. M. R. R., & Romero, L. (2005). Relationship between proline metabolism and NAD kinase in green bean plants subjected to short-term salt stress. *J Food Agric Environ*, 3(1), 195-198.
221. Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118.
222. Santos, E. F., Santini, J. M. K., Paixão, A. P., Júnior, E. F., Lavres, J., Campos, M., & Dos Reis, A. R. (2017). Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. *Plant physiology and biochemistry*, 113, 6-19.
223. Schat, H., Sharma, S. S., & Vooijs, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia plantarum*, 101(3), 477-482.
224. Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002). Root development. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 1.
225. Schmidt, S. B., & Husted, S. (2019). The biochemical properties of manganese in plants. *Plants*, 8(10), 381.
226. Ścibior, D., & Czczot, H. (2006). Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 60, 170-180.
227. Sebastian, A., & Prasad, M. N. V. (2015). Iron-and manganese-assisted cadmium tolerance in *Oryza sativa* L.: lowering of rhizotoxicity next to functional photosynthesis. *Planta*, 241(6), 1519-1528.
228. Sečenji, M., Hideg, E., Bebes, A., & Györgyey, J. (2010). Transcriptional differences in gene families of the ascorbate–glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant cell reports*, 29(1), 37-50.
229. Selmar, D. (2008). Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung Volkenrode*, 58(1/2), 139.
230. Selvaraj, K. (2018). Effect of nickel chloride on the growth and biochemical characteristics of phaseolus mungol. *JOJ Sciences*, 1(2), 18-23.

231. Sergiev, I., Alexieva, V., & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51(3), 121-124.
232. Shao, J. F., Yamaji, N., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2017). The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters. *Trends in Plant Science*, 22(3), 215-224.
233. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452.
234. Sharma, A., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2017). The role of calcium in plant signal transduction under macronutrient deficiency stress. *Plant Macronutrient Use Efficiency*, 181-196.
235. Sharma, B. D., Mukhopadhyay, S. S., & Katyal, J. C. (2006). Distribution of total and dtpa-extractable zinc, copper, manganese, and iron in vertisols of India. *Communications in soil science and plant analysis*, 37(05-06), 653-672.
236. Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant growth regulation*, 46(3), 209-221.
237. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
238. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
239. Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of experimental botany*, 57(4), 711-726.
240. Sharma, S., & Uttam, K. N. (2016). Investigation of the manganese stress on wheat plant by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 49(8), 520-528.
241. Sharma, S., Kaur, J., Nagpal, A. K., & Kaur, I. (2016). Quantitative assessment of possible human health risk associated with consumption of arsenic contaminated groundwater and wheat grains from Ropar Wetland and its environs. *Environmental monitoring and assessment*, 188(9), 1-14.
242. Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1537-1553.
243. Shigaki, T. & Hirschi, K. D. (2006). Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biology*, 8(04), 419-429.

244. Shishkova, S., Rost, T. L., & Dubrovsky, J. G. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of botany*, 101(3), 319-340.
245. Sieprawska, A., Filek, M., Tobiasz, A., Bednarska-Kozakiewicz, E., Walas, S., Dudek-Adamska, D., & Grygo-Szymanko, E. (2017). Response of chloroplasts of tolerant and sensitive wheat genotypes to manganese excess: structural and biochemical properties. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1), 1-6.
246. Sieprawska, A., Kornas, A., & Filek, M. (2015). Involvement of selenium in protective mechanisms of plants under environmental stress conditions-review. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 57(1).
247. Skórka, M., Sieprawska, A., Bednarska-Kozakiewicz, E., Gawrońska, K., Kornas, A., & Telk, A. (2020). Genotype-dependent differences between cereals in response to manganese excess in the environment. *Agronomy*, 10(4), 510.
248. Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 229-235.
249. Socha, A. L., & Guerinot, M. L. (2014). Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 106.
250. Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Adam, V., Hubalek, J., & Kizek, R. (2012). Automation of methods for determination of lipid peroxidation. *Lipid peroxidation*.
251. Song, W. Y., Yang, H. C., Shao, H. B., Zheng, A. Z., & Brestic, M. (2014). The alleviative effects of salicylic acid on the activities of catalase and superoxide dismutase in malting barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling leaves stressed by heavy metals. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 42(1), 88-97.
252. Staehelin, L. A. (2003). Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis research*, 76(1), 185-196.
253. Stewart, R. R., & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant physiology*, 65(2), 245-248.
254. Stines, A. P., Naylor, D. J., Høj, P. B., & Van Heeswijk, R. (1999). Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiology*, 120(3), 923-923.
255. Strzałka, K. (2002). Fotosynteza i chemosynteza W: Fizjologia roślin (pp. 272-328). *Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa*.
256. Szepesi, Á., & Szöllősi, R. (2018). Mechanism of proline biosynthesis and role of proline metabolism enzymes under environmental stress in plants. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 337-353). Academic Press.



257. Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology fifth Edition*. Sinauer Associates., Inc. 23 Plum tree Road, Sunderland, MA 01375, USA.
258. Takeda, A., Kimura, K., & Yamasaki, S. I. (2004). Analysis of 57 elements in Japanese soils, with special reference to soil group and agricultural use. *Geoderma*, 119(3-4), 291-307.
259. Tanase, C., Bujor, O. C., & Popa, V. I. (2019). Phenolic natural compounds and their influence on physiological processes in plants. In *Polyphenols in plants* (pp. 45-58). Academic Press.
260. Thalmann, M., & Santelia, D. (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist*, 214(3), 943-951.
261. Thor, K. (2019). Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in plant science*, 10, 440.
262. Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of proteomics*, 71(4), 391-411.
263. Tkaczyk, P., Bednarek, W., Dresler, S., Krzyszczak, J., Baranowski, P., & Sławiński, C. (2017). Relationship between assimilable-nutrient content and physicochemical properties of topsoil. *International Agrophysics*, 31(4), 551.
264. Tobiasz, A., Walas, S., Filek, M., Mrowiec, H., Samsel, K., Sieprawska, A., & Hartikainen, H. (2014). Effect of selenium on distribution of macro- and micro-elements to different tissues during wheat ontogeny. *Biologia plantarum*, 58(2), 370-374.
265. Tufail, A., Arfan, M., Gurmani, A. R., Khan, A., & Bano, A. (2013). Salicylic acid induced salinity tolerance in maize (*Zea mays*). *Pak J Bot*, 45(S1), 75-82.
266. Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 173-178.
267. U.S. EPA. (2004). Drinking Water Health Advisory for Manganese. *U.S. Environmental Protection Agency Office of Water*. Washington, DC 20460.
268. Umamaheswari, M., & Chatterjee, T. K. (2008). In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(1), 61-73.
269. Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., & Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on

- phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 710(2), 197-211.
270. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
271. Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
272. Vogel, R. H. (1960). Some properties of ornithine  $\delta$ -transaminase from *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 539-540.
273. Wang, C., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J., Ao, Y., ... & Li, L. (2011). Salicylic acid involved in the regulation of nutrient elements uptake and oxidative stress in *Vallisneria natans* (Lour.) Hara under Pb stress. *Chemosphere*, 84(1), 136-142.
274. Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7370-7390.
275. Warriar, R. R., Paul, M., & Vineetha, M. V. (2013). Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and plant physiology*, 3(1-2), 90-97.
276. Watson, S. J., Sowden, R. G., & Jarvis, P. (2018). Abiotic stress-induced chloroplast proteome remodelling: a mechanistic overview. *Journal of experimental botany*, 69(11), 2773-2781.
277. Wawrzyńska, A., & Sirko, A. (2014). To control and to be controlled: understanding the Arabidopsis SLIM1 function in sulfur deficiency through comprehensive investigation of the EIL protein family. *Frontiers in plant science*, 5, 575.
278. White, P. J., Bowen, H. C., Demidchik, V., Nichols, C., & Davies, J. M. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1564(2), 299-309.
279. Whittaker, M. M., & Whittaker, J. W. (2002). Characterization of recombinant barley oxalate oxidase expressed by *Pichia pastoris*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(1), 136-145.
280. Whittaker, M. M., Pan, H. Y., Yukl, E. T., & Whittaker, J. W. (2007). Burst kinetics and redox transformations of the active site manganese ion in oxalate oxidase: implications for the catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7011-7023.
281. Wilkins, K. A., Matthus, E., Swarbreck, S. M., & Davies, J. M. (2016). Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in plant science*, 7, 1296.
282. Williams, M., Todd, G. D., Roney, N., Crawford, J., Coles, C., McClure, P. R., ... & Citra, M. (2013). Toxicological profile for manganese.

283. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
284. Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., & Ma, J. F. (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18381-18385.
285. Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Yoshida, Y. (2005). Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1975-1981.
286. Yao, Y., Xu, G., Mou, D., Wang, J., & Ma, J. (2012). Subcellular Mn compartmentation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese. *Chemosphere*, 89(2), 150-157.
287. Yen, M. R., Tseng, Y. H., & Saier Jr, M. H. (2001). Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology*, 147(11), 2881-2883.
288. Yeo, A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 915-929.
289. Zabłocka, A., & Janusz, M. (2008). The two faces of reactive oxygen species. *Postępy Hig Med Dosw.(online)*, 62, 118-124.
290. Zagorchev, L., Teofanova, D., & Odjakova, M. (2016). Ascorbate–glutathione cycle: controlling the redox environment for drought tolerance. In *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1* (pp. 187-226). Springer, Cham.
291. Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, 72(1), 19-66.
292. Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 131-144.
293. Zhang, Y., Sampathkumar, A., Kerber, S. M. L., Swart, C., Hille, C., Seerangan, K., ... & Fernie, A. R. (2020). A moonlighting role for enzymes of glycolysis in the co-localization of mitochondria and chloroplasts. *Nature communications*, 11(1), 1-15.
294. Zhang, P., & Omaye, S. T. (2001). Antioxidant and prooxidant roles for  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicology in vitro*, 15(1), 13-24.
295. Zhao, Y., Hu, C., Wang, X., Qing, X., Wang, P., Zhang, Y., ... & Zhao, X. (2019). Selenium alleviated chromium stress in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) by regulating root morphology and metal element uptake. *Ecotoxicology and environmental safety*, 173, 314-321.

- 
296. Zhu, S. Y., Yu, X. C., Wang, X. J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R. C., ... & Zhang, D. P. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(10), 3019-3036.
297. Zhu, W., & Richards, N. G. (2017). Biological functions controlled by manganese redox changes in mononuclear Mn-dependent enzymes. *Essays in biochemistry*, 61(2), 259-270.
298. Zhu, X., Song, F., & Liu, S. (2011). Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 9(2), 583-587.
299. Zouari, M., Ahmed, C. B., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., ... & Rouina, B. B. (2016a). Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 128, 195-205.
300. Zouari, M., Ahmed, C. B., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., ... & Abdallah, F. B. (2016b). Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 128, 100-108.