

# ***Postępy nauk rolniczych***

***Advances in Agricultural Sciences***

***4/2010***

***Polska Akademia Nauk  
Wydział Nauk  
Rolniczych, Leśnych  
i Weterynaryjnych***

***Kwartalnik  
nr 344 rok 62***

### **Rada Redakcyjna**

A. Grzywacz (przewodniczący),  
J. Haman, T. Krzymowski, J.J. Lipa  
A. Rutkowski, F. Tomczak, M. Truszczyński, J. Wilkin

### **Redakcja**

A. Horubała (redaktor naczelny),  
J. Buliński, A. Gawrońska-Kulesza, W. Józwiak, J. Zimny, T. Żebrowska,  
R. Suska (sekretarz redakcji)

### **Adres Redakcji**

00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, pokój 2102  
tel. 22 620 33 71, 22 656 64 66  
e-mail: Wydzial5@pan.pl

Wydanie publikacji dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Opracowanie redakcyjne, korekta i skład — Danuta Borecka

**PL ISSN 0032-5547**

Nakład 200 egz. Ark. wyd. 10. Ark. druk. 8,75.  
Druk — Warszawska Drukarnia Naukowa PAN,  
00-656 Warszawa, ul. Śniadeckich 8, tel./faks 22 628 87 77



**Profesor Jerzy Ważny**  
**(1927 – 2010)**

Jerzy Ważny urodził się 18 grudnia 1927 roku w Borysławiu w ówczesnym województwie lwowskim. Studia ukończył na Wydziale Leśnym SGGW w Warszawie w 1950 r., specjalizując się w zakresie patologii i konserwacji drewna pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Kochmana. Po uzyskaniu dyplomu uzupełniał swoje przygotowanie specjalistyczne na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, w zakresie anatomii i cytologii drewna u ks. prof. dr Józefa Szulety oraz w zakresie mikrobiologii u prof. dr Kazimierza Basalika. Już podczas studiów J. Ważny podjął w 1949 r. pracę w Instytucie Technologii Budowlanej, gdzie do 1956 r. prowadził prace badawcze w zakresie ochrony i konserwacji drewna w budownictwie. W latach 1956–1978 pracował początkowo w Katedrze Fitopatologii SGGW, która organizacyjnie wchodzi w skład Wydziału Ogrodniczego, a następnie w Zakładzie Fitopatologii Leśnej i Konserwacji Drewna na Wydziale Leśnym SGGW. Prof. J. Ważny był twórcą i pierwszym kierownikiem tego Zakładu, który od 1979 r. pod nazwą Zakładu (Katedry) Ochrony Drewna funkcjonuje na Wydziale Technologii Drewna SGGW.

Jerzy Ważny stopień doktora nauk technicznych uzyskał na Wydziale Technologii Drewna w 1957 r. na podstawie rozprawy „Wpływ działania grzybów *Merulius lacrymans* (WULF.) FR. i *Coniophora cerebella* PERS. na fizyczne właściwości niektórych gatunków drewna”. Stopień doktora habilitowanego nauk leśnych uzyskał w 1962 r. na Wydziale Leśnym SGGW na podstawie dorobku naukowego i rozprawy „Badania nad wpływem odżywiania mineralnego na wzrost grzybów *Coniophora cerebella* PERS. i *Merulius lacrymans* (WULF.) FR.” Tytuł profesora nadzwyczajnego uzyskał w 1969 r., a profesora zwyczajnego w 1976 r. Po 49 latach pracy naukowej, w 1998 r., Prof. J. Ważny przyszedł na emeryturę, choć nadal pracował w Instytucie Technologii Drewna w Poznaniu oraz pełnił wiele funkcji w organizacji nauki, szczególnie w Polskiej Akademii Nauk.

Dorobek naukowy Prof. Jerzego Ważnego jest imponujący, bardzo wartościowy i interdyscyplinarny, obejmuje ponad 450 publikacji, w tym około 300 o charakterze naukowo-badawczym, z czego ponad 100 ukazało się w czołowych czasopismach zagranicznych, np. *Wood Science and Technology*, *Wood and Fiber Science*, *Bio-deterioration*, *Holzforschung*, *Material und Organismen*, *Holz als Roh-und Werkstoff*, *Chimia Dreviesiny*. Opracował lub uczestniczył w opracowaniu bardzo licznych instrukcji, wytycznych i projektów dotyczących szeroko rozumianej ochrony drewna, 17 norm państwowych i branżowych dla badań jakości środków ochrony drewna, 7 patentów na impregnaty do drewna. Ważne dla teorii i praktyki ochrony drewna osiągnięcia zjednały Prof. Jerzemu Ważnemu wielkie uznanie u specjalistów oraz sprawiły, że jego prace były i są szeroko cytowane w polskim i międzynarodowym piśmiennictwie naukowym i podręcznikowym. Badania dotyczyły patologii i konserwacji drewna w postaci surowca, drewna przerobionego oraz tworzyw drzewnych – w budowlach i konstrukcjach, w obiektach mieszkalnych, inwentarskich, zabytkowych, zarówno świeckich, jak i sakralnych, w tym najwyższej rangi historycznej w kraju, a także diagnostyki, fizjologii, fizjografii oraz biologii i ekologii organizmów

niszczących drewno, głównie grzybów. Wiele miejsca poświęcał badaniu wpływu grzybów na właściwości drewna, metodom badań jakości środków ochrony drewna, sposobom konserwacji. Prof. Jerzy Ważny stosował często oryginalne i nowatorskie metody badań, dzięki czemu uzyskiwał nowe dane i informacje lub wkraczał na pionierskie obszary i zagadnienia patologii i konserwacji drewna. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt niespotykanej pracowitości i pasji badawczej, cechującej Go w całym okresie pracy naukowej.

Wszystko to składało się na fakt, że Prof. Jerzy Ważny był uznawany za twórcę liczącej się w kraju i za granicą szkoły ochrony drewna i budowli.

Na uznanie zasługuje redakcja i współautorstwo pierwszego w Polsce podręcznika „Ochrona budynków przed korozją biologiczną”, wydanego przez „Arkady” w 2001 r., nagrodzonego przez Ministerstwo Infrastruktury oraz wyróżnionego nagrodą za najlepszą książkę akademicką z zakresu techniki „Atena 2001”. Jako szczególnie osiągnięcia, wzbogacające naukę w skali międzynarodowej uznać należy opracowanie „Kompleksowe badania nad modernizacją i optymalizacją światowych metod toksykometrycznych ocen środków ochrony drewna”. Bardzo ważnym dla praktyki konserwatorskiej było opracowanie, opatentowanie i wdrożenie do produkcji 4 nowoczesnych, proekologicznych środków ochrony drewna o powszechnym zastosowaniu, opartych na czwartorzędowych związkach amoniowe (preparaty solne).

W okresie pracy na Wydziale Leśnym SGGW współuczestniczył w badaniach wpływu przemysłowych zanieczyszczeń powietrza na grzyby chorobotwórcze drzew leśnych; wpływu zanieczyszczeń powietrza na zmiany naturalnej odporności drewna na rozkład przez grzyby; możliwości zastosowania fungicydów systematycznych wykorzystywanych w ochronie roślin uprawnych w celach ochrony drewna i innych.

W ostatnich latach życia interesował się mechanizmami działania nanobiocydów dla potrzeb ochrony drewna, we wszystkich zakresach jego zastosowania.

Działalność dydaktyczna Profesora jako wykładowcy na kursach i szkoleniach była bardzo bogata i różnorodna. Prowadził zajęcia dydaktyczne na Wydziale Leśnym i Wydziale Technologii Drewna SGGW, na Wydziale Konserwacji i Restauracji Dzieł Sztuki Akademii Sztuk Pięknych w Warszawie oraz na kierunku etnologia Wydziału Historycznego Uniwersytetu Warszawskiego. Były to studia stacjonarne, zaoczne i podyplomowe oraz doktoranckie. Wykładał ochronę i konserwację drewna, fitopatologię leśną z mikrobiologią, korozją biologiczną materiałów, ochronę dzieł sztuki ludowej przed korozją biologiczną, ochronę obiektów budowlanych i zabytków drewnianych. Na wyjątkowe podkreślenie zasługuje długoletnia działalność, jako wykładowcy na kursach i szkoleniach w Ośrodku Doskonalenia Kadr Ministerstwa Gospodarki Komunalnej i Budownictwa we Wrocławiu, a później dla potrzeb Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budownictwa i stowarzyszeń branżowych wchodzących w skład Naczelnej Organizacji Technicznej.

Prof. Jerzy Ważny był promotorem 11 doktorantów, z których 5 zostało profesorami. Kierował ok. 110 pracami magisterskimi na Wydziale Leśnym i Wydziale

Technologii Drewna SGGW. Był kilkadziesiąt razy recenzentem rozpraw doktorskich i habilitacyjnych oraz wniosków do nadania tytułu naukowego profesora lub zatrudnienia na stanowisku profesora w różnych uczelniach i instytucjach. W latach 1978–1981 był dziekanem Wydziału Technologii Drewna, wieloletnim członkiem Senatu SGGW oraz licznych komisji senackich i rektorskich. Szczególnie duże zasługi ma w pracy na rzecz Senackiej Komisji ds. Nauki.

Prof. Jerzy Ważny był inicjatorem i organizatorem Sympozjów Ochrony Drewna, poczynając od 1963 r., mają one miejsce nadal w odstępach dwuletnich, z udziałem polskich i zagranicznych pracowników nauki oraz praktyków. Po sympozjach ukazują się zeszyty zawierające wygłoszone referaty i doniesienia. W trakcie trwania sympozjów, które najczęściej odbywały się w Leśnym Zakładzie Doświadczalnym SGGW w Rogowie koło Koluszek, miały miejsce wystawy publikacji naukowych, wydawnictw reklamowych, nowych środków ochrony drewna. Sympozja te stały się źródłem wiedzy, postępu technicznego, inspiracji twórczej dla praktyki ochrony i konserwacji drewna w wielu działach gospodarki i aktywności społecznej.

Prof. Jerzy Ważny miał osiągnięcia naukowe – teoretyczne, ale również aplikacyjne. Był współtwórcą koncepcji organizacyjnych, metod i środków podjętych dla likwidacji zagrzybienia budynków, co miało ogromne znaczenie w okresie powojennym, w szczególności na terenach tzw. Ziemi Odzyskanych. Wraz z zespołem wykonał przeszło 9 tys. ekspertyz budynków i innych obiektów porażonych przez grzyby rozkładające drewno i owady – techniczne szkodniki drewna. Pod kierunkiem Profesora dokonywano konserwacji drewna w bardzo licznych obiektach zabytkowych, np. Zamek Królewski w Warszawie, Pałace w Nieborowie i Wilanowie, liczne kościoły drewniane, obiekty w prawie wszystkich skansenach i muzeach budownictwa ludowego w Polsce, w szczególności sprawował przez wiele lat, wspólnie z dr Michałem Czajnikiem, stałą opiekę konserwatorską nad Muzeum Budownictwa Ludowego w Sanoku oraz Muzeum Wsi Lubelskiej, Był wielokrotnie doradcą i konsultantem praktycznym zagadnień konserwatorskich.

Bardzo bogata była działalność Prof. J. Ważnego w zakresie organizacji nauki. Był wieloletnim członkiem Polskiego Towarzystwa Leśnego, Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Mykologów Budownictwa, które nadało Mu godność członka honorowego. Przewodniczył Komitetowi Technicznemu nr 185 ds. Ochrony Drewna i Materiałów Drewnopochodnych w Polskim Komitecie Normalizacyjnym, był członkiem prezydium Komitetu Trwałości Budowli PZITB. Prof. J. Ważny był członkiem redakcji czasopisma *Wood Protection* w Wielkiej Brytanii, przewodniczącym Rady Programowej czasopisma *Folia Forestalia Polonica*, Ser. B – *Drzewnictwo*. Był przewodniczącym lub członkiem licznych rad naukowych, komisji i zespołów w Ministerstwie Leśnictwa i Przemysłu Drzewnego, Ministerstwie Gospodarki Komunalnej, Ministerstwie Budownictwa i Przemysłu Materiałów Budowlanych, Pracowni Konserwacji Zabytków, Fundacji Ochrony Zabytków, Ośrodka Badań i Konserwacji

Zabytków, Instytutu Technologii Drewna oraz w innych organizacjach i stowarzyszeniach naukowych.

Wyjątkowo aktywny był w pracach dla dobra PAN. W latach 1995–2006 był przewodniczącym Komitetu Technologii Drewna PAN, od 1999 r. wiceprzewodniczącym Rady Upowszechniania Nauki przy Prezydium PAN, członkiem Komisji Dyscyplinarnej przy Prezydium PAN, członkiem Komisji Nagród Naukowych Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN.

Prof. J. Ważny został w 1991 r. wybrany członkiem korespondentem PAN za wybitny wkład naukowy w rozwój drzewnictwa, a w szczególności za przyczynienie się do wzrostu wiedzy w zakresie ochrony i konserwacji drewna i budowli, a także za propozycje licznych zastosowań aplikacyjnych. W 2004 r. został członkiem rzeczywistym PAN. Autorytet i szacunek na arenie społeczności międzynarodowej konserwatorów drewna spowodowały, że Profesor był od 1976 r. członkiem International Academy of Wood Science z siedzibą we Wiedniu (IAWS), od 1995 r. członkiem New York Academy of Science, od 1970 r. członkiem założycielem International Research Group on Wood Protection (IRG), której to organizacji został w 2007 wybrany „Honorary Life-Long Member”. Od 1971 r. współpracował w Working Group on Wood Protection w ramach IUFRO (Międzynarodowa Unia Leśnych Organizacji Badawczych).

Prof. J. Ważny wielokrotnie wyjeżdżał do licznych krajów jako „visiting professor”, np. Indii, Australii, Nowej Zelandii oraz jako „invited speaker” na konferencje i sympozja naukowe jako przewodniczący, moderator w sekcji lub autor głównego, wprowadzającego referatu. Był uczestnikiem kilku światowych kongresów IUFRO. Bardzo liczna jest grupa placówek naukowych polskich i za granicą, z którymi utrzymywał stałe kontakty i współpracę naukową.

Wysoka kultura osobista, życzliwy stosunek do współpracowników i studentów, wyjątkowo rozległa wiedza fachowa, odczytanie w zakresie najnowszej literatury naukowej i branżowej sprawiły, że Prof. Jerzy Ważny cieszył się autorytetem i poważaniem wśród studentów, pracowników nauki, specjalistów – praktyków ochrony drewna, wśród najwybitniejszych naukowców naszego kraju. Działalność Profesora przyczyniła się do powstania i rozwoju nowych dyscyplin naukowych – patologii i konserwacji drewna, mikologii i mikrobiologii budowlanej, korozji biologicznej materiałów i surowców przemysłowych.

Za działalność naukową, dydaktyczną i organizatorską na rzecz nauki i społecznego ruchu naukowego był wielokrotnie nagradzany i wyróżniony, między innymi przez Rektora SGGW; Ministra Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki; Ministra Edukacji Narodowej; Ministra Budownictwa; Ministra Gospodarki Komunalnej. Był odznaczony Krzyżem Kawalerskim OOP, posiadał odznaki Zasłużonego Działacza Kultury, Zasłużonego dla Leśnictwa i Przemysłu Drzewnego, Zasłużonego dla Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej. W 1990 r. otrzymał znaczącą nagrodę międzynarodową „Ron Cockroft Award” (Szwecja) od International Research on Wood Protection. Za wybitne osiągnięcia w dziedzinie konserwacji zabytków otrzymał medal

im. Bohdana Marconiego, przyznany przez ASP w Warszawie. W 2006 r. uzyskał nagrodę PZITB im. Władysława Danileckiego za wybitne osiągnięcia w dziedzinie trwałości i ochrony obiektów budowlanych przed korozją biologiczną, a w 2006 r. medal im. Michała Oczapowskiego przyznany przez PAN za wybitny wkład w rozwój nauk leśnych (drzewnictwa). Wielokrotnie był nominowany za cykl prac nad toksycznością biocydów do zwalczania szkodliwych grzybów (rozkładających drewno) do nagrody naukowej „Fundacji Marcus Wallenberg Prize w Szwecji. W 2009 r. za całokształt działalności naukowej uzyskał Nagrodę Prezesa Rady Ministrów.

Prof. J. Ważny zmarł nagle 23 sierpnia 2010 r. w Warszawie. Po nabożeństwie żałobnym w kościele św. Katarzyny został pochowany 26 sierpnia 2010 r. na cmentarzu przy ul. Wałbrzyskiej.

Odszedł od nas wybitny uczony, wychowawca wielu pokoleń młodzieży akademickiej, nauczyciel młodych pracowników nauki. Nauki leśne – drzewnictwo poniosły niepowetowaną stratę.

## Literatura

- [1] Babicki R. 2005. Prof. dr hab. Jerzy Ważny członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk. *Przemysł Drzewny*, lipiec/sierpień: 48.
- [2] Lutomski K. 1997. Jubileusz Prof. dr hab. inż. Jerzego Ważnego, czł. korespondenta PAN, Materiały IV Sympozjum PSMB „Ochrona obiektów budowlanych przed korozją biologiczną i ogniem”. Szklarska Poręba: 7–11.
- [3] Karyś J. 2005. Profesor Jerzy Ważny – laureat nagrody Komitetu Trwałości Budowli PZITB w roku 2004. *Inżynieria i Budownictwo* 1: 3.
- [4] Ważny J., Kotowska W. (red.) 1990. Zakład Ochrony Drewna 1950–1990. Wydawnictwo SGGW–AR, Warszawa.
- [5] Teczka osobowa członka PAN: Jerzy Ważny (1991–2010).

*Andrzej Grzywacz,  
czł. rzecz. PAN*



## **Optymalizacja użytkowania powierzchni ziemi łagodzi procesy degradacji środowiska**

*Jan Siuta*

*Instytut Ochrony Środowiska  
00-548 Warszawa, ul. Krucza 5/11  
e-mail: siuta@ios.edu.pl*

**Słowa kluczowe:** przeznaczenie ziemi, gleba, okrywa roślinna, woda, krajobraz, degradacja środowiska

### **Wprowadzenie**

Gleba i szata roślinna (biosfera lądowa) tworzą aktywny pomost między litosferą i atmosferą. Stanowią o funkcjonowaniu przyziemnej części atmosfery oraz o modyfikowaniu budowy i rzeźby litosfery, a także o krążeniu wody między atmosferą, biosferą, litosferą na obszarach lądowych.

Naturalnie ukształtowana gleba i szata roślinna wykazują względną stabilność (równowagę ekologiczną) w czasie. W strefach klimatu umiarkowanego ukształtowały się zrównoważone ekosystemy glebowo-roślinne i wodne, które stabilizowały (łagodziły) dynamikę i skutki zjawisk atmosferycznych. Postępujące wylesianie i likwidowanie ekosystemów trawiastych oraz osuszanie ekosystemów mokradłowych na rzecz rolniczego użytkowania ziemi i na potrzeby infrastruktur technicznych zmniejsza coraz bardziej naturalną pokrywę glebowo-roślinną, odsłaniając powierzchnie ziemi na destrukcyjne działanie opadów atmosferycznych i wiatru, zarażem wpływając negatywnie na funkcjonowanie przyziemnej atmosfery.

Rolnicze, osiedlowe, przemysłowe zagospodarowanie gruntów stanowi daleko idącą ingerencję w środowiska przyrodnicze, nie tylko wskutek zmniejszania i pomniejszania biologicznie czynnej powierzchni ziemi, lecz także ze względu na wielorakie techniczne modyfikacje budowy litosfery oraz zabiegi agrotechniczne zwiększające podatność gleby na erozyjne działanie wody i wiatru.

Antropogeniczne modyfikowanie powierzchni ziemi jest i będzie niezbędne, ale postęp techniczny i cywilizacyjny musi respektować ekologiczne wymogi ochrony i odnowy zasobów naturalnych (w tym ekologicznych). Wiedza fachowa, technologie i doświadczenia przodujących krajów umożliwiają opracowywanie i realizowanie

takich struktur przestrzennych użytkowania ziemi, które chronią środowisko przyrodnicze oraz zapewniają produkcję żywności i komfort ekologiczny. Droga dochodzenia do wspomnianego celu w Polsce będzie jednak bardzo długa i wyboista. Decydują o tym warunki obiektywne (głównie finansowe i zapóźnienie) oraz subiektywne (niedostateczna wiedza i wola polityczna decydentów, niechęć użytkowników do inwestowania w przyszłość, nadrzędność krótkotrwałych korzyści, niedostateczna społeczna świadomość potrzeby).

Niezależnie od wymienionych trudności istnieje konieczność niezwłocznego przystąpienia do merytorycznej dyskusji, a następnie do opracowania strategicznego (długoterminowego) programu kompleksowej modernizacji (urządzenia) struktur przestrzennych użytkowania ziemi, ze szczególnym uwzględnieniem ochrony biologicznie czynnej powierzchni ziemi wraz z ograniczaniem zjawisk ekstremalnych. Będzie to wymagało weryfikacji fragmentarycznych uregulowań i ustanowienia prawa zintegrowanego, obejmującego wszystkie aspekty ochrony, kształtowania i użytkowania powierzchni ziemi (np. w gminie, rejonie).

Wadliwe struktury użytkowania ziemi nasilają procesy degradacji i ekstremalne zjawiska w środowisku, np.:

- Nadmierne wylesienie (na rzecz rolniczego użytkowania) gleb piaskowych oraz pozostałych na zboczach o dużych spadkach i pagórkach jest najważniejszym czynnikiem wielorakich procesów degradacji środowiska, w tym malejącej efektywności produkcji roślinnej. Bardzo duża przepuszczalność gleb piaskowych powoduje, że wody opadowe przemieszczają się szybko do warstw głębszych, wpływając do przyległych mokradeł i cieków wód powierzchniowych.
- Ubóstwo składników pokarmowych i wody gleb piaskowych oraz bardzo mała ich chłonność względem nawozów mineralnych uniemożliwiają zwarte pokrycie i dobry wzrost roślin uprawianych. Powierzchnia takiej ziemi jest więc niedostatecznie chroniona przed erozją wietrzną nie tylko w stanie bezroślinnym, lecz także w początkowej fazie wzrostu roślin uprawy polowej.
- Orne użytkowanie gleb bardzo podatnych na erozyjne działanie opadów atmosferycznych skutkuje rozmywaniem (w tym pełzaniem mas ziemnych) i zamulaniem powierzchni ziemi oraz gwałtownymi spływami wody do niżej położonych miejsc i cieków wodnych.
- Rozmywy poziomego próchnicznego pomniejszają sukcesywnie żyzność gleby, która jest coraz słabiej chroniona (przez gorszy stan roślin) przed destrukcyjnym działaniem czynników atmosferycznych (wody, wiatru, wahań temperatury).

Głównymi motorycznymi czynnikami wymienionych (oprócz wylesienia i likwidacji ekosystemów trawiastych) procesów degradacji są struktury przestrzenne użytkowania ziemi i uprawy roślin (agrotechnika), sieć i jakość dróg, melioracje wodne.

Do największych obszarów degradacji powierzchni ziemi zalicza się:

- 1) rolnicze nieefektywne gleby piaskowe, które powinny być zalesione;
- 2) mało urodzajne gleby na erodowanych zboczach i pagórkach, które powinny być zadarnione, zalesione, zadrzewione;

- 3) obszary o dużym nasileniu erozji wąwozowej, wymagające rekultywacji techniczno-biologicznej i racjonalnego zagospodarowania;
- 4) obszary o bardzo dużym niedostatku trwałej szaty roślinnej, wymagające kompleksowej fitomelioracji;
- 5) powierzchnie zdegradowane przez odkrywkową eksploatację zasobów geologicznych, składowanie odpadów komunalnych, przemysłowych i górniczych wymagające rekultywacji i docelowego zagospodarowania.

Specyficznym, bardzo złożonym zagadnieniem jest kompleksowa restrukturyzacja użytkowania terenów potencjalnie powodziowych i osuwiskowych.

W warunkach klimatu umiarkowanego, jaki występuje w Polsce, każda powierzchnia ziemi niezabudowana technicznie i naturalnie bezroślinna powinna pełnić funkcje ekologiczne, niezależnie od sposobu jej użytkowania. Ekologiczne funkcje pokrywy glebowo-roślinnej są wielorakie, zwłaszcza na terenach mieszkaniowych, rekreacyjnych, uzdrowiskowych, komunikacyjnych, przemysłowych.

Szata roślinna jest biologicznym pomostem pomiędzy atmosferą a litosferą. Chroni ona:

- 1) powierzchnię ziemi przed niekorzystnym działaniem czynników atmosferycznych;
- 2) przyziemną część atmosfery przed pyleniem powierzchni ziemi oraz stanowi o:
  - a) krążeniu wody opadowej w ekosystemach lądowych,
  - b) klimacie lokalnym,
  - c) dynamice powietrza atmosferycznego i oczyszczaniu powietrza atmosferycznego.

Efektywność ekologiczną szaty roślinnej można wyrazić w postaci produkcji fitomasy z jednostki powierzchni. Ta zależy od jakości środowiska glebowego, właściwości roślin, zabiegów uprawowych i pielęgnacyjnych. W ekosystemach leśnych, zaroślowych i trawiastych (zblizonych do naturalnych) szata roślinna zależy głównie od jakości środowiska glebowego, bo ingerencja człowieka jest mała. Na gruntach ornych i na wszystkich pozostałych terenach o roślinności uprawianej zabiegi agrotechniczne (w tym pielęgnacyjne) ingerują pozytywnie lub negatywnie w środowisko glebowe i produkcję fitomasy, tym samym w przebieg wegetacji i produkcję fitomasy. Rzecz w tym, aby odnośne ingerencje były ekologicznie pozytywne nie tylko w krótkim czasie, lecz także w przyszłości. Niestety doraźne korzyści są przedkładane nad przyszłe korzyści ekologiczne i gospodarcze.

Dotyczy to bardzo istotnych zagadnień:

- 1) ochrony jakości gleb przed różnymi formami degradacji,
- 2) ulepszenia właściwości gleb,
- 3) ulepszenia struktury przestrzennej użytkowania ziemi,
- 4) fitomelioracji krajobrazu,
- 5) rekultywacji terenów zdegradowanych.

## Stan i niezbędne działania

**1. Zalesianie nieefektywnych gruntów ornych jest realizowane od początku lat pięćdziesiątych XX wieku.** W roku 1946 lasy pokrywały 20,8% powierzchni kraju. W latach 1955–1970 lesistość wzrosła z 23,7% do 27,3%, czyli o 3,6%. Tak duży wzrost lesistości został wymuszony przez obowiązkowe dostawy zboża z każdego hektara gruntów ornych, ale wynikał też z potrzeby zalesienia rozwydmianych użytków rolnych. W następnym dwudziestoleciu (do 1990 r.) lesistość wzrosła o 0,3% do 28,0% powierzchni kraju, a w latach 1991–2008 do 29,6%, czyli około 0,1% rocznie. Średni roczny wzrost lesistości w latach 1946–2008 wynosi 0,14%, czyli jest większy od średniorocznego wzrostu (0,07%) począwszy od roku 1970.

Potrzeby zalesienia rolniczo nieefektywnych gruntów ornych oszacowano dla każdej gminy, przedstawiając je na mapie Polski w skali 1:1 000 000 [20]. Środkowe dorzecze Wisły i Warty (około 50% powierzchni kraju) wykazało potrzebą zalesienia 10–30% (nawet 35%).

Według Krajowego programu zwiększania lesistości [8] procentowy udział lasów ma wzrosnąć do 2020 roku do 30% powierzchni kraju oraz do 33% w 2050 roku. Niezadawalający postęp w realizacji planowych zalesień Polityka Ekologiczna Państwa [15] uzasadniła coraz niższą podażą gruntów do zalesienia. Teza ta budzi poważne wątpliwości wobec stale postępującego samosiewnego (dzikiego) zalesiania gruntów rolniczo nieefektywnych.

Oszacowanie potrzeb i możliwości zalesienia gruntów ornych przedstawiono wariantowo [21]:

- minimalny 1746 tys. ha – lesistość kraju wzrośnie do 33,6%,
- optymalny 3145 tys. ha – lesistość kraju wzrośnie do 38,4%,
- maksymalny 4527 tys. ha – lesistość kraju wzrośnie do 43,1%.

Wymienione wskaźniki wzrostu lesistości nie pomniejszą, lecz umożliwią wydatny wzrost plonów z hektara oraz globalnej produkcji żywności, paszy i środków dla przemysłu rolno-spożywczego.

Statystyczne dane o procentowym udziale lasów i zadrzewień w kraju są wyraźnie zanizone, ponieważ duże powierzchnie gruntów nie uprawianych (odłogujących) od dawna zostały samosiewnie zalesione, zadrzewione i zakrzewione. Zwartość i bardzo szybki wzrost samosiewnych brzoź nadaje im znamiona lasów naturalnych. W rejestrach ewidencji gruntów tereny te widnieją nadal jako użytki rolne.

**2. Erozja degraduje zasoby glebowo-roślinne i zniekształca krążenie wody w środowisku przyrodniczym.** Naturalne i antropogeniczne (głównie rolnicze) uwarunkowania stanowią o regionowym (obszarowym) występowaniu i nasileniu erozji. Dotyczy to głównie erozji wodnej powierzchniowej, żłobinowej i wąwozowej oraz spęływania mas ziemnych ze zboczy o dużych spadkach. Zjawiska te są dobrze rozpoznane i udokumentowane [4, 17, 26]. Znane są także sposoby przeciwdziałanie erozji oraz rekultywacji i zagospodarowania powierzchni zdegradowanych [5, 6, 25].

Rzecz jednak w tym, że nie można skutecznie przeciwdziałać erozji i likwidować jej skutków bez optymalizacji struktur przestrzennych oraz sposobów użytkowania ziemi [5, 25]. Wymaga to jednak ustanowienia zintegrowanego prawa, bardzo dużych nakładów finansowych i technicznych, wykształcenia specjalistycznej kadry i sukcesywnej realizacji celów. Konieczność ochrony zasobów glebowych, racjonalizacja gospodarki zasobami wód opadowych, ograniczania zjawisk ekstremalnych będą wymuszały przyszłościowe myślenie i działania specjalistów, polityków, administracji z poparciem ogółu społeczeństwa.

**3. Kwasowa degradacja gleby pogarsza warunki wzrostu roślin oraz wielkość i jakość plonów.** Pośrednio pogarsza ekologiczne funkcjonowanie gleby i szaty roślinnej, nasila powierzchniowy spływ wód opadowych, pomniejsza infiltrację wód opadowych do gleby i wód gruntowych. Wapnowanie kwaśnych gleb rolniczych leży nie tylko w interesie producentów roślin [2], lecz jest również korzystne dla funkcjonowania biologicznie czynnej powierzchni ziemi. Jest więc istotnym działaniem na rzecz ochrony środowiska, w tym zasobów wody opadowej i przyziemnej części atmosfery.

**4. Zawartości i pionowe rozmieszczenie próchnicy w glebie są wyrazem stanu rozwoju i degradacji gleby,** stanowią bowiem o biologicznym, chemicznym i fizycznym funkcjonowaniu ziemi użytkowanej rolniczo. Oprócz zasobności składników pokarmowych, zawartość i rozmieszczenie próchnicy decyduje o jakości struktury glebowej, od której zależą między innymi:

- 1) odporność (podatność) powierzchni ziemi na zaskorupianie i mechaniczne zagęszczanie,
- 2) wymiana powietrza glebowego i atmosferycznego,
- 3) wsiąkanie wody opadowej do gleby,
- 4) spływy powierzchniowe wód opadowych,
- 5) podatność na erozyjne działanie wody i wiatru.

Plonotwórcze walory próchnicy glebowej znano i doceniano od niepamiętnych czasów, ale wielorakie jej funkcje w środowisku przyrodniczym są dopiero ostatnio postrzegane i doceniane. Mineralne gleby orne w Polsce są przeważnie ubogie w próchnicę. Dotyczy to procentowej zawartości w warstwie ornej, jak też wyrażonej w tonach na hektar [1, 3]. Niepokój budzi postępujący ubytek zasobów próchnicy w glebach użytkowanych rolniczo [9, 10], powodowany głównie przez:

- 1) monokulturowe uprawy roślin i nie przywracanie glebie mas roślinnych,
- 2) malejące wytwarzanie i użytkowanie obornika,
- 3) energetyczne spalanie dostępnych mas roślinnych,
- 4) deponowanie odpadów pochodzenia roślinnego na składowiskach.

Potencjalnie dużym zagrożeniem dla zasobów próchnicy i wody glebowej będzie realizacja programu wielkoobszarowych, monokulturowych upraw i energetycznego spalania mas roślinnych. Będzie to kolidowało ze „strategią ochrony gleby” przyjętą 22 września 2006 r. przez Komisję Europejską [7].

**5. Postępująca degradacja melioracji wodnych pogarsza warunki wzrostu i plonowania roślin oraz zwiększa zagrożenia powodziowe.** W raporcie MRLiGŻ z roku 1986 [12] napisano „szacuje się, że pilnej odbudowy i modernizacji wymagają urządzenia melioracyjne na obszarze około 1 mln ha, znajdujące się przeważnie w zachodniej i północnej części kraju .... Nie wykonano w pełni planowego zakresu konserwacji i eksploatacji melioracji wodnych z powodu niedostatku środków finansowych”.

W Programie rozwoju melioracji do roku 2015 [13] „potrzeby konserwacji i modernizacji melioracji oceniono na 2 680 tys. ha”. Świadczy to o szybko postępującej degradacji urządzeń melioracyjnych i środowiska glebowego. Wobec niemal całkowitego zaniechania renowacji i konserwacji systemów melioracyjnych przypuszcza się, że zaległości w tym zakresie są znacznie większe [23].

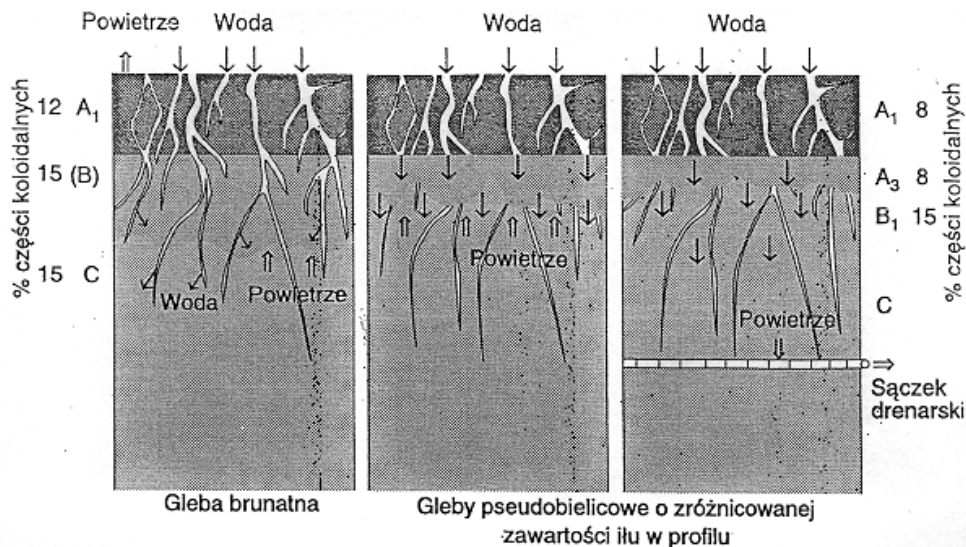
W syntezie „Programu proekologicznego rozwoju wsi, rolnictwa i gospodarki żywnościowej do roku 2000 i w latach następnych” opracowanej przez IERiGŻ, IUNG, IMUZ na zlecenie Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej [11] przedstawiono złożoność i kontrowersyjność problematyki melioracji wodnych, wraz z barierami stagnacji. Stwierdzono między innymi „W tej sytuacji niezbędne jest powołanie w latach 1998–2000 specjalnej komisji rządowej lub komisji MRiGŻ do opracowania raportu o stanie urządzeń melioracji rolnych, ich funkcjonowania i znaczenia dla rolnictwa, a także ochrony środowiska .... Liczne, uzasadnione i nieuzasadnione oceny melioracji wodnych ... opublikowane w ostatnich latach uniemożliwiają jednoznaczne określenie kierunków gospodarki wodnej w glebach”.

Brak niezbędnych (pilnych) działań (choćby programowych) ze strony organów państwowych budzi niepokój o ekologiczną przyszłość biologicznie czynnej powierzchni ziemi. Do rozpoznania złożonych zjawisk oraz ich skutków niezbędne są stosowne badania, ale nie mniej ważne jest rzetelne upowszechnienie wiedzy nabytej, a nie pozorowanej. Przeświadczenie o niecelowości i małej efektywności (nawet szkodliwości) drenowania gleb zrodziło się po części:

- 1) z popełnionych błędów w przeszłości (zwłaszcza na terenach mokradłowych),
- 2) z błędnego nazewnictwa – drenowanie to odwadnianie gleby,
- 3) z braku odpowiedniego rozpoznania zagadnienia i upowszechniania błędnych (niby ekologicznych) proekologicznych poglądów,
- 4) niechęci do finansowania inwestycji, które rzekomo służą tylko producentom rolnym.

Drenaż poziomy gruntów zwięzłych ułatwia infiltrację wody do głębszych warstw, ponieważ umożliwia wypływ do atmosfery powietrza glebowego wypieranego przez wsiąkającą wodę [19]. To oddolne odpowietrzanie gleb zwięzłych (zawodnionych, namakanych powierzchniowo) stanowi główny czynnik ekologicznej efektywności drenażu, w tym większej retencji wody w profilu glebowym (rys. 1). Łagodzi też skutki zjawisk powodziowych [19, 23].

Agroekologiczną efektywność drenowania gruntów ornych oceniono wstępnie na podstawie danych statystycznych: udziału gruntów zdrenowanych, plonów 4 zbóż oraz rzepaku i rzepiku, począwszy od roku 1975 z uwzględnieniem wskaźników

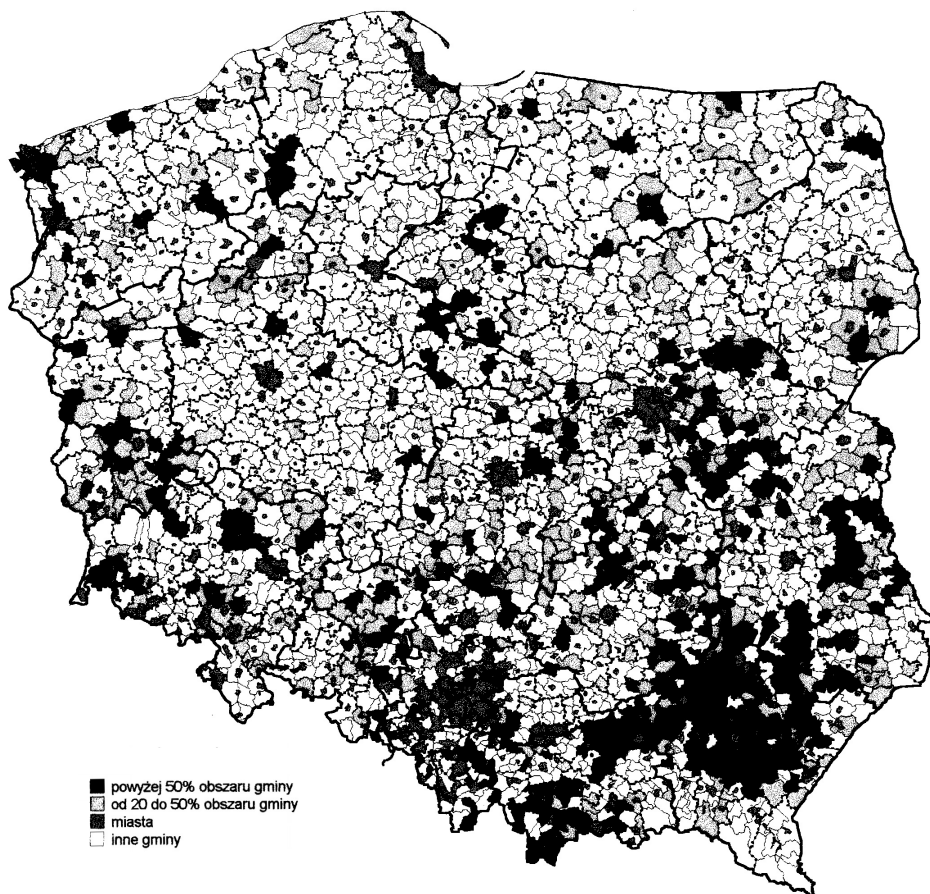


**Rysunek 1.** Migracja fazy gazowej wypieranej z gleb zdrenowanych i niezdrzonych

jakości gleb w poszczególnych województwach [19]. Wysokie plony roślin i duże procentowe udziały zdrenowanych gruntów rolnych wyraźnie synchronizują. Wyróżniają się byłe województwa płockie, leszczyńskie, poznańskie, kaliskie, mimo iż występują w strefie najmniejszych opadów atmosferycznych. Świadczy to, że drenowanie gleb zwięzłych nie pomniejsza, lecz zwiększa retencję wody oraz jej plonotwórczą efektywność. Nie stwierdzono wyraźnej synchronizacji plonów roślin ze wskaźnikami jakości gleb.

**6. Wadliwość struktur przestrzennych i sposobów użytkowania ziemi skutkują wielorakimi zjawiskami degradacji środowiska, nasilając zjawiska ekstremalne.** Dostosowywanie odnośnych struktur do wymogów ochrony środowiska i potrzeb gospodarczych jest niezbędne [5, 6, 14, 18, 26]. Mimo ogólnospołecznej i państwowej inercji (w tym względzie) działania takie muszą być podjęte w nieodległym czasie, bo w przeciwnym razie szkody ekologiczne i gospodarcze będą coraz bardziej przewyższały nakłady niezbędne na ulepszanie gospodarki w środowisku.

Porównywanie polskiego gospodarowania terenami wiejskimi z przodującymi krajami Europy mobilizuje znawców zagadnienia do zabiegania o ustanowienie prawa i podjęcie działań na rzecz kompleksowego urządzania i użytkowania terenów wiejskich. Przykładem tego było opracowanie (w Ministerstwie Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej) projektu ustawy o urządzaniu obszarów rolniczej przestrzeni produkcyjnej (rok 1997). W uzasadnieniu napisano „Przystosowanie rolnictwa polskiego do standardów europejskich oraz ustalenie warunków dla zwiększenia jego konkurencyjności w ramach Unii Europejskiej wymaga stworzenia podstaw prawnych do podejmowania w Polsce w sposób planowy przebudowy rolnictwa z równoczesnym rozwojem obszarów wiejskich ... projekt ustawy zawiera przepisy regulujące zasady opracowywania i zatwierdzania planów urządzania rolniczej przestrzeni



**Rysunek 2.** Potrzeby scaleń gruntów według gmin w roku 1988; opracowano na podstawie danych zamieszczonych w publikacji pt. „Obszary wiejskiej grunty rolnicze w Polsce – wyniki badań ankietowych – 1988”, Wyd. Akademia Rolnicza we Wrocławiu

produkcyjnej, stanowiących podstawę do podejmowania niezbędnych działań urzędowych w ujęciu kompleksowym”. Ministerialny projekt ustawy (podobnie jak kilka innych projektów) nie doczekał się merytorycznej dyskusji i legislacji.

Według Wocha i Nierubcy [25] „Kompleksowy (wielofunkcyjny) rozwój obszarów wiejskich wymaga zrealizowania co najmniej dziesięciu skoordynowanych w czasie przedsięwzięć inwestycyjnych. Najbardziej istotne są tu scalenia gruntów, melioracje wodne i przeciwozyjne, zmiany w sposobie użytkowania gruntów oraz rozwój infrastruktury technicznej”. Wiadomo, że są to działania bardzo złożone i kosztowne, wymagające nie tylko uregulowań prawnych, bardzo dużych nakładów finansowych i technicznych, lecz także wykwalifikowanej kadry. Dochodzenie do oczekiwanych celów będzie długotrwałe.



## Wnioski

1. Likwidacja trwałej szaty roślinnej, na rzecz roślinności zmiennej w czasie (sezonowej), odsłania ziemię na destrukcyjne działania czynników atmosferycznych oraz modyfikuje właściwości i dynamikę przyziemnej części atmosfery. Mechaniczna uprawa ma niemały udział w modyfikowaniu wierzchniej warstwy gleby oraz jej podatności na destrukcyjne działanie opadów atmosferycznych i wiatru.
2. Nasilenie wymienionych zjawisk zależy od wielu czynników, w tym głównie od: udziału powierzchni bez trwałej szaty roślinnej, rzeźby terenu, jakości pokrywy glebowej, wielkości i rozkładu opadów atmosferycznych, struktury przestrzennej pól i roślinności uprawnej, mechanicznej uprawy, infrastruktury technicznej (drogi, melioracje, urządzenia ochronne).
3. W celu ograniczenia (w tym eliminowania) negatywnych zjawisk ekologicznych i gospodarczych na terenach nieurbanizowanych niezbędne jest dostosowywanie struktur przestrzennych i sposobów użytkowania ziemi (w tym szaty roślinnej) do warunków przyrodniczych z uwzględnieniem potrzeb społeczności lokalnych i postępu agrotechnicznego.
4. Ustanowienie i realizacja zintegrowanego prawa w zakresie kompleksowego kształtowania (urządzania) i użytkowania terenów nieurbanizowanych (na wzór krajów przodujących) jest konieczne ze względów gospodarczych i ekologicznych, w tym dla łagodzenia zjawisk ekstremalnych.

## Literatura

- [1] Adamczyk Z. 1966. Inwentaryzacja zasobów próchnicy w glebach ornyc. *Pam. Pul.* 22: 261–270.
- [2] Boguszewski W., Kac-Kacas M. 1966. Wapnowanie gleb. IUNG, seria P (12). Puławy: 119 ss.
- [3] Dobrzański B., Siuta J., Strzemiński M., Witek T., Zawadzki S. 1973. Zarys charakterystyki gleb Polski. Wyd. Geol. Warszawa: 87 ss.
- [4] IUNG 1992. Erozja wodna w fizjograficznych krainach Polski. *Pam. Pul.* Sup. Do z. 101: 66 ss.
- [5] Józefaciuk Cz., Józefaciuk A. 1992. Specyfika urządzania wsi o gruntach zagrożonych erozją. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 401: 218–229.
- [6] Józefaciuk A., Józefaciuk Cz. 1999. Ochrona gruntów przed erozją. Poradnik dla władz administracyjnych i samorządowych oraz służb doradczych i użytkowników gruntów. IUNG Puławy: 109 ss.
- [7] Komisja Europejska 2007. Ochrona gleby – nowa polityka dla UE.
- [8] Krajowy program zwiększania lesistości. Ministerstwo Środowiska. Warszawa 2003: 53 ss.
- [9] Maćkowiak Cz. 1997. Bilans substancji organicznej w glebach Polski. *Biuletyn Informacyjny IUNG* 5.
- [10] Maćkowiak Cz. 2000. Wpływ doboru roślin w zmianowaniu obornika i nawozów mineralnych na zawartość węgla organicznego w glebie i produkcji ziemniaków. *Nawozy i nawożenie. PTN-IUNG* 4(5): 102–109.
- [11] Michna W. 1998. Program proekologicznego rozwoju wsi, rolnictwa i gospodarki żywnościowej do 2015 roku. Synteza. IERiGŻ, IUNG, IMUZ. Warszawa: 285 ss.
- [12] MRiGŻ 1986. Realizacja rządowego programu rozwoju melioracji oraz zaopatrzenia wsi i rolnictwa w wodę (raport). Warszawa.
- [13] MRiGŻ 1996. Program rozwoju melioracji do roku 2015. Warszawa.
- [14] Pijanowski Z. 1992. Kształtowanie przestrzeni wiejskiej w terenach górskich (na przykładzie wsi Łapsze Wyżne). *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 401: 203–218.
- [15] Polityka ekologiczna państwa w latach 2009–2012 z perspektywą do roku 2016 (M.P. Nr 34, poz. 501 z dnia 25 maja 2009 r.).

- [16] Pondel H., Terelak H., Terelak T., Wilkos S. 1979. Właściwości chemiczne gleb uprawnych w Polsce. *Pam. Pul. Sup.* Do z. 71: 189 ss.
- [17] Przeobrażenia środowiska pod wpływem erozji 2002. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 487: 397 ss.
- [18] Siuta J. 1974. Kształtowanie przyrodniczych warunków rolnictwa w Polsce. PWN, Warszawa: 357 ss.
- [19] Siuta J. 2007. Ekologiczna rola regulacji stosunków wodnych w glebie. *Wiad. Melioracyjne i Łąkarskie* 3: 115–117.
- [20] Siuta J., Zielińska A., Makowiecki K., Sroka L. 1987. potrzeby dolesień. Mapa Polski w skali 1:1 000 000. IOŚ, Warszawa.
- [21] Siuta J., Żukowski B. 2002. Ekologiczne podstawy racjonalizacji użytkowania ziemi w Polsce. *Inż. Ekol.* 6: 18–30.
- [22] Siuta J., Żukowski B. 2008. Degradacja i rekultywacja ziemi w Polsce. IOŚ, Warszawa: 238 ss.
- [23] Siuta J., Żukowski B. 2009. Rozwój i potencjalne zagrożenia agroekosystemów. Cz. II. Agroekologiczna efektywność drenowania gleb zwięzłych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 41: 596–613.
- [24] Siuta J., Żukowski B. 2010: Rozwój i potencjalne zagrożenia agroekosystemów. Cz. III. Ocena efektywności wapnowania gleb kwaśnych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 42: 109–121.
- [25] Wawer R., Nowocień E. 2006. Mapa erozji wodnej aktualnej w oparciu o CORINE Land Corer 2000. *Pam. Pul.* 142: 537–546.
- [26] Woch F., Nierubca M. 2001. Koncepcja kompleksowego rozwoju obszarów wiejskich Polski Wschodniej na przykładzie gmin. *Zesz. Towarzystwa Rozwoju Obszarów Wiejskich* 3: 91–96.
- [27] Starker L. 1980. Erozja gleb a gospodarka wodna. *Zesz. Zesz. Post. Nauk Rol.* 401: 103–118.
- [28] Wybrane problemy kształtowania krajobrazu w rozwoju obszarów wiejskich. 2001. *Zesz. TROW* 3: 114 ss.

## Land use optimization to mitigate processes of environmental degradation

**Key words:** land use, soil, vegetal cover, water, landscape, environmental degradation

### Summary

Soil and vegetal cover developed in the course of natural processes show a relative timeless ecological equilibrium. Deforestation and elimination of grassland ecosystems as well as drainage of wetland ecosystems for agricultural and technical infrastructure purposes lead to deformation of natural vegetal cover, exposing land surface to destructive action of atmospheric precipitation and wind, thus affecting the functioning of atmosphere at Earth surface. If anthropogenic modification of the Earth surface has been and will be indispensable, technical and civilization advancing is important to pay attention to ecological requirements of the maintenance and regeneration of natural resources. In order to limit (eliminate) the negative phenomena it is essential the space structures and land use patterns to be adjusted to natural conditions; at the same time its necessary to take into account the needs of local communities and demands of agro-technical progress. Laying down and implementation of integrated laws in the sphere of maintenance and use of rural areas is of necessity for both, economic and ecological considerations.

## Oszczędne gospodarowanie wodą koniecznym kryterium w hodowli roślin

**Krystyna Rybka<sup>1</sup>, Grzegorz Żurek<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

<sup>2</sup> Zakład Traw, Roślin Motylkowatych i Energetycznych

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, Państwowy Instytut Badawczy,  
05-870 Błonie*

*e-mail: k.rybka@ihar.edu.pl g.żurek@ihar.edu.pl*

**Słowa kluczowe:** aparaty szparkowe, transpiracja, susza, wykorzystanie wody

### Wstęp

Kryterium odporności roślin na okresowo występujące niedobory wody stanowi odpowiednia wysokość plonu w warunkach suboptymalnego nawodnienia gleby. Jest to podstawowy warunek opłacalności produkcji rolnej, gdyż w naszym kraju nawadnianie pól uprawnych dotyczy zaledwie 0,5% ogólnej powierzchni gruntów ornych i odbywa się głównie w oparciu o system podsiąkowy [24]. Jednakże coraz wyraźniej zarysowuje się konieczność podniesienia efektywności wykorzystania wody przez rośliny uprawne, gdyż malejące światowe zasoby wodne wpływają na postępujące stepowanie ziemi. W wielu rejonach świata notuje się zagrożenie deficytami wody słodkiej, występującymi w sytuacjach, gdy proporcja zasobów pobranych do posiadanych przekracza 20%. Dla Polski, współczynnik ten wynosi 26,2% i wśród 35 krajów europejskich plasuje nas na piątym miejscu, za Macedonią, Niemcami, Hiszpanią i Bułgarią (tab. 1).

Kolejnym wskaźnikiem, dokumentującym niekorzystne stosunki wodne w Polsce jest Indeks Deficytu Wodnego (**Water Poverty Index – WPI**), który w odniesieniu do naszego kraju ma jedną z najniższych w Europie wartości (tab. 1). Zasoby wodne Polski wynoszą jedynie ok. 203 km<sup>3</sup> i w przeliczeniu na jednego mieszkańca jest to ok. 1 600 m<sup>3</sup> rocznie tzw. średnich zasobów dyspozycyjnych. Wartość ta jest znacznie mniejsza od średniej dla Europy (ok. 10 000 m<sup>3</sup>) i można ją porównać do zasobów wodnych Syrii, Somalii, Zimbabwe czy Hondurasu [16]. Deficyty wody, podobnie jak i jej nadmiary są wypadkową nie tylko zjawisk atmosferycznych, ale również

**Tabela 1.** Zasoby i pobory wody słodkiej w Europie w przeliczeniu na 1 mieszkańca oraz WPI\* [wg 71]

Kraj	m <sup>3</sup> na mieszkańca rocznie		% poborów w zasobach	Water Poverty Index 2002
	zasoby	pobory		
Finlandia	20857	479	2,3	78
Islandia	566667	543	0,1	77
Norwegia	81886	489	0,6	77
Austria	9455	261	2,8	75
Irlandia	12187	296	2,4	73
Szwajcaria	7354	359	4,9	72
Szwecja	19131	335	1,8	72
Wielka Brytania	2449	163	6,7	72
Słowacja	9276	337	3,6	71
Holandia	5539	500	9,0	69
Słowenia	16219	642	4,0	69
Chorwacja	23161	164	0,7	68
Francja	3343	674	20,2	68
Grecja	6653	712	10,7	66
Niemcy	1861	572	30,7	65
Portugalia	6485	1125	17,3	65
Hiszpania	2570	874	34,0	64
Bułgaria	2797	1296	46,3	63
Rosja	31764	527	1,7	63
Belgia	1751	b.d.	—	61
Białoruś	6014	278	4,6	61
Dania	1099	238	21,7	61
Republika Czeska	1290	250	19,4	61
Węgry	10353	763	7,4	61
Włochy	3289	771	23,4	61
Rumunia	9837	1031	10,5	59
<b>Polska</b>	<b>1601</b>	<b>419</b>	<b>26,2</b>	<b>56</b>
Mołdawia	2783	539	19,4	49
Albania	13184	551	4,2	b.d.
Bośnia i Hercegowina	9566	292	3,1	b.d.
Estonia	9696	120	1,2	b.d.
Litwa	7317	76	1,0	b.d.
Łotwa	15521	124	0,8	b.d.
Macedonia	3137	936	29,8	b.d.
Serbia i Czarnogóra	19815	1233	6,2	b.d.
Ukraina	3066	755	24,6	b.d.
Średnio (bez Islandii**)	10686	534,7	11,9	

\* WPI określa wpływ braków i dostępu do wody na populację ludzką. WPI zawiera się między 0 a 100, gdzie niskie wartości wskazują na względne ubóstwo wodne, a wysokie mówią o dostatecznym zaopatrzeniu w wodę. Wskaźnik ten liczony jest na podstawie 5 składników: zasobów wodnych, dostępu do nich oraz ich ilości, ich wykorzystania oraz wpływu na środowisko.

niedostatecznej infrastruktury, m.in. braku zbiorników retencyjnych. Rozwiązanie problemów ustabilizowanego dostępu do wody i jej jakości jest jedynie kwestią czasu, niezależną od rozważań nad słuszością ich podejmowania [65]. Dla ochrony wód w obszarach rolniczych, oprócz poznania charakteru i zmienności czynników decydujących o ilości wody dostępnej dla upraw w danym regionie kraju i w określonej porze roku, istotne jest opracowanie kryteriów doboru rodzaju upraw, a zwłaszcza odmian w obrębie gatunków tak, aby zoptymalizować eksploatację zasobów wodnych.

Celem obecnego przeglądu jest rozważenie czy, w świetle osiągnięć badań nad fizjologicznymi i biochemicznymi podstawami odporności na stres dehydracyjny, celowe i konieczne jest poszukiwanie i wprowadzenie dodatkowego kryterium selekcyjnego do hodowli roślin, które przyczyniłoby się do racjonalizacji wykorzystania wody na terenach rolniczych i miejskich terenach zielonych, niezależnie od sezonowych fluktuacji pogody.

## **Wskaźniki odporności na suszę i oszczędnego gospodarowania wodą przez rośliny**

Deficyt wody w komórkach i tkankach indukuje zmiany biochemiczne i fizjologiczne, zaburzając funkcje życiowe roślin, prowadząc do zahamowania wzrostu i rozwoju, a w przypadku długotrwałego braku wody również do zamierania tkanek. W warunkach klimatu umiarkowanego na półkuli północnej, rośliny narażone są równocześnie na niedobory wody i towarzyszący im stres świetlny, gdyż susza jest często związana z długotrwałymi wyżami, którym towarzyszą nie tylko brak opadów, latem – podwyższone, a zimą – obniżone temperatury, lecz także wzmożone promieniowanie świetlne wywołane brakiem zachmurzenia [36]. Stresy te działając synergistycznie wywołują szereg reakcji biochemicznych prowadzących m.in. do zamykania aparatów szparkowych w celu zmniejszenia transpiracji [11, 41, 62, 73]. Zahamowaniu ulega pobieranie dwutlenku węgla, a inhibicja fotosyntezy obniża poziom dostępnej energii chemicznej, gromadzonej w postaci ATP i NADPH, co wymusza z kolei konieczność wyemitowania nadmiarów energii zaadsorbowanej przez anteny chlorofilowe w postaci promieniowania cieplnego, fluorescencji lub opóźnionej luminescencji chlorofilu. Nadmiar zaadsorbowanej energii fotosyntetycznie czynnej (ang. **Photosynthetic Active Radiation** – PAR), która nie może zostać przetworzona na energię chemiczną lub bezpiecznie rozproszona (np. w cyklu ksantofilowym) powoduje fotoinhibicję fotosyntezy, której towarzyszy z kolei odwracalna destrukcja centrum reakcji fotosystemu II (PS II), spowolnienie transportu elektronów w obu fotosystemach i wzmożone powstawanie reaktywnych cząstek tlenu (ROS), takich jak tlen singletowy, rodnik wodorotlenowy oraz anionorodnik ponadtlenkowy [31, 35, 40]. Fotoinhibicji towarzyszą z jednej strony zmiany w charakterze emisji fluorescencji (FL) i opóźnionej luminescencji (OL) chlorofilu, a z drugiej urucha-

miane są reakcje detoksyfikacji ROS [5, 6, 29, 43]. Jeżeli poziom napromieniowania roślin jest zbyt wysoki lub oddziaływanie silnego światła długotrwałe, a mechanizmy przeciwutleniające w komórce nie są zdolne do zneutralizowania nadmiaru reaktywnego tlenu, to zostaje zapoczątkowany stres oksydacyjny, którego przejawem jest inicjacja szeregu niepożądanych reakcji, jak np. utleniania składników DNA, agregacji białek, wolnorodnikowego utleniania lipidów w błonach tylakoidowych, prowadzących do częściowej, lub nawet całkowitej i nieodwracalnej inhibicji kluczowych reakcji fotosyntezy oraz fotodestrukcji aparatu fotosyntetycznego [19, 42]. Następuje także fotoutlenianie barwników fotosyntetycznych, dezintegracja struktur komórkowych i zakłócenia w gospodarce wodnej całej rośliny. Następuje zahamowanie wzrostu, a w przypadku długotrwałego braku wody – zamieranie tkanek [74].

Wieloletnie badania umożliwiły stwierdzenie, że na poziomie biochemicznym rośliny o podwyższonej odporności na stres suszy charakteryzują się: 1) sprawniejszym rozpoznawaniem i długodystansowym przekazywaniem sygnałów (w tym ABA) [14, 31, 39, 50, 66, 69]; 2) wydajniejszym systemem naprawy lub/i degradacji uszkodzonych i ubikwitynylowanych białek, na drodze proteolizy [22, 38, 70, 74]; 3) lepszą ochroną błon komórkowych przez osmoprotektanty [25, 66, 76]; 4) występowaniem, oddziałujących głównie z trehalozą, białek LEA (ang. Late Embryogenesis Abundance) [10, 21]. Rośliny lepiej tolerujące stres suszy charakteryzują się również 5) mniejszymi zmianami w metabolizmie mitochondriów, w tym: aktywacji/intensyfikacji drogi alternatywnego oddychania [3, 56, 74] oraz 6) bardziej ustabilizowanym potencjałem oksydacyjno redukcyjnym tkanek, utrzymywanym na odpowiednim poziomie zarówno w skutek hamowania tempa powstawania aktywnych form tlenu, jak i sprawniejszą ich inaktywacją [19].

Zmiany biochemiczne powodują: 1) redukcję potencjału wody i aktywności komórkowej; 2) spadek turgoru prowadzący do zmniejszenia objętości komórek oraz zwiększenia stężenia osmoprotektantów; 3) zmiany struktury makromolekuł oraz stosunków przestrzennych między kompartmentami komórkowymi; 4) spowolnienie wzrostu [27, 37, 46, 51, 53, 59]. Aby tolerować stres suszy rośliny z jednej strony dostosowują swoją gospodarkę wodną do wzrastającego deficytu wody, a z drugiej strony ograniczają transpirację i usprawniają pobieranie oraz przewodzenie wody poprzez wytwarzanie rozwiniętego systemu korzeniowego i zwiększenie powierzchni przekroju naczyń przewodzących [51, 53, 68, 72]. Usprawnienie pobierania i przewodzenia wody przez rośliny prowadzi do wydłużenia okresu ich przeżycia i przyczynia się do wzrostu całkowitej ilości wody transpirowanej przez roślinę. Równoległe z tymi mechanizmami, jako skutek selekcji naturalnej bądź hodowlanej, wykształciły się systemy unikania stresu suszy, wśród których istotną rolę odgrywają: 1) synchronizacja tempa wzrostu, by uniknąć sezonowej suszy (w Polsce – wczesność, kiełkowanie w warunkach suszy glebowej/niskiego potencjału wodnego); 2) szybkie kiełkowanie i krzewienie w celu zacienienia gleby; 3) krótki okres wegetacji (rośliny kończą wegetację zanim nastąpi susza), bądź przeciwnie – długi

okres wegetacji (rośliny te zazwyczaj mają dłuższy system korzeniowy; 4) szczelność blaszki liściowej (woski), by transpiracja zachodziła jedynie przez aparaty szparkowe, gdyż parowanie poza aparatami szparkowymi jest bezproduktywne z punktu widzenia fotosyntezy; 5) zasychanie liści i tym samym zmniejszenie zapotrzebowania na wodę [75, 77].

Literatura dotycząca badań biochemicznych i fizjologicznych jest podsumowywana w pracach przeglądowych systematycznie publikowanych zarówno przez wiodące jak i mniej znane zespoły badawcze [7, 14, 18, 19, 34, 44, 45, 52]. Fizjologiczne i biochemiczne metody stosowane w badaniach odporności roślin na suszę zostały przez nas omówione w przygotowywanym właśnie opracowaniu [48].

Obecnie jesteśmy świadkami rozwoju metod identyfikacji i badania funkcji genów opartych na wstępnej analizie fenotypowej oraz następującej po niej analizie molekularnej mutantów uzyskiwanych na drodze mutagenyzy chemicznej i insercyjnej [32, 47]. Światowe zasoby mutantów insercyjnych, wykazujących nadekspresję pojedynczego genu, w genomie rośliny modelowej – rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) dochodzą obecnie do 400 tys. Mutacje te obejmują przeszło 30 tys. z całkowitej liczby 33 tys. genów *Arabidopsis* i mogą być znalezione np. poprzez bazę danych utworzoną w Salk Institute w La Jolla/San Diego w Kalifornii ([http://signal.salk.edu/Source/AtTOME\\_Data\\_Source.html](http://signal.salk.edu/Source/AtTOME_Data_Source.html)). Rośliną modelową dla zbóż jest ryż (*Oriza sativa*). Ze względu na trudności wynikające z większego niż u *Arabidopsis* genomu (394 Mbp vs. 157 Mbp) oraz rozwijanym dopiero systemem masowego wytwarzania i gromadzenia mutantów insercyjnych, liczba dostępnych mutantów ryżu wynosi ok. 200 tys., co stanowi mniej więcej połowę liczebności wymaganej do zapewnienia statystycznej pewności wprowadzenia mutacji w każdym genie [32, 33]. Geny, których ekspresja indukowana jest przez stresy środowiskowe kodują nie tylko metabolity i białka niezbędne w ochronie struktur komórkowych przed fizycznymi i biochemicznymi skutkami malejącego potencjału wodnego w tkankach, lecz również cząsteczki związane ze szlakami przekazywania sygnałów [20]. Wśród genów strukturalnych znajdują się geny białek: LEA (ang. Late Embryogenesis Abundant), Hsp (ang. Heat Shock Proteins): prolina, betainy glicynowej; geny osmoprotektantów cukrowych: mannitolu, trehalozy; geny białek warunkujących prawidłową strukturę błon komórkowych: np. desaturaz  $\omega$ -3 i  $\Delta$ -6; geny enzymów modyfikujących białka: proteinyazy i proteazy, a także fosfatazy; geny enzymów degradujących cząsteczki ROS (ang. Reactive Oxygen Species) i warunkujących prawidłowy potencjał oksydacyjno-redukcyjny w komórce: dysmutazy, katalazy, peroksydazy, reduktazy; czy wreszcie geny transporterów komórkowych – akwaporyn. Wśród genów kodujących przekaźniki sygnałów znajdują się geny kinaz oraz czynników transkrypcyjnych kodujących białka z rodzin: DREB (ang. Dehydration Response Elements Binding), ERF (ang. Ethylene Responsive Transcription Factor), WRKY (czynniki transkrypcyjne o konserwatywnej sekwencji aminokwasów: WRKYGQK), MYB (ang. Myeloblastosis), bHLH (ang. Basic Helix Loop Helix), bZIP (ang. Basic Leucine

Zipper Domain), NAC (czynniki transkrypcyjne o domenie wspólnej dla genów białek Nam, Ataf1 and Cuc2) oraz geny kodujące rodzinę białek palca cynkowego [58]. W ostatnim okresie (od 23 lutego 2010 do 25 maja 2010) w Stanach Zjednoczonych zgłoszono 262 patenty dotyczące suszy i odnajdywane przez hasło „drought” [67]. Wśród nich 73% stanowiły rośliny transgeniczne, a resztę tzw. konstrukty genowe, które mogą być wykorzystane do transformacji roślin w celu podniesienia ich odporności na suszę, w tym patent z dnia 6 kwietnia 2010, korporacji Mendel Biotechnology oraz Monsanto [12]. Zgłoszony konstrukt ma wprowadzać geny, które spowodują u roślin transgenicznych w porównaniu z wyjściowymi wzrost plonów poprzez wydłużenie czasu wegetacji, lepsze kiełkowanie, większe zadarnienie, lepiej rozwinięty system korzeniowy, tolerancję stresu chłodu i suszy, obniżone przewodnictwo aparatów szparkowych, zmienioną proporcję metabolizmu C/N i podniesioną odporność na niski poziom azotu i fosforu w glebie.

Osiągnięcia w zakresie badań biochemicznych i fizjologicznych, a także genetyki molekularnej pozwoliły na wytworzenie narzędzi wspomagających selekcję roślin, utrzymujących wysoki poziom plonowania w warunkach niedoboru wody [46, 49]. Dlatego też po zarysowaniu złożonego problemu odporności na suszę, w następnym rozdziale przejdziemy do zagadnienia, którego omówienie jest głównym celem naszego artykułu. Wykażemy w nim, dlaczego ze wzrostem plonu w warunkach suszy częściej związany jest nadmierny (i bardzo często niepotrzebny) wzrost wykorzystania zasobów wodnych. Wzrastająca ilość wody pobieranej przez rośliny uprawę powoduje konieczność wprowadzenia dodatkowego kryterium selekcyjnego, takiego by przy zachowaniu wysokich plonów obniżyć nakłady wodne, czy to ze źródeł naturalnych, czy też w wielorakich systemach nawadniania upraw [1, 9, 46].

## Stres suszy a efektywne wykorzystanie wody przez rośliny uprawne

Problem efektywnego wykorzystywania wody EUW (ang. Efficient Use of Water) przez rośliny to de facto pytanie o minimalną ilość wody potrzebną na wytworzenie jednostki masy organicznej w obrębie gatunku. Jego istota jest różna od pojęcia **wydajności transpiracji** TE (ang. Transpiration Efficiency) będącego, przy zdefiniowanych warunkach brzegowych, synonimem skuteczności/efektywności wykorzystania wody WUE (ang. Water Use Efficiency), parametru mówiącego o ilości suchej masy wytworzonej przez roślinę przy transpiracji 1 litra wody [9, 27, 60]. Analizując wydajność transpiracji możemy w obrębie gatunku poszukiwać genotypów wytwarzających maksymalną ilość masy zielonej przy transpiracji jednego litra wody, jednakże taki wskaźnik nie jest przeważnie brany pod uwagę w pracach selekcyjnych. Zauważono, że współczesne kryteria selekcji roślin w kierunku podniesienia odporności na suszę, promują rośliny „rozrzutne”, utrzymujące turgor w wa-



runkach suszy dzięki intensywniejszej transpiracji, czyli charakteryzujące się mniejszą jej wydajnością. Zagadnienia ilości wody transpirowanej przez rośliny zaczynają wchodzić w obszar zainteresowań naukowców i hodowców [9].

Z punktu widzenia efektywnego („oszczędnego”) wykorzystywania wody w procesie asymilacji węgla, transpiracja pozaszparkowa (zarówno kutikularna jak i przetchlinkowa) jest zjawiskiem niepożądanym, zazwyczaj nie przekraczającym kilku do kilkunastu procent. Im niższa jej wartość, tym lepsze wykorzystanie wody [17]. Dowiedziono, że może ona stanowić dodatkowe kryterium w selekcji roślin o podniesionej odporności na suszę i że selekcję można prowadzić już w fazie siewki, gdyż ilość wosków, ograniczających transpirację pozaszparkową, odkładanych w warstwie kutikularnej jest zazwyczaj niezależna od wpływu warunków środowiskowych [2].

Już w latach 60. i 70. ubiegłego stulecia w pracach zespołu profesora Strebeyki dowiedziono, że umiarkowane przymknięcie aparatów szparkowych chroni roślinę przed zbędnymi stratami wody, ale jeszcze nie hamuje dyfuzji dwutlenku węgla w stopniu ograniczającym fotosyntezę. Zaobserwowano ograniczenie fotosyntezy w warunkach niedostatku wody u siewek kapusty, liści buraka cukrowego i machorki dopiero wówczas, gdy szparki były prawie zamknięte. Zróżnicowanie pomiędzy wielkościami cząsteczek dwutlenku węgla i wody ( $\text{CO}_2 > \text{H}_2\text{O}$ ) umożliwia roślinie ograniczenie transpiracji przy niezmienionym poziomie pobieranego  $\text{CO}_2$ . U tej samej rośliny, przy jednakowo rozwartych szparkach, w takich samych warunkach ciśnienia i temperatury można zaobserwować parowanie wody 40 razy większe niż pochłanianie dwutlenku węgla, gdy porównuje się wartości wyrażone w gramach, z kolei porównanie wielkości molowych uwidacznia różnicę prawie 100-krotną [64]. Zależność ruchów aparatów szparkowych od stężenia dwutlenku węgla jest znana prawie od stulecia, a od przeszło czterdziestu lat wiemy o jej związku z ABA [31]. Nie mniej jednak dopiero ostatnie badania z wykorzystaniem mutantów pozwoliły na pogłębienie wiedzy na temat mechanizmu rozwoju aparatów szparkowych [8], wpływu światła [54] oraz regulacji rozwarcia aparatu szparkowego zależnego od ABA i stężenia jonów [55]. Pod wpływem sygnałów indukowanych przez bodźce środowiskowe w obrębie liścia, jak i sygnałów przekazywanych z korzeni, aparaty szparkowe w sposób ciągły zamykają się bądź otwierają, co jest skutkiem przetwarzania i integracji tych sygnałów w odpowiedź fizjologiczną na poziomie rośliny, w pierwszym rzędzie poprzez regulację turgoru [31]. Zamykanie aparatów szparkowych może skutkować wzrostem temperatury liścia wywołując, w niesprzyjających warunkach pogodowych, stres temperaturowy. Jednak, ponieważ rośliny wykształciły wiele różnych mechanizmów ograniczania wpływu stresów abiotycznych, do których należy np. falowanie łanu zbóż przy niewielkich nawet powiewach wiatru [23], tego zagadnienia również nie podejmujemy.

Nestor hodowli odpornościowej roślin profesor Abraham Blum w roku 2009 analizował znaczenie EUW oraz WUE, przeciwstawiając pojęcie efektywnego wykorzystywania wody przez rośliny uprawne (wysokie EUW – zjawisko pożądane

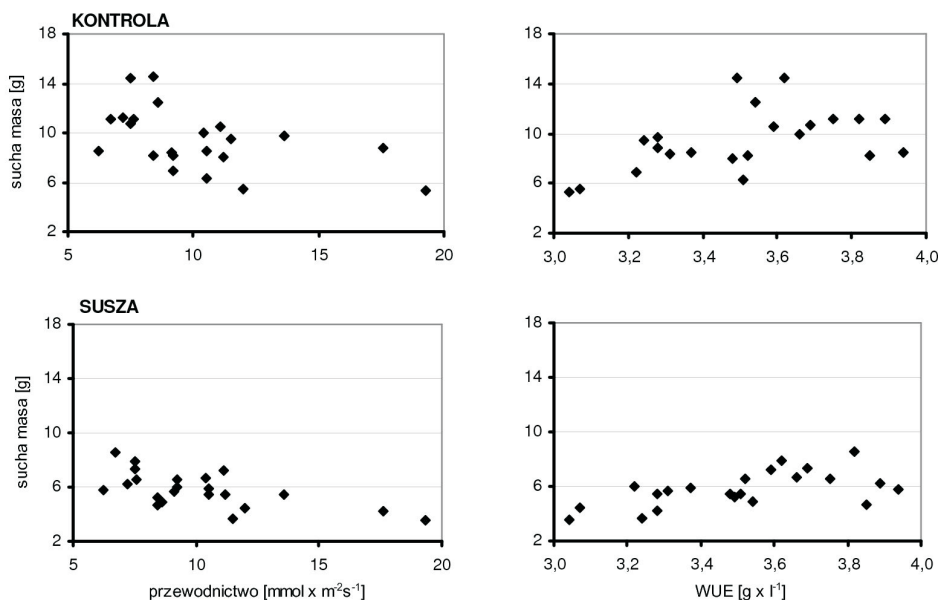
w kategoriach ochrony zasobów wodnych) pojęciu wydajności transpiracji, tj. skuteczności wykorzystania wody (WUE wysokie – zjawisko niepożądane w kategoriach ochrony zasobów wodnych) [9]. Autor ten zwraca uwagę, że traktowanie wskaźnika WUE jako synonimu odporności na stres suszy i tym samym wysokiego plonowania w warunkach niedoborów wody jest nieprawidłowe. Argumentacja autora oparta jest na równaniu Passioura:  $Y = WU \times WUE \times HI$ .

W równaniu tym wielkość plonu określa się jako iloczyn ilości zużytej wody WU (ang. **Water Use**), efektywności wykorzystania wody (tj. wydajności transpiracji w  $\text{kg s.m.} \cdot \text{l}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ) WUE i indeksu plonowania HI (ang. **Harvest Index**). Równanie to jest wykorzystywane i dziś przez wielu fizjologów i hodowców [45]. Rozwiązując je, można potraktować wskaźnik WUE jako iloraz biomasy i ilości wody zużytej do jej wyprodukowania ( $WUE = B/WU$ ), co prowadzi do zależności  $Y = B \times HI$ . Po podstawieniu w miejscu B algorytmu de Wita:  $B = mT/E_0$ , plon jest wprost proporcjonalny do transpiracji ( $Y \propto T$ ), gdyż wielkość „m”, to stała o wartości bardzo zbliżonej dla wielu gatunków  $C_3$ , T – transpiracja, a  $E_0$  to entalpia parowania wody. Tak więc, zgodnie z rozumowaniem Bluma [9], wzrost plonowania można osiągnąć podnosząc transpirację (T).

Nieco odmiennie przedstawiono to zagadnienie z punktu widzenia fizjologii roślin. W doświadczeniu szklarniowym dla 22 odmian bawełny stwierdzono istnienie ujemnej korelacji między efektywnością wykorzystania wody (WUE) a przewodnictwem epidermalnym liścia [17]. Niemniej jednak analiza prezentowanych w pracy wyników, ukazuje wystarczająco dużą zmienność w obrębie badanych cech, aby podjąć próbę selekcji w poszukiwaniu osobników charakteryzujących się niskim przewodnictwem aparatów szparkowych i jednocześnie dobrym plonowaniem, zarówno w warunkach optymalnych, jak i w czasie suszy (rys. 1). W omawianym doświadczeniu, znaleziono rośliny plonujące na podobnym poziomie zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach suszy (7,30 vs. 7,20), a różniące się przewodnictwem aparatów szparkowych o prawie 50%, ze zmiennością tej cechy ok. 30%.

Fish i Earl [17] zestawiają również zmienność współczynników transpiracji u innych, niż bawełna, gatunków: 41% – orzeszki ziemne; 25% – sorgo; 32 oraz 17% – pszenica; 18% – soja; 11% – groch krowi (*Vigna*). Przegląd danych literaturowych dokonany przez Kemaniana i in. [30] wskazuje na prawie dwukrotną rozpiętość TE u odmian jęczmienia (od 3,20 do  $5,60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) i trzykrotną u odmian pszenicy (od 3,10 do  $9,21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Także u kukurydzy, rośliny typu  $C_4$ , a więc z natury „oszczędniejszej” w gospodarowaniu wodą [28] stwierdzono dużą zmienność TE (> 50%) [15].

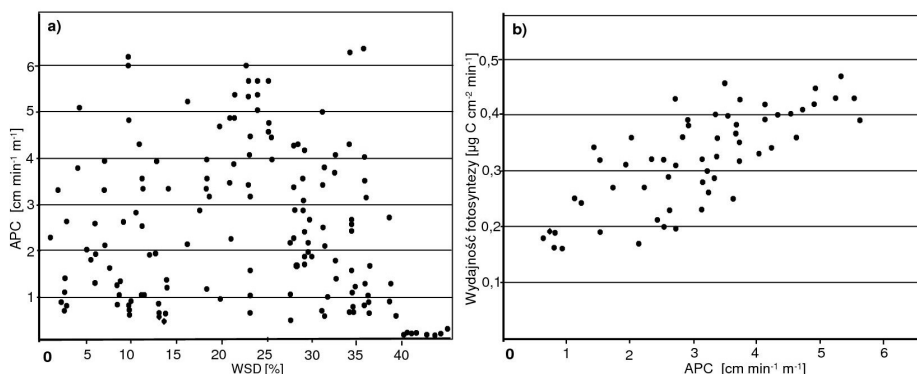
Prace opublikowane przez zespół prof. Strebeyki pozwalają na pośrednie wnioskowanie o efektywności wykorzystywania wody przez rośliny uprawne. Zestawienie zależności wydajności fotosyntezy od przelotowości szparek APC (ang. **Air Passage Capacity**) [63] w liściach kapusty [4], rzepaku jarego [57] i buraków cukrowych [26] wskazują na duże zróżnicowanie w zakresie wykorzystania wody przez rośliny uprawne, zależne od gatunku, natężenia promieniowania (mniejsze zróżnicowanie



**Rysunek 1.** Wpływ stresu suszy na zależność między suchą masą [g] a przewodnictwem aparatów szparkowych [ $\text{mmol} \times \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] oraz WUE [ $\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ] dla 22 genotypów bawełny uprawianych w warunkach szklarniowych w warunkach kontrolnych oraz suszy [17, zmodyfikowano]

przy niskim natężeniu), wieku liścia oraz stopnia odwodnienia tkanek (większe zróżnicowanie przy mniejszym odwodnieniu). I tak, burak cukrowy zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia jak i warunkach stresu suszy nie przekraczającego 40% WSD liści (ang. **Water Saturation Deficit**) charakteryzuje się bardzo dużym zróżnicowaniem przewodnictwa (od 1 do  $6 \text{ cm min}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) dla każdego WSD z zakresu  $< 40\%$  i wartościami niemierzalnymi dla  $\text{WSD} > 40\%$  (rys. 2a). Wydajność fotosyntezy w zależności od przewodnictwa może wzrosnąć nawet przeszło dwukrotnie dla zadanego przewodnictwa (rys. 2b).

Według danych Fisha i Earla [17] wykazano potencjalną możliwość wprowadzenia dodatkowego kryterium selekcyjnego w celu wyodrębniania roślin oszczędnie gospodarujących wodą. Wyniki innych autorów [4, 13, 26, 57, 63] również ukazują potencjał wewnątrzgatunkowej zmienności, który można wykorzystać w selekcji odmian oszczędnie gospodarujących wodą. Wszystkie te prace korespondują z rozważaniami Bluma i uprawomocniają włączenie wskaźników efektywnego wykorzystania wody przez rośliny uprawne do programów hodowli odpornościowej, szczególnie odporności na stres dehydracyjny. Omówiona przez nas literatura wskazuje wyraźnie, że: „w poszukiwaniu metod poprawy plonowania pojawia się konieczność bardzo ścisłej integracji badań na różnych poziomach organizacji życia roślin. Dotyczy to ścisłego współdziałania: genetyków molekularnych, biochemików i fizjologów roślin oraz hodowców” [61].



**Rysunek 2.** Zależność przelotowości aparatów szparkowych – APC [ $\text{cm min}^{-1} \text{m}^{-1}$ ] w liściach buraka cukrowego od deficytu wodnego – WSD [%] (a) oraz zależność wydajności fotosyntezy [ $\mu\text{g C cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ ] od APC (b) [26; za zgodą Redakcji]

## Podsumowanie

Oszczędne gospodarowanie wodą przez rośliny uprawne wymusza rozszerzenie kryteriów selekcyjnych o dodatkowy parametr, jakim jest współczynnik transpiracji roślin. W obecnych programach hodowlanych genotypy wyżej plonujące w warunkach suszy przeważnie charakteryzują się wyższym przewodnictwem aparatów szparkowych, co oznacza wzrost zużycia wody w procesie transpiracji i tym samym istotne obniżenie wartości współczynnika transpiracji  $\text{TE} [\text{g l}^{-1}]$  [9]. Dlatego właśnie parametr niskiego przewodnictwa aparatów szparkowych przy zadanym poziomie plonowania powinien być nowym kryterium wprowadzonym do hodowli roślin odpornych na suszę. Zastosowanie tego wskaźnika może promować rośliny „oszczędne” w korzystaniu z zasobów wodnych. Obserwowana zmienność wewnątrzgatunkowa jest wystarczająco duża, by podjąć skuteczną selekcję.

## Podziękowanie

Dziękujemy panu prof. dr hab. Andrzejowi Aniołowi, IHAR, za wskazanie problemu, a pani prof. dr hab. Barbarze Zagdańskiej za jego dyskusję.

## Literatura

- [1] Araus J., Slafer G., Royo C., Serret M. 2008. Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27: 377–412.
- [2] Araus J., Febrero A., Vendrell P. 1991. Epidermal conductance in different parts of durum wheat grown under Mediterranean conditions: the role of epicuticular waxes and stomata. *Plant Cell Environ.* 14: 545–558.
- [3] Atkin O.K., Macherel D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann. Bot.* 103: 581–597.

- [4] Baclawska-Krzemińska Z. 1973. Influence of light, water deficit and age of plant on photosynthesis and air passage capacity in leaves of *Brassica oleracea* L. var. *capitata alba* v. Ditmarska. *Hod. Rośl. Aklim. Nas.* (obecnie *Plant Breed. Seed Sci.*) 17: 303–328.
- [5] Bączek-Kwinta R., Filek W., Grzesiak S., Hura T. 2006. The effect of soil drought and rehydration on growth i antioxidant activity in flag leaves of triticale. *Biol. Plantarum* 50: 55–60.
- [6] Baker N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89–113.
- [7] Bartels D., Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 23–58.
- [8] Bergmann D.C., Sack F.D. 2007. Stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 163–81.
- [9] Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Res.* 112: 119–123.
- [10] Caramelo J.J., Iusem N.D. 2009. When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 99: 1–6.
- [11] Chaerle L., Van Der Straeten D. 2007. Regulating plant water status by stomatal control. W: Jenks M.A., Hasegawa P.M., Jain S.M., *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops.* Springer, Netherlis: 73–90.
- [12] Creelman R.A., Gutterson N., Ratcliffe O., Reuber T.L., Cerny R.E., Duff K.F.Z., Kjemtrup-Lovelace S., Meister R., Petracek M., Xu Q. (Mendel Biotechnology Inc. CA (US), Monsanto Company SL, MO (US)) 2010. Yield and stress tolerance in transgenic plants. United States Patent US 7692067 B2.
- [13] Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J., Farquhar G.D. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Bot.* 55: 2447–2460.
- [14] Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. 2010. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651–679.
- [15] Du T., Kang S., Sun J., Zhang X., Zhang J. 2009. An improved water use efficiency of cereals under temporal and spatial deficit irrigation in north China. *Agr. Water Manage.* 97: 66–74.
- [16] FAO, Food and Agriculture Organization, 2003. Review of World Water Resources by Country. Water Reports, FAO, Rome, 23: 127 ss.
- [17] Fish D.A., Earl H.J. 2009. Water-Use Efficiency is negatively correlated with leaf epidermal conductance in cotton (*Gossypium* spp.). *Crop Sci.* 49: 1409–1415.
- [18] Foyer C., Bloom A.J., Queval G., Noctor G. 2009. Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 455–487.
- [19] Foyer C., Noctor G.D. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxid. Redox Sign.* 11: 861–905.
- [20] Gosal S.S., Wani S.H., Kang M.S. 2009. Biotechnology and drought tolerance. *J. Crop Improv.* 23: 19–54.
- [21] Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388: 151–157.
- [22] Grudkowska M., Zagdańska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* 51: 609–624.
- [23] Grzywacz A. 2006. Emil Nalborczyk (1932–2006). Wspomnienie. *Nauka* 2/2006: 188–192.
- [24] GUS, Główny Urząd Statystyczny, 2009. Ochrona Środowiska. Informacje i opracowania statystyczne. Warszawa: 1–527. «www.stat.gov.pl».
- [25] Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3793–3810.
- [26] Jarecka M. 1973. Influence of light, water deficit and age of plant on photosynthesis and air passage capacity in leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* var. *Saccharifera*). *Hod. Rośl. Aklim. Nas.* (obecnie *Plant Breed. Seed Sci.*) 17: 329–357.
- [27] Kacperska A. 2002. Reakcje roślin na abiotyczne czynniki stresowe. W: Kopcewicz J., Lewak S. (red.) *Fizjologia roślin.* Warszawa: PWN: 612–678.
- [28] Kacperska A. 2002. *Gospodarka wodna.* W: Kopcewicz J., Lewak S., (red.) *Fizjologia roślin.* Warszawa: PWN: 192–227.
- [29] Kalaji M., Łoboda T. 2010. *Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin.* Warszawa: Wydawnictwo SGGW.
- [30] Kemanian A.R., Stöckle C.O., Huggins D.R. 2005. Transpiration-use efficiency of barley. *Agr. Forest Meteorol.* 130: 1–11.

- [31] Kim T.-H., Bohmer M., Hu H., Nishimura N., Schroeder J.I. 2010. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding Abscisic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 561–591.
- [32] Kondou Y., Higuchi M., Matsui M. 2010. High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function technology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 373–393.
- [33] Krishnan A., Guiderdoni E., An G., Hsing Y., Han C., Lee M.C., Yu S.-M., Upadhyaya N., Ramachiran S., Zhang Q., Sundaresan V., Hirochika H., Leung H., Pereira A. 2009. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol.* 149: 165–170.
- [34] Langridge P., Paltridge N., Fincher G. 2006. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 343–354.
- [35] Logan B.A., Korniyev D., Hardison J., Holaday A.S. 2006. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynth. Res.* 88: 119–132.
- [36] Lorenz H. 2005. Atlas Klimatu Polski. Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej, Warszawa: 116 ss.
- [37] Maseda P.H., Ferniez R.J. 2006. Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *J. Exp. Bot.* 57: 3963–3977.
- [38] Miazek A., Zagdańska B. 2008. Involvement of exopeptidases in dehydration tolerance of spring wheat seedlings. *Biol. Plantarum* 52: 687–694.
- [39] Miyazono K., Miyakawa T., Sawano Y., Kubota K., Kang H., Asano A., Miyauchi Y., Takahashi M., Zhi Y., Fujita Y., Yoshida T., Kodaira K., Yamaguchi-Shinozaki K., Tanokura M. 2009. Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462: 609–614.
- [40] Moradi F., Ismail A.M. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence i ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Ann. Bot.* 99: 1161–1173.
- [41] Morgan J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 299–319.
- [42] Mostowska A., Gwóźdź E.A. 1998. Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny. *Post. Biol. Kom.* 22: 43–63.
- [43] Murkowski A. 2002. Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych. *Acta Agroph.* 61: 1–158.
- [44] Noctor G., Paepé R.D., Foyer C. 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 125–134.
- [45] Reynolds M., Tuberosa R. 2008. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 171–179.
- [46] Richards R.A., Rebetzke G.J., Watt M., Condon A.G., Spielmeyer W., Dolferus R. 2010. Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Funct. Plant Biol.* 37: 85–97.
- [47] Rybka K. 2009. TILLING i FOX-hunting: nowe metody analizy funkcjonalnej genów. *Post. Biol. Kom.* 36: 539–554.
- [48] Rybka K., Orłowska R. 2010. Metody oceny odpornosci roslin na susze. Monografia. Radzików Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin: w przygotowaniu.
- [49] Salekdeh G.H., Reynolds M., Bennett J., Boyer J. 2009. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci.* 14: 488–496.
- [50] Santiago J., Rodrigues A., Saez A., Rubio S., Antoni R., Dupeux F., Park S.-Y., Márquez J.A., Cutler S.R., Rodriguez P.L. 2009. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade: A PP2Cs. *Plant J.* 60: 575–588.
- [51] Schachtman D.P., Goodger J.Q.D. 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci.* 13: 281–287.
- [52] Shao H.-B., Chu L.-Y., Jaleel C.A., Manivannan P., Panneerselvam R., Shao M.-A. 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants – biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29: 131–151.
- [53] Shao H.-B., Chu L.-Y., Jaleel C.A., Zhao C.-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *CR Biol.* 331: 215–225.
- [54] Shinozaki K., Doi M., Assmann S.M., Kinoshita T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 219–47
- [55] Sirichira C., Wasilewska A., Vlad F., Valon C., Leung J. 2009. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *J. Exp. Bot.* 60: 1439–63

- [56] Skirycz A., De Bodt S., Obata T., De Clercq I., Claeys H., De Rycke R., Iriankaja M., Van Aken O., Van Breusegem F., Fernie A. R., Inze D. 2010. Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol.* 152: 226–244.
- [57] Skośkiewicz K. 1973. Stomatal movements in summer rape Bronowski IHAR (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (METZG) sink. F. Annu a Thel.) in dependence on the age of the leaf, water deficit, light intensity and CO<sub>2</sub> concentration. *Hod. Rośl. Aklim. Nas.* (obecnie *Plant Breed. Seed Sci.*) 17: 359–385.
- [58] Somvanshi V. S. 2009. Patenting drought tolerance in organisms. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 3: 16–25.
- [59] Sreenivasulu N., Sopory S.K., Kavi Kishor P.B. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* 388: 1–13.
- [60] Starck Z. 2002. Fizjologiczne podstawy produktywności roślin. W: Kopcewicz J., Lewak S. (red.) *Fizjologia roślin*. Warszawa: wyd. PWN: 679–706.
- [61] Starck Z. 2009. Dystrybucja asymilatów kluczowym procesem determinującym plon. *Post. Nauk Roln.* 2: 51–69.
- [62] Strebeyko P. 1966. Zmiany zawartości wody w tkankach roślinnych jako miara wahań bilansu wodnego w badaniach ekologicznych i rolniczych. *Roczn. Nauk Roln.* 91-A-3: 545–562.
- [63] Strebeyko P. 1973. Theoretical principles of gas exchange in plants. *Hod. Rośl. Aklim. Nas.* (obecnie *Plant Breed. Seed Sci.*) 17: 287–295.
- [64] Strebeyko P. 1976. Procesy biofizyczne w roślinie. Warszawa: PWN: 257–258.
- [65] TPI, Turfgrass Producers International, 2010. Water Right – Conserving Our Water, Preserving Our Environment, The Lawn Institute, 2 East Main Street, East Dundee, IL 60118 USA, <<http://www.turfgrassod.org/publish/posts/71/water-right-publication>>.
- [66] Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2009. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J.* 57: 1065–1078.
- [67] US Patent Database: <<http://patft1.uspto.gov/>>.
- [68] Wang P., Song C.-P. 2008. Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol.* 178: 703–718.
- [69] Wilson P.B., Estavillo G.M., Field K.J., Pornsiriwong W., Carroll A.J., Howell K.A., Woo N.S., Lake J.A., Smith S.M., Millar A.H., von Caemmerer S., Pogson B.J. 2009. The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58: 299–317.
- [70] Wiśniewski K., Zagdańska B. 2001. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52: 1455–1463.
- [71] World Resources Institute (2008), World Resources 2008: Roots of Resilience -Growing the Wealth of the Poor. World Resources Institute (WRI) we współpracy z United Nations Development Programme, United Nations Environment Programme i World Bank. 2008. Washington, DC: 277 ss.
- [72] Xu Z., Zhou G. 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59: 3317–3325.
- [73] Zagdańska B., Pacanowska A. 1979. Dehydration tolerance in spring wheat seeds. *Biol. Plantarum* 21: 462–467.
- [74] Zagdańska B. 1997. Mechanizmy odporności zbóż na suszę glebową: metabolizm energetyczny pszenicy jarej w nabywaniu odporności. *Biuletyn IHAR* 203: 41–55.
- [75] Zagdańska B., Kozdój J. 1994. Water stress-induced changes in morphology and anatomy of flag leaf of spring wheat. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63: 61–66
- [76] Zhang J., Dell B., Conocono E., Waters I., Setter T., Appels R. 2009. Water deficits in wheat: fructan exohydrolase (1-FEH) mRNA expression i relationship to soluble carbohydrate concentrations in two varieties. *New Phytol.* 181: 843–850.
- [77] Żurek G. 2006. Reakcja traw na niedobory wody – metody oceny i ich zastosowanie dla gatunków trawnikowych. Monografia. Radzików: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin: 1–106.

## Effective use of water as an obligatory criterion in plant breeding

### Summary

**Key words:** stomata, transpiration, drought, water usage

Destabilized water balance is difficult to be restored and periodical floods are unable to rebuild it. Improvement of efficiency in water usage in agriculture is possible by the tightening of melioration systems, by the extension of retention reservoir nets and may be also supported by plant breeding methods. Taking into account the effective use of water into breeding processes, new selection markers should be added to distinct individual plants which keep low respiration rate. Such cultivars should give good yield along with maintaining low transpiration level in both: optimal and sub-optimal climatic conditions. Presently modern cultivars with improved drought resistance retain proper turgor under stress conditions by more intense transpiration [9]. Unfortunately, more intense transpiration during the drought period is compatible with higher transpiration rate under the optimal weather conditions, what results in larger amount of water evapotranspiring from the soil.

In this review, reducing of water usage by crops has been discussed. Major attention was paid to the conductance trait of stomata as a marker suitable for selection of plants which have good yield and lower transpiration.



## **Substancje aktywne stosowane w ochronie upraw ekologicznych i konwencjonalnych w świetle aktualnych przepisów**

*Ewa Matyjaszczyk, Joanna Sobczak*

*Zakład Ekspertyz i Opinii o Środkach Ochrony Roślin  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,  
ul. W. Węgorka 20, 60-318 Poznań*

*e-mail: E.Matyjaszczyk@ior.poznan.pl, J.Sobczak@ior.poznan.pl*

**Słowa kluczowe:** Substancja aktywna, środki ochrony roślin, dostępność, Polska

### **Wstęp**

Przepisy dotyczące ochrony roślin w państwach członkowskich Unii Europejskiej są silnie zharmonizowane. W obowiązującej obecnie w Unii Europejskiej Dyrektywie 91/414 dotyczącej wprowadzania środków ochrony roślin do obrotu [1] podkreślono, że głównym jej celem nie jest poprawa poziomu produkcji rolniczej, ale zapewnienie bezpieczeństwa ludzi i środowiska naturalnego. Liczba substancji aktywnych dopuszczonych do stosowania w ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej od kilku lat systematycznie maleje. Analizując nowe akty prawne dotyczące ochrony roślin, które wejdą w życie od roku 2011 [2, 10] można stwierdzić, że wymagania dotyczące rejestracji środków ochrony roślin (ś.o.r.) prawdopodobnie wzrosną, a liczba dostępnych substancji aktywnych będzie nadal malała. Rodzi to obawy o możliwości ochrony wielu upraw, szczególnie małoobszarowych oraz obawy dotyczące zwiększenia prawdopodobieństwa występowania odporności na dostępne substancje aktywne.

Ze względu na duży nacisk, jaki Unia Europejska kładzie na bezpieczeństwo żywności wydawałoby się, że spadek możliwości ochrony nie powinien dotyczyć upraw ekologicznych ponieważ do stosowania w rolnictwie ekologicznym kwalifikuje się tylko nieliczne ś.o.r. zawierające wyłącznie substancje aktywne pochodzenia naturalnego. Po dokładnej analizie sytuacji prawnej okazuje się jednak, że paradoksalnie w najbliższych latach przewidywany jest znaczący spadek liczby substancji aktywnych i preparatów zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym.

## Material i metody

Dla celów niniejszej publikacji przeanalizowano obecnie obowiązujące w Unii Europejskiej i w Polsce akty prawne dotyczące ochrony roślin w rolnictwie konwencjonalnym i ekologicznym oraz nowe przepisy, których obowiązywanie rozpocznie się w roku 2011, a także wyniki unijnego przeglądu substancji aktywnych środków ochrony roślin. Szczegółowej analizie poddano również rejestr ś.o.r. Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (według stanu na 30.04.2009, czyli 5 lat po przystąpieniu Polski do Unii Europejskiej) oraz decyzje o wycofaniu ś.o.r. ze stosowania i dopuszczeniu do obrotu handlowego wydane w okresie członkostwa Polski w Unii Europejskiej (to jest od 01.05.2004 do 30.04.2009). Rejestr ś.o.r. dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi znajduje się na stronie internetowej Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi «<http://www.bip.minrol.gov.pl/DesktopDefault.aspx?TabOrgId=647&LangId=0>» i jest publicznie dostępny, natomiast decyzje o wycofaniu i dopuszczeniu ś.o.r. do obrotu otrzymywano na bieżąco z Ministerstwa Rolnictwa.

Źródłem danych dotyczących ś.o.r. zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym jest strona internetowa Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu «<http://www.ior.poznan.pl/index.php?strona=19&wiecej=26>» [4] (Instytut jest jednostką upoważnioną do kwalifikowania środków ochrony roślin do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Polsce).

## Wyniki

Na liście ś.o.r. zarejestrowanych w Polsce zachodzą zmiany będące skutkiem przystąpienia Polski do Unii Europejskiej w dniu 01.05.2004. Od przystąpienia do Unii Europejskiej w Polsce widoczny jest systematyczny spadek liczby zarejestrowanych środków ochrony roślin [6], z jednoczesnym ograniczaniem dostępnych substancji aktywnych oraz zakresów etykiet środków ponownie rejestrowanych. Środek ochrony roślin składa się zwykle z szeregu związków chemicznych, ale głównym składnikiem, odpowiedzialnym za działanie środka jest substancja aktywna. Unia Europejska przeprowadziła przegląd około 1000 substancji aktywnych pod kątem ich bezpieczeństwa dla zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska naturalnego. W wyniku tego przeglądu zdecydowana ich większość (74%) została wyeliminowana ze stosowania w ochronie roślin. Warto podkreślić, że tylko niewielką część substancji aktywnych (7%) wycofano z powodu negatywnej oceny. Większość (67%) wycofano ponieważ producenci agrochemikaliów nie zdecydowali się pokryć kosztów oceny i kosztów niezbędnych badań, które wynosiły zazwyczaj powyżej 1 mln euro.

Oczywiście nie wszystkie substancje aktywne wycofane ze stosowania w Unii Europejskiej były zarejestrowane w Polsce, ponadto producenci substancji aktywnych stosowanych powszechnie w ochronie roślin i sprzedawanych w dużych ilościach

ciach chętnie pokrywali koszty oceny. Należy również pamiętać, że każdego roku na rynek wprowadzane są s.o.r. zawierające nowe substancje aktywne. Dlatego, aby mówić o skutkach wycofań, należy przeanalizować, jakie substancje aktywne zostały wycofane i wprowadzone do stosowania w Polsce.

W tabeli 1 przedstawiono zmiany w dostępności substancji aktywnych s.o.r. w analizowanym okresie pierwszych pięciu lat członkostwa Polski w Unii Europejskiej. Stopniowe wycofywanie substancji aktywnych ze stosowania w Polsce w analizowanym okresie było bezpośrednim skutkiem decyzji podejmowanych na szczeblu unijnym.

**Tabela 1.** Substancje aktywne zarejestrowane po raz pierwszy w Polsce oraz całkowicie wycofane ze stosowania w ochronie roślin w Polsce w okresie 01.05.2004-30.04.2009

Rodzaj substancji	Nowo zarejestrowane substancje aktywne	Wycofane substancje aktywne
Fungicydy, Bakteriocydy	benalaksyl-M, bentiwalikarb, boskalid, cyjazofamid, dimoksystrobina, *fenbukonazol, fluoksastrobina, fluopikolid, mandipropamid, metrafenon, *olej z pomarańczy, *paklobutrazol, piraklostrobina, proquinazid, protiokonazol, <i>Pseudomonas chloraphis</i> (16)	aldehyd glutarowy, azakonazol, chitozan, cyprokonazol, czwartorzędowy związek amoniowy, dichlofluanid, dodyna, ekstrakt z nasion i miąższu grejfruta, formaldehyd, kwas borowy, lecytyna, metalaksyl, mychlobutanil, ofurace, oksadiksyl, oksyna salicylomiedziowa, prochloraz, procymidon, triadimefon, tridemorf, triforyny, winchlozolina (22)
Herbicydy	aminopyralid, bifenoks, dimetenamid-P, petoksamid, pinoksaden, tembotrion (6)	alachlor, dichloroprop, fluoroglikofen, haloksyfop-R, imazetapyr, propachlor, setoksydym, symazyna, terbutyloazyna, trifluralina (10)
Insektycydy, Akarycydy	<i>Cydia Pomonella Granulosis Virus</i> , flonikamid, gamma-cyhalotryna, metaflumizon, spiroidiklofen, *tau-fluwalinat (6)	amitraz, azynofos metylowy, benfurakarb, bromek metylu, buprofezyna, cyheksatyna, diazynon, fenitrotion, fenpropatryna, heksaflumuron, heksytiazeks, izofenfos, karbofuran, karbosulfan, malation, metomyl, oksydemeton metylowy, piperonylobutoksyd, pirydafenion, propoksur, tebufenozid, tetradifon, tetrametryna, tiodikarb, triazamat, trichlorfon (26)
Inne	*2-metylo-3-buten-2-ol, 1-metylocyklopropen, ekstrakt roślinny z alg <i>Ecklonia maxima</i> , F-myrcenol, ipsdienol, octan (ZE)-9,12-tetradekadienylu, olej lniany, polialkilenotlenek heptametylotrisiloksanu (8)	2-metylo-3-buten-ol, <i>Agrobacterium radiobacter</i> , aldehyd cynamonowy, brodifakum, chlorek choliny, dimetylina, fluoprimidol, metaldehyd, siarczan amonowy, streptomycyna, sulfid 2-hydroksyetylowo-butyloowy, tlenek wapnia (12)

Źródło: Opracowanie własne.

\* Substancje aktywne nowo zarejestrowanych w Polsce s.o.r., dla których zapadła decyzja o niewłączeniu do Załącznika I Dyrektywy 91/414 EWG i wycofaniu ze stosowania w ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej.

Jak wynika z tabeli 1, w latach 2004–2009 w Polsce zarejestrowano 36 substancji aktywnych ś.o.r., które wcześniej nie były w naszym kraju stosowane w ochronie roślin – przy czym dla 5 z nich (nazwy oznaczono w tabeli gwiazdkami) zapadła decyzja o wycofaniu ze stosowania w Unii Europejskiej, czyli 31 z nich będzie stosowanych w ochronie roślin w Polsce (sytuacja prawna oleju z pomarańczy została omówiona dokładniej w części dotyczącej ochrony upraw ekologicznych). Najliczniejszą grupę wśród substancji nowo zarejestrowanych stanowiły substancje przeznaczone do zwalczania chorób, wchodzące w skład fungicydów. W tym samym okresie wydano decyzje o wycofaniu 70 substancji aktywnych, które przed przystąpieniem do Unii Europejskiej były stosowane w ochronie roślin w Polsce, najliczniejszą grupę wśród nich stanowiły substancje przeznaczone do zwalczania szkodników. Oznacza to, że liczba dostępnych w Polsce dla rolnictwa substancji aktywnych ś.o.r. uległa znacznemu ograniczeniu. Ograniczenie dotyczyło każdej grupy środków: liczba substancji stosowanych w ochronie przed chorobami zmniejszyła się o 9, w ochronie przed chwastami o 4, w ochronie przed szkodnikami aż o 21 i w ochronie przed pozostałymi organizmami szkodliwymi o 5.

W rolnictwie ekologicznym w pierwszym rzędzie powinno się zapobiegać szkodom wyrządzanym przez szkodniki, choroby i chwasty przez ochronę naturalnych wrogów, dobór odpowiednich gatunków i odmian roślin uprawnych, stosowanie płodozmianu, odpowiednich technik uprawy, a także metod termicznych. Gdy metody te nie przynoszą właściwych rezultatów można sięgać po środki ochrony roślin, ale tylko takie, które spełniają kryteria odpowiednich aktów prawnych. Substancje, które można stosować w ochronie upraw ekologicznych w Unii Europejskiej, zostały wymienione z podziałem na grupy w załączniku II do rozporządzenia Rady nr 889/2008 [8]. Oczywiście, z uwagi na specyfikę rolnictwa ekologicznego jest ich znacznie mniej niż w rolnictwie konwencjonalnym.

Do niedawna w Polsce możliwe było stosowanie w rolnictwie ekologicznym, tylko i wyłącznie, tych dopuszczonych dla ochrony upraw ekologicznych przez Unię Europejską substancji aktywnych, które wchodzą w skład zarejestrowanych w Polsce ś.o.r. [11]. W roku 2009 polskie przepisy uległy zmianie [12]. Zgodnie z wymaganiami unijnymi przedstawionymi w art. 16 Rozporządzenia 834/2007 [9] w rolnictwie ekologicznym można stosować produkty i substancje niezakwalifikowane do stosowania w rolnictwie ekologicznym pod warunkiem przestrzegania celów i zasad rolnictwa ekologicznego. W Polsce brak jest na razie rozporządzeń wykonawczych uściślających te przepisy. Warto podkreślić, że konsekwencje zastosowania nieodpowiednich preparatów mogą być bardzo poważne. W interesie rolników byłoby zatem jak najszybsze stworzenie krajowych wytycznych w tym zakresie.

Do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Polsce zakwalifikowano obecnie 15 substancji aktywnych ś.o.r.: 9 służących do ochrony przed chorobami, 3 służące ochronie przed szkodnikami, 1 – miazga czosnkowa stosowana zarówno w zwalczaniu chorób jak i szkodników oraz 2 stosowane w ochronie przed innymi organizmami

szkodliwymi. Ze względu na brak firm, które zdecydowałyby się pokryć koszty badań i oceny niektórych z tych substancji aktywnych zostaną one w najbliższych latach wycofane ze stosowania w ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej. Po ich wycofaniu pozostanie 9 substancji aktywnych dopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym obecnych w środkach ochrony roślin zarejestrowanych w Polsce.

W ciekawej sytuacji prawnej jest olej z pomarańczy używany w ochronie przed chorobami. Wydano już decyzje dotyczącą wycofania tej substancji aktywnej ze stosowania w ochronie roślin. Jednak ostatnio jej producent dostarczył wymagane dokumenty i ocena tej substancji aktywnej została podjęta na nowo. Istnieje zatem możliwość, że decyzja o wycofaniu zostanie w tym przypadku zmieniona. Warto również zauważyć, że mimo iż miazga czosnkowa została wycofana ze stosowania w Unii Europejskiej, to wyciąg z czosnku (który formalnie stanowi inną substancję aktywną) może być nadal stosowany.

**Tabela 2.** Substancje aktywne wchodzące w skład środków ochrony roślin zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Polsce

Rodzaj substancji	Substancje aktywne włączone do Załącznika I Dyrektywy 91/414 EWG	Substancje aktywne nie włączone do Załącznika I Dyrektywy 91/414 EWG
Fungicydy/ Bakteriocydy	<i>Coniothyrium minitans</i> , miedź, , <i>Pythium oligandrum</i> , siarka, wyciąg z czosnku	chitozan, miazga czosnkowa, ekstrakt z grejpfruta, wyciąg z suszu ziół, olej z pomarańczy
Insektycydy/ Akarycydy	Cydia pomonella Granulosis Vi- rus, olej parafinowy CAS 8042-47-5, spinosad	miazga czosnkowa
Inne	piasek kwarcowy	wyciąg z tkanek roślin

Źródło: opracowanie własne na podstawie wykazu środków ochrony roślin zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Polsce Instytutu Ochrony Roślin-PIB «<http://www.ior.poznan.pl/index.php?strona=19>».

## Dyskusja

Dane przedstawione powyżej wyraźnie wskazują na fakt, iż liczba substancji aktywnych stosowanych w ochronie roślin w Polsce, zarówno w rolnictwie konwencjonalnym jak i ekologicznym w analizowanym okresie znacznie się zmniejszyła. Powodem, i w jednym i w drugim przypadku, był przegląd substancji aktywnych przeprowadzony przez Komisję Europejską, którego celem było wyeliminowanie ze stosowania substancji potencjalnie niebezpiecznych, a którego nieplanowanym skutkiem było wycofanie ze stosowania również substancji aktywnych stosowanych w niewielkich ilościach, w przypadku których koszty przeglądu były wyższe niż przewidywane zyski ze sprzedaży.

W wyniku przeglądu liczba substancji aktywnych ś.o.r. stosowanych w rolnictwie konwencjonalnym w Unii Europejskiej zmniejszyła się o ponad 700. Jednakże

w ostatnich latach wprowadzono do stosowania kilkadziesiąt nowych substancji aktywnych: nowocześniejszych, bezpieczniejszych i o nowych mechanizmach działania. Zatem ogólna liczba substancji aktywnych dopuszczonych do stosowania w ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej wynosi obecnie 340, w tym 108 herbicydów, 87 fungicydów, 64 insektycydy i 81 innych (miedzy innymi: atraktanty, repelenty, regulatory wzrostu, rodentycydy) [3]. Wszystkie te substancje mogą być stosowane w ochronie upraw w Polsce, jednak warunkiem jest wykonanie badań skuteczności i przeprowadzenie procesu rejestracji środka ochrony roślin zawierającego daną substancję.

W Polsce liczba używanych w rolnictwie konwencjonalnym substancji aktywnych (po uwzględnieniu nowo wprowadzonych do stosowania) zmniejszyła się o 39. Analiza skutków malejącej liczby substancji aktywnych nie jest prosta. Można jednak wymienić co najmniej następujące konsekwencje:

1. Wycofanie substancji które mogłyby negatywnie wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt bądź na środowisko naturalne prawdopodobnie przyczyni się do poprawy stanu środowiska naturalnego w przyszłości.
2. Zmniejszanie liczby substancji aktywnych powoduje zmiany na liście ś.o.r. Środki stosowane od lat i znane rolnikom są wycofywane. Rolnicy potrzebują doradztwa w kwestii możliwości ich zastąpienia.
3. Zmniejszanie liczby substancji aktywnych ogranicza możliwość ich przemienego stosowania celem zapobiegania odporności. Problem trudności w zapobieganiu powstawania odporności w różnym stopniu dotyczy różnych zastosowań. Należy wyraźnie stwierdzić, że obecnie nie występują problemy w tworzeniu programów ochrony większości roślin wielkoobszarowych [7], w tym uwzględniających strategię zapobiegania odporności. Już obecnie istnieją jednak problemy z ochroną roślin małoobszarowych (patrz pkt 4).
4. Problemy z ochroną roślin małoobszarowych. Do tej grupy należy m.in. większość warzyw, owoce i zioła. Uprawa tej grupy roślin jest bardzo ważna dla Polski ponieważ są one uprawiane w tysiącach niewielkich gospodarstwach i stanowią podstawę utrzymania wielu rodzin. Środki wycofywane, rejestrowane przed laty na podstawie dawnych przepisów uwzględniały w etykietach rośliny małoobszarowe, podczas gdy nowe – najczęściej nie. Przyczyną jest wysoki koszt badań, które, należy wykonać dla każdej uprawy wpisywanej do etykiety. Ze względu na koszty rejestracja niektórych zastosowań jest nieopłacalna dla producentów środków. Niektóre rośliny małoobszarowe są już obecnie pozbawione jakiegokolwiek chemicznej ochrony. Sytuacja ta może negatywnie wpłynąć na produkcję niektórych roślin, a także spowodować problemy socjalne.
5. Wzrost cen ś.o.r. Zdaniem autorek istnieją tutaj trzy główne przyczyny. Pierwsza wynika z zasad działania wolnego rynku: spadek liczby zarejestrowanych środków powoduje zmniejszenie konkurencji na rynku i w sytuacji kiedy rolnicy nie mają wyboru umożliwia producentom podnoszenie cen. Druga: producenci po-

nieśli dodatkowe koszty związane z oceną substancji aktywnych. Koszty te (podobnie jak koszty produkcji, transportu czy magazynowania) biorą pod uwagę przy ustalaniu ceny detalicznej *ś.o.r.*, zatem mogą one wpłynąć na (niewielkie!) podwyższenie cen preparatów, które są od lat na rynku. Trzecia: W sytuacji kiedy wycofane substancje aktywne są zastępowane nowymi substancjami producenci ustalając cenę detaliczną nowego środka biorą pod uwagę koszty poniesione na badania nowej substancji aktywnej przed jej wprowadzeniem na rynek. Warto podkreślić, że są one bardzo wysokie. Ceny preparatów zawierających nowe substancje aktywne są zatem z reguły wyższe niż tych stosowanych od lat.

Wycofywanie środków zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym z pewnością zostanie negatywnie odebrane przez rolników ponieważ zmniejszy i tak już stosunkowo wąską listę środków zakwalifikowanych do ochrony upraw ekologicznych w Polsce. Trudno jednak już obecnie mówić o konsekwencjach z co najmniej dwóch powodów:

1. Rolnictwo ekologiczne w znacznie mniejszym stopniu niż konwencjonalne wymaga stosowania *ś.o.r.*, ponieważ gatunki i odmiany dobiera się tutaj nie pod kątem maksymalnego plonowania, ale w dużym stopniu odporności na organizmy szkodliwe. Ponadto przez ochronę naturalnych wrogów i stosowanie płodozmianu oraz odpowiednich technik uprawy, często bardziej pracochłonnym niż w rolnictwie konwencjonalnym, zapobiega się szkodom wyrządzanym przez szkodniki, choroby i chwasty.
2. Obowiązujące obecnie w Unii Europejskiej prawo daje możliwość stosowania w rolnictwie ekologicznym produktów i substancji niezakwalifikowanych przez upoważnione instytucje, pod warunkiem przestrzegania celów i zasad rolnictwa ekologicznego. W Polsce brak jest na razie rozporządzeń wykonawczych uściślających te przepisy. Warto jednak podkreślić, że jednostki certyfikujące powinny czuwać nad stosowaniem ich z dużą rozwagą i ostrożnością. W przypadkach wątpliwych powinny występować do jednostek administracji państwowej (np. Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi) o wydanie odpowiednich wytycznych lub też na opracowanie stosownych aktów prawnych. Dla przykładu niektóre produkty żywnościowe można wykorzystać w ochronie roślin, np. oleje jadalne można stosować w ochronie przed szkodnikami. Przed oficjalnym zaleceniem rolnikom stosowania konkretnego oleju jadalnego w tym celu, dla zachowania pełnej zgodności z obowiązującym prawem, jednostka certyfikująca powinna wystąpić do Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi o wydanie stosownej interpretacji. Warto podkreślić, że w kilku przypadkach Ministerstwo Rolnictwa wydało orzeczenie, że dany produkt nie jest środkiem ochrony roślin i w konsekwencji nie podlega rejestracji.

## Wnioski

Na podstawie przedstawionych danych można stwierdzić, że liczba substancji aktywnych stosowanych w ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej bardzo znacznie się zmniejszyła (z ponad 1000 do 340). W Polsce wpływa to na wycofywanie ze stosowania licznych ś.o.r. zarówno w rolnictwie konwencjonalnym, jak i ekologicznym.

Wycofanie substancji potencjalnie niebezpiecznych najprawdopodobniej przyczyni się do poprawy stanu środowiska naturalnego, należy jednak podkreślić, że wystąpią również skutki negatywne. Za najpoważniejsze w warunkach polskich uznano wzrost zagrożenia wykształceniem przez organizmy szkodliwe odporności na stosowane środki i problemy licznych producentów roślin małoobszarowych.

Ze względu na brak przepisów wykonawczych do nowych aktów prawnych, a także wynikające z zasad rolnictwa ekologicznego sporadyczne stosowanie ś.o.r. trudno przewidzieć skutki ograniczenia i tak już wąskiej listy środków zakwalifikowanych do stosowania w rolnictwie ekologicznym.

## Literatura

- [1] Dyrektywa Rady 91/414/EEC z 15 lipca 1991 r. dotycząca wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin (Official Journal L 230, 19/08/1991 P. 0001 0032)
- [2] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z 21 października 2009 roku ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (Dz. U. UE 24.11.2009 L 309/71).
- [3] EU Pesticides Database, 2009  
«[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection)»
- [4] Instytut Ochrony Roslin – Państwowy Instytut Badawczy, 2009  
«<http://www.iior.poznan.pl/index.php?strona=19>»
- [5] Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2009  
«<http://www.bip.minrol.gov.pl/DesktopDefault.aspx?TabOrgId=647&LangId=0>» (data dostępu 30.03.2009)
- [6] Matyjaszyk E. 2007. Stan aktualny dopuszczania środków ochrony roślin do stosowania w rolnictwie konwencjonalnym i ekologicznym w Polsce. Instytut Ochrony Roślin: 338 ss.
- [7] Matyjaszyk E. 2009. Konsekwencje zmian na liście środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania w Polsce dla wybranych roślin uprawnych. *Progress in Plant Protection* 49(2): 492–499.
- [8] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych w odniesieniu do produkcji ekologicznej, znakowania i kontroli (Dz. U. UE 18.09.2008 L 250/1)
- [9] Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych, uchylające rozporządzenie (EWG) nr 2092/91 (Dz. Urz. UE.L 2007 Nr 189, poz. 1, ze zm.).
- [10] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzenia do obrotu środków ochrony roślin i uchylające Dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz. U. UE 24.11.2009 L 309/1).
- [11] Ustawa o rolnictwie ekologicznym z dnia 20 kwietnia 2004 Dz. U. nr 93 z 2004 r., poz. 897 i 898.
- [12] Ustawa o rolnictwie ekologicznym z dnia 25 czerwca 2009 r. (Dz. U. nr 116 z 2009 r., poz 975)



---

## **Active substances applied in protection of organic and conventional crops in the light of current regulations**

**Keywords:** active substance, plant protection products, availability, Poland

### **Summary**

The availability of active substances used in plant protection in conventional and organic farming in Poland was analyzed. It was found that as a result of the review of active substances, carried out in the European Union, the number of available active substances has significantly decreased. This resulted in withdrawal of numerous plant protection products from use as well in organic as in conventional agriculture.

The positive result of withdrawals of potentially dangerous substances is predictable improvement of natural environment condition. The results which were regarded under Polish conditions as the most negative for conventional agriculture are: probability of increased resistance in harmful organisms and the problems with small-acreage crops protection.

It was found that the effects of shrinking of the already narrow list of plant protection products qualified for use in organic farming are difficult to predict.



## Grzyb *Cladobotryum dendroides* i jego wpływ na uprawę pieczarki

**Joanna Szumigaj-Tarnowska, Czesław Ślusarski**  
Instytut Warzywnictwa im. E. Chroboczka w Skierniewicach  
Samodzielna Pracownia Grzybów Uprawnych  
ul. Rybickiego 15/17, 96-100 Skierniewice  
e-mail: joanna.szumigaj@iwarz.pl

**Słowa kluczowe:** pieczarka dwuzarodnikowa, *Agaricus bisporus*,  
*Cladobotryum dendroides*, daktylium

### Wstęp

Pieczarka dwuzarodnikowa *Agaricus bisporus* LANGE (IMBACH) jest powszechnie uprawianym grzybem jadalnym na całym świecie. Polska jest w czołówce producentów tych grzybów, zarówno w Europie, jak i na świecie. Produkcja pieczarki w kraju dynamicznie wzrasta, o czym świadczy poziom eksportu – blisko 150 tys. ton w roku 2009. Największymi odbiorcami polskich pieczarek są: Holandia, Niemcy i Rosja.

Nowe zaawansowane technologie uprawy pieczarki nie chronią przed występowaniem chorób grzybowych i bakteryjnych. Jedną z ważniejszych gospodarczo chorób pochodzenia grzybowego pieczarki jest daktylium, którą wywołuje grzyb *Cladobotryum dendroides* (BULL.) W. GAMS et HOOZE. (dawna nazwa *Dactylium dendroides*) ze stadium doskonałym – *Hypomyces rosellus* (ALB. et SCHW.) TUL. et C. TUL. [23, 28, 33, 41, 61]. Patogen ten jest rozpowszechniony w przyrodzie. Oprócz pieczarki dwuzarodnikowej, poraża także pieczarkę *Agaricus blazei* MURRILL ss. Heinemann [4] oraz wiele gatunków wielkoowocnikowych podstawczaków *Macromycetes*, m.in. opieńkę miodową *Armillaria mellea* (VAHL.: FR.) P. KARST. ss. lato. [59, 60] czy bocznika ostrogowatego *Pleurotus ostreatus* (JACQ.: FR.) P. KUMM. [70].

Wystąpienie grzyba z rodzaju *Cladobotryum* na owocnikach pieczarki jest związane ze znacznym zredukowaniem plonu, a nawet jego całkowitą utratą. Często wiąże się z koniecznością przerwania uprawy już po drugim rzucie pieczarek [20, 45].

## Zarys historyczny choroby

Po raz pierwszy choroba daktylium została opisana w Stanach Zjednoczonych w latach 1936–1937 przez Sindena [64], a w Europie w 1939 przez Flachs [22]. W latach sześćdziesiątych daktylium stanowiło problem w Niemczech, zwłaszcza na terenie byłej NRD. Do roku 1980 niszczące działanie *Cladobotryum* spp. na pieczarkę było stosunkowo rzadko spotykane w pieczarkarniach i było łatwo eliminowane po użyciu różnych fungicydów. Występowanie choroby często wiązano z warunkami meteorologicznymi, gdyż pojawiała się głównie w okresie ciepłych i wilgotnych pór roku. Ponadto choroba występowała głównie w uprawach prowadzonych w niewielkich pomieszczeniach [25, 26]. Największe problemy z daktylium rozpoczęły się na początku lat 90. XX wieku w Europie i Australii, kiedy urosły do rangi epidemii [19, 24, 29, 55]. Z badań Potočnik i in. wynika, że daktylium pojawia się w pieczarkarniach 2–3-krotnie częściej niż sucha czy biała zgnilizna [54]. Istnieją także doniesienia o występowaniu choroby w wielu krajach azjatyckich [5, 39, 49, 69].

Główną przyczyną tego zjawiska był wzrost odporności na powszechnie stosowane, przeciwko daktylium, fungicydy benzimidazolowe [8, 31]. W 2000 roku, w kilku zakładach pieczarkarskich stanu Pensylwania, zidentyfikowano szczep *C. dendroides* Typ II, odporny na te związki [7, 27]. Zainfekowanie uprawy przez ten izolat wywołuje straty plonu rzędu 45–72% [9].

W Polsce charakterystykę daktylium przedstawił po II wojnie światowej m.in. Bukowski [12]. Po wprowadzeniu fungicydu o nazwie Sporgon 50 WP (prochloraz-Mn) czasowo choroba przestała być groźna. Niemniej obecnie istnieją zakłady, w których występuje ona w każdym cyklu uprawowym. Zgodnie z danymi producentów straty, jakie wywołuje, można określić na 15–30%, a często prowadzi do całkowitej utraty plonu po II rzucie [20, 45]. Nie jest dotychczas jasne, czy nasilenie się występowania choroby związane jest z pierwotnym zainfekowaniem okrywy, zwiększoną wirulencją patogena, odpornością na fungicydy, niedostateczną higieną w pieczarkarni, czy też może wynika ze współdziałania wszystkich wymienionych czynników [18, 26, 30].

## Charakterystyka gatunku *Cladobotryum dendroides*

Rodzaj *Cladobotryum* w literaturze mikologicznej pojawił się już na początku XIX wieku [50, 51], natomiast w latach 70. XX w. określono jego formę płciową [65]. W środowisku naturalnym spotyka się także inne gatunki tego grzyba, tj. *Cladobotryum mycophilum* (OUDEM.) W. GAMS et HOOZE. (stadium doskonałe – *Hypomyces odoratus* G.R.W. ARNOLD) i *Cladobotryum varium* NEES (stadium doskonałe – *Hypomyces auriantus* PLOWR.). Wymienione gatunki również mogą być przyczyną daktylium, powodując podobne objawy chorobowe jak *C. dendroides*, jednak w przypadku *C. varium* nie obserwuje się charakterystycznego różowego zabarwienia kolonii [19, 47].

Gatunkami odpowiedzialnymi za wywołanie daktylium są głównie *C. dendroides*, *C. mycophilum* i *C. mycophilum* Typ II [6, 19, 30, 42].

*C. dendroides*, należący do workowców, wytwarza trzy typy zarodników: duże, jajowate, 1–4-komórkowe konidia o wymiarach  $24\text{--}28 \times 7\text{--}10 \mu\text{m}$ , grubościennie chlamydospory (przetrwalniki) oraz zarodniki workowe, powstające w rubinowo-czerwonych perytecjach. Najczęściej powstają zarodniki konidialne, które rosną na końcach rozgałęzionych konidioforów. Konidiofory mają nieregularne zakończenia, gdyż po utworzeniu zarodnika rosną dalej [30]. Zarodniki workowe są wrzecionowate, dwu-, trzy- lub czterokomórkowe, pokryte ciemnymi, krótkimi wyrostkami. Należy zaznaczyć, że zarodniki workowe oraz chlamydospory są odporniejsze na wysokie temperatury oraz obniżoną wilgotność powietrza niż zarodniki konidialne [26, 29]. Grzyb może rozwijać się w szerokim zakresie temperatur, tj.  $10\text{--}33^\circ\text{C}$ , i pH, tj. 3,0–8,0. Optymalną temperaturą rozwoju dla tego gatunku jest  $25^\circ\text{C}$  przy pH 6,5 [9, 14, 15, 16]. Wykazano również, że *C. dendroides* rozwija się normalnie w temperaturze  $33^\circ\text{C}$ , w  $36^\circ\text{C}$  tempo rozwoju grzybni zmniejsza się, natomiast w  $40^\circ\text{C}$  wzrost nie następuje. Grzybnia patogena ginie po godzinie przetrzymywania w  $60^\circ\text{C}$ , natomiast konidia giną już po 30 minutach przybywania w temperaturze  $46\text{--}50^\circ\text{C}$  [13, 61, 67]. Dar i Seth [13] badali wrażliwość grzybni i zarodników na temperaturę w stanie suchym i uwodnionym. W zawiesinie wodnej poddanej działaniu temperatury  $39^\circ\text{C}$  przez 60–120 min i w  $36\text{--}39^\circ\text{C}$  przez 20–360 min kiełkowanie zarodników zostało ograniczone w porównaniu z próbą kontrolną. Temperatura letalna dla suchych zarodników była wyższa niż dla konidiów w zawiesinie, gdyż te pierwsze kiełkowały po przetrzymywaniu ich w  $100^\circ\text{C}$  przez 30 min; dopiero dalszy wzrost temperatury i czasu jej działania powodował całkowite zahamowanie kiełkowania [13]. Porównując wrażliwość zarodników konidialnych i workowych wykazano, iż w stanie suchym przez ok. 50 dni przetrwa blisko 50% zarodników konidialnych, natomiast aż 80% zarodników workowych. Przy wysokiej wilgotności zarodniki konidialne zachowują 100% przeżywalność przez 7 dni, natomiast workowe aż przez 4 miesiące [19].

Kolonie *C. dendroides* przyrastają w tempie 7–12 mm na dobę, tworząc duże, początkowo białe, watowate, pozbawione zapachu kolonie o luźnej strukturze. Grzyb zarodnikuje już po 4 dniach, co objawia się zmianą koloru kolonii na kremową. Po 8–10 dniach, gdy grzyb wytwarza rubinowoczerwone perytecja, kolonie stają się początkowo różowe, a następnie czerwone [32, 42, 55].

Drugi gatunek patogenicznego grzyba z rodzaju *Cladobotryum* atakującego pieczarkę to *C. mycophilum*. Wytwarza on duże, septowane, najczęściej dwukomórkowe konidia. Trzonek konidialny ma regularne zakończenie. Kolonie tego gatunku rosną równie szybko jak poprzedni gatunek, tj. 13–16 mm na dobę. Różnica między tymi gatunkami polega na wytwarzaniu przez *C. mycophilum* wyczuwalnego zapachu kamfory [30].

W uprawie pieczarki liczy się jeszcze jeden szczep, który ma cechy, zarówno *C. dendroides*, jak i *C. mycophilum*. Konidia tego gatunku są bowiem 3–4-komórkowe, natomiast trzonki konidialne są proste i regularnie zakończone. Kolonie tego grzyba rosną szybciej, bo ok. 18–22 mm na dobę i nie wytwarzają zapachu. Cechą, która znacząco wyróżnia ten szczep, jest odporność na benzymidazol, której nie mają grzyby wcześniej izolowane [30]. Grogan i Gaze [34] badali odporność tego szczepu na fungicydy benzymidazolowe i ostatecznie określono go jako *C. dendroides* Typ II. Mimo że grupa ta była genetycznie podobna do *C. mycophilum*, badania Grogan [30] wykazały, że morfologicznie izolat ten był bardziej podobny do *C. dendroides* (3–4 komórkowe konidia i brak zapachu kamfory). Z uwagi na podobieństwo genetyczne do *C. mycophilum* trzeci patogen określono jako *C. mycophilum* Typ II.

McKay i in. w 1998 roku [46] wykazali, że odporność grzybów *Cladobotryum* spp. na fungicydy benzymidazolowe wynika z mutacji 50 kodonu  $\beta$ -tubuliny polegającej na podstawieniu grupy aminowej z tyrozyny do cysteiny [46]. McKay i in. [47] badali ponadto podobieństwo filogenetyczne 43 izolatów *Cladobotryum* (m.in. *C. dendroides*, *C. mycophilum*, *C. varium* i *C. asterophorum* de HOOG). Analiza genetyczna wymienionych gatunków *Cladobotryum* spp. wykazała, że najbardziej powszechnym patogenem pieczarki jest *C. mycophilum* (36 izolatów). Sekwencja regionu ITS ujawniła podział tych patogenów na trzy podgrupy, tj. dwie, które stanowiły izolaty wrażliwe na benzymidazol (izolaty z Irlandii, Wielkiej Brytanii, Australii, Kanady i USA) i jedną, która była odporna na ten fungicyd (z Irlandii i Wielkiej Brytanii). Analiza RAPD grzybów odpornych na benzymidazol wykazała, że były one podobne, natomiast izolaty wrażliwe były bardziej zróżnicowane. Wykazano, że grupa *C. mycophilum* różni się znacząco od pozostałych grup, chociaż wcześniejsze doniesienia wskazywały na podobieństwo między *C. mycophilum* i *C. varium* [47].

W literaturze dotyczącej grzybów z rodzaju *Cladobotryum* spotyka się informacje na temat możliwości biosyntezy oksydazy galaktozowej przez te szczepy [40, 44, 48]. Enzym ten należy do oksydoreduktaz i uczestniczy w reakcji utleniania D-galaktozy do pochodnych aldehydowych przy udziale tlenu, który jest redukowany do nadtlenu wodoru [63].

Gatunek *C. dendroides* wytwarza związki toksyczne, jakimi są mikotoksyny [43, 53]. Szczepy patogeniczne dla pieczarki mogą być zdolne do syntezy trichotecen, tj. deoksyniwalenolu (DON), 3-acetylodeksyniwalenolu (ADON) oraz zearalenonu. Trichoteceny stanowią najliczniejszą grupę mikotoksyn, obejmującą ponad 180 naturalnie występujących związków, a deoksyniwalenol (DON, womitoksyna) z racji powszechnego występowania i toksyczności jest uważany za najważniejszą toksynę grzybową. Działanie toksyczne mikotoksyny DON na poziomie komórkowym, przejawia się w hamowaniu biosyntezy białka, redukcji aktywności enzymów, zaburzeniach w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych, zaburzeniach w podziałach komórkowych oraz zaburzeniach w przebiegu cyklu komórkowego. Może również indukować zamieranie komórek na drodze nekrozy i apoptozy. Drugą ważną miko-

toksyną wytwarzaną przez *Cladobotryum* spp. jest zearalenon (ZEA) o bardzo silnym działaniu hormonalnym, głównie w stosunku do zwierząt [43, 53].

Doniesienia o możliwości syntetyzowania przez szczepy *C. dendroides* związków typowych dla grzybów rodzaju *Fusarium* sprawiły, że pojawiły się propozycje przeniesienia gatunków z rodzaju *Cladobotryum* do rodzaju *Fusarium* [43, 52].

Badania składu pieczarek z upraw porażonych daktylium są więc ważne z punktu widzenia zarówno jakości, jak i wartości odżywczych. Badania zmian składu pieczarek pod wpływem daktylium prowadził Dar [17], który wykazał, że takie grzyby zawierały więcej wody, kwasu askorbinowego i błonnika. Porażone owocniki charakteryzowały się niższą zawartością węglowodanów, białka i tłuszczów niż zdrowa pieczarka [17].

## Objawy chorobowe i warunki rozwoju daktylium

Pieczarka może zostać zaatakowana w każdej fazie rozwoju. Bardzo ważne jest wczesne wykrycie porażenia, gdyż cechą grzybów z rodzaju *Cladobotryum* jest krótki czas inkubacji [2, 10, 14, 16]. Badania wykazują, że czas ten wynosi 10–15 dni, w zależności od ilości inoculum. Im wcześniej nastąpi zakażenie, tym silniej odbija się na wyglądzie pieczarek i bardziej obniża plon [1, 9, 15, 55].

Rozwój grzyba *Cladobotryum* sp. w uprawie pieczarki objawia się tworzeniem na okrywie początkowo białej, watowatej grzybni. Po 8 dniach od zakażenia na okrywie pojawia się mała kolonia (10–20 mm), która w miarę wzrostu zmienia barwę na różową, a później fioletową [1, 19, 55]. W pełni rozwinięta grzybnia oplata pieczarki, tworząc pajęczynowaty nalot, a porażone owocniki żółkną, więdną i gniją [19, 33]. Dar i Seth [15] wykazali, że nasilenie objawów choroby zależy od terminu porażenia okrywy, jak i od jej rodzaju. Zmiana materiału wykorzystywanego do jej produkcji również może mieć wpływ na pojawienie się choroby. Doniesienia literaturowe wskazują, że ciężka okrywa sprzyja szybszemu rozwojowi choroby, natomiast niskie pH okrywy wpływa na zahamowanie infekcji. Rozwój choroby jest ponadto związany z wilgotnością okrywy i szybkością parowania. Wyższa wilgotność okrywy i mniejsza intensywność parowania sprzyja rozwojowi choroby [10, 14]. Tempo szerzenia się choroby w dużym stopniu zależy też od warunków panujących w hali uprawowej, tj. temperatury i wilgotności powietrza [37].

Kolonie grzyba powodującego daktylium mogą pojawić się na okrywie już przed pierwszym rzutem pieczarek. Są wtedy widoczne jako żółtobrazowe lub szarobiałe niewielkie plamy, które szybko powiększają się i gęstnieją. Plamy na owocnikach może wywołać już niewielka liczba konidiów patogena, kiedy osiadą na wykształconych owocnikach [18, 19]. Pojawienie się daktylium w pierwszym rzucie, skutkuje porażeniem 20% owocników (wystąpienie m.in. plam), natomiast w kolejnym rzucie obserwuje się porażenie uprawy blisko w 100% [1]. Rozwój choroby może się rozpocząć od pozostawionych po zbiorze resztek owocników pieczarki, gdyż plekten-

chyma pieczarki stanowi doskonałą pożywkę dla *Cladobotryum* spp. W przeciwieństwie do białej i suchej zgnilizny grzyb ten łatwo przerasta okrywę i tworzy kolonie na jej powierzchni [29, 41, 42]. Porażenie zawiązków i małych owocników najczęściej skutkuje całkowitym porażeniem uprawy [9, 26, 36, 38].

Jandaik i Guleria [37] wykazali, że *C. dendroides* osiąga najszybszy wzrost (7,0–8,0 mm na dzień) w temperaturze 25°C i wilgotności równej 90%, podczas gdy najwięcej konidiów ( $1,2 \cdot 10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$ ) tworzy się w temperaturze 25°C przy pH 6,0 i wilgotności 95%. Wraz ze zmniejszaniem wilgotności zarodnikowanie patogena spada, co należy uwzględnić w działaniach zapobiegających rozprzestrzenianiu się choroby w hali [19].

Wpływ liczby zarodników *Cladobotryum* spp. na rozwój daktylium badano wielokrotnie [1, 2, 36, 37]. W wyniku porażenia uprawy zarodnikami patogena, pierwsze objawy daktylium obserwuje się po 12–15 dniach przy wysokim stężeniu zarodników wynoszącym  $1,0 \cdot 10^8 \cdot \text{m}^{-2}$ , przy temperaturze podłoża 20–23°C i wilgotności 65% [36]. Ponadto, większe straty uprawowe (bo aż 76%) występują, gdy infekcji ulega okrywa, niż w przypadku zainfekowania kompostu, kiedy straty wynoszą 61%. Jest to wynikiem lepszego przerastania okrywy przez *C. dendroides* w porównaniu do szybkości przerastania podłoża [9].

## Źródła infekcji

Naturalnym siedliskiem grzybów strzępkowych, w tym chorobotwórczych, jest gleba i substraty organiczne. Dlatego często nieodpowiednio pasteryzowane podłoże lub źle odkażona i przygotowana okrywa są częstym źródłem zakażenia [16, 20, 26]. Konidia *Cladobotryum* spp. są z łatwością przenoszone z ruchem powietrza na duże odległości. Najczęściej przyczyną rozsiewania zarodników są stałe czynności wykonywane podczas uprawy (podlewanie, zbiór oraz np. pokrywanie ognisk chorobowych bezpośrednio solą) [1, 2, 19]. Wykazano, że najwyższe stężenie konidiów w hali uprawowej odnotowuje się po godzinie od podlewania. W wyniku traktowania skupisk daktylium solą, konidia rozprzestrzeniają się na odległość ponad 0,5 metra. Owady, ludzie (pracownicy zakładu) i sprzęt używany w pieczarkarni są również źródłem zakażenia. Ponadto woda ściekająca z zakażonych skrzyń uprawowych może przenosić materiał infekcyjny [1, 2]. Badania wykazały, że konidia *Cladobotryum* spp. przenoszone są na duże odległości przez muchówki oraz z nieodkażonymi pojemnikami do zbioru [1, 2, 18, 32]. Wentylatory pracujące w hali bardzo ułatwiają rozprzestrzenianie zarodników patogena, jednak ich wyłączenie nie oznacza całkowitej ochrony przed chorobą. Natomiast wyłączenie wentylatorów jest wskazane, gdy usuwamy ogniska chorobowe, gdyż wtedy liczba rozsiewanych zarodników *Cladobotryum* spp. może się zmniejszyć aż o 75% [2].



## Zwalczanie

Kluczową rolę w zwalczaniu daktylium odgrywa wczesne wykrycie i odpowiednie postępowanie z rozwijającym się ogniskiem porażenia. Dobre oświetlenie pozwala na szybkie wykrycie kolonii patogena. Już w chwili zauważenia pierwszych objawów, producent musi natychmiast podjąć działania w celu zahamowania rozprzestrzeniania się choroby. Opóźnienie zwalczania patogena choćby o jeden dzień, może spowodować duże straty plonu [20, 29, 32].

Producenci pieczarek porażone miejsca traktują w różny sposób: pokrywają je wilgotną serwetką papierową zanurzoną w środku dezynfekcyjnym, a potem posypują solą kuchenną, stosują tylko solenie, nakrywają płamę kubkiem plastikowym, który następnie wciskają w okrywę i obsypują solą [20]. Wykazano, że podlewanie, zbiór i nieumiejętne usuwanie kolonii daktylium ułatwia rozprzestrzenianie się zarodników. Z tego względu kolonie te nakrywa się najpierw materiałem papierowym nasączonym dezynfektantem, a następnie pokrywa solą kuchenną. Samo posypywanie solą miejsc porażonych nie jest wskazane, gdyż wręcz sprzyja rozsiewaniu się zarodników [1, 2].

W wyniku epidemicznego wystąpienia *C. dendroides* i *C. mycophilum* w Wielkiej Brytanii w latach 1994–1995, Adie i Grogan [1] oraz Adie i in. [2] badali rozprzestrzenianie się konidiów *Cladobotryum* spp. Doświadczenia polegały na sztucznym infekowaniu uprawy pieczarki i oznaczaniu ilości konidiów po standardowych zabiegach uprawowych. Liczebność zarodników badano przed zabiegiem (np. przed podlewaniem) i po jego przeprowadzeniu. Zarodniki w wyniku poruszenia kolonii, unosiły się do góry i osiadały w nowych miejscach. Po upływie godziny po pokryciu solą kolonii o całkowitej powierzchni  $0,55 \text{ m}^2$ , najwyższe stężenie konidiów w powietrzu wynosiło  $2,5 \cdot 10^4 \cdot \text{m}^{-3}$ . Wykazano, że ponad 90% zarodników osiada na okrywie już w ciągu 15 minut niezależnie czy wentylatory są włączone, czy też nie. W przypadku gdy wentylatory zostały wyłączone, 85% konidiów rozprzestrzeniło się na odległość 0,5 m, a przy włączonym wentylatorze dyspersja zarodników grzyba zachodziła na odległość 3 m [1, 2].

W latach 90. XX wieku *Cladobotryum* spp. było zwalczane różnymi fungicydami, także benzimidazolowymi. Niestety, powszechność stosowania tych środków spowodowała powstanie odporności wśród izolatów *Cladobotryum* spp. [7, 8, 33, 47]. W Anglii stosowano także środek o nazwie Dorado, zawierający pyrifenoks, który całkowicie hamował rozwój *C. dendroides*, jednak ze względu na toksyczność w stosunku do pieczarek został wycofany [35].

Obecnie skutecznym fungicydem przeciwko daktylium jest Sporgon 50 WP, zawierający jako substancję czynną prochloraz z manganem [21, 24, 54, 56, 68]. Dużą skutecznością w zwalczaniu tej choroby charakteryzuje się również chlorotalonil [45, 57].

Grogan i Gaze [34] podjęli badania odporności grzybów *C. mycophilum* i *C. dendroides* Typu I i II, w odniesieniu do fungicydów zawierających tiabendazol, benzy-

midazol i prochloraz-Mn. Badania wykazały, że ok. 70% izolatów charakteryzuje wysoka odporność na tiabendazol ( $ED_{50}$  200  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) i są to wyłącznie izolaty *C. dendroides* Typ II. Izolaty *C. mycophilum*, *C. dendroides* Typ I oraz 4 inne izolaty *C. dendroides* Typ II były mało odporne na ten związek ( $ED_{50}$  1–10  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) [34]. Odporne na tiabendazol izolaty *C. dendroides* Typ II były mało odporne na karbendazym ( $ED_{50}$  w zakresie 2–10  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), a izolaty które wykazywały słabą odporność w stosunku do tiabendazolu były wrażliwe na karbendazym ( $ED_{50}$  1  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Wartość  $ED_{50}$  dla wszystkich izolatów w odniesieniu do prochlorazu-Mn była w zakresie od 0,14 do 7,8  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Odporność na benzimidazol była więc kluczowym czynnikiem wpływającym na epidemiczny rozwój daktylium, gdyż tylko 25% testowanych szczepów było wrażliwych na ten fungicyd [34].

Ponownie odporność szczepów *Cladobotryum* na fungicydy benzimidazolowe oraz prochloraz-Mn potwierdziła Grogan w 2006 roku [31]. W badaniach *in vitro* wykazała, że jeden z badanych szczepów był wrażliwy na benzimidazol. Ponadto karbendazym hamował rozwój choroby efektywniej niż tiabendazol. Drugi izolat był odporny na benzimidazol i również wysoce odporny na tiabendazol, ale wykazał wrażliwość na karbendazym przy średnim i wysokim jego stężeniu. Oba izolaty były wrażliwe na prochloraz-Mn, gdyż związek ten hamował rozwój choroby w około 45–65% [31].

Odporność grzybów *Cladobotryum* na fungicydy benzimidazolowe stanowi duży problem w ich zwalczaniu. McKay i in. [46, 47] podjęli badania genetyczne zmierzające do zbadania tego zjawiska. Analiza sekwencji nukleotydowej  $\beta$  – tubliny izolatów odpornych na benzimidazol ujawniła mutację kodonu 50, która powodowała podstawienie cysteiny w miejsce tyrozyny. Wykorzystanie metody PCR pozwoliło na szybką identyfikację izolatów odpornych i wrażliwych na ten związek.

Badania dotyczące wrażliwości izolatów *C. dendroides* pochodzących z pieczarek w Serbii w stosunku do sześciu fungicydów (prochloraz-Mn, benzimidazol, karbendazym, tiofanat metylowy, cyprokonazol + karbendazym i flusilazol + karbendazym) prowadzili Potočnik i in. [54]. Wykazali oni słabą odporność izolatów na karbendazym i benzimidazol, gdyż stężenie 2,0  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  hamowało wzrost większości izolatów. Wartości  $ED_{50}$  wynosiły 0,14–0,97  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (benzimidazol) oraz 0,29–2,92  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (karbendazym), podczas gdy Grogan i Gaze podali, że  $ED_{50}$  dla karbendazymu jest w zakresie 2–10  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Testowane izolaty wykazały większą odporność na tiofanat metylowy, gdyż stężeniem hamującym rozwój *Cladobotryum* sp. było 55,0  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , a wartości  $ED_{50}$  kształtowały się w zakresie 6,53–12,1  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Wysoką wartość grzybobójczą miały również preparaty zawierające cyprokonazol + karbendazym i flusilazol + karbendazym, jednak najbardziej toksyczny dla badanych izolatów był prochloraz-Mn. Jednakże wykazano, że cyprokonazol + karbendazym i flusilazol + karbendazym były również toksyczne dla grzybni pieczarki. Potočnik i in. [54] zajmowali się także badaniem wrażliwości *Cladobotryum* spp. na iprodion w porównaniu do prochlorazu-Mn i karbendazymu. Wykazali dużą wrażliwość bada-

nych grzybów na iprodion, jednak nie wyższą niż dla prochlorazu-Mn. Badania australijskich badaczy ujawniły także, że najlepszym środkiem zwalczającym daktylium jest prochloraz-Mn, gdyż wśród badanych izolatów pojawiły się odporne na karbendazym i tiabendazol [3].

Ze względu na coraz mniejszą liczbę dostępnych fungicydów przeznaczonych do stosowania w pieczarkarni, na dużą uwagę zasługują preparaty naturalne oparte na wyciągach roślinnych. Potočnik i in. [58] badali skuteczność grzybobójczą środka zawierającego wyciąg z olejku drzewa herbacianego w stosunku do *C. dendroides*. Stwierdzili dużą efektywność badanego preparatu, na możliwość zastąpienia syntetycznych związków chemicznych, substancjami pochodzenia naturalnego.

Według danych literaturowych istnieją szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* antagonistycznych do grzyba *C. dendroides* [11, 66]. Wykazano, że wprowadzenie do uprawy pieczarki, oprócz konidiów patogena, komórek bakterii *P. fluorescens* i *P. putida* przynosi korzystny efekt. Zebrano, odpowiednio, o 292,5 g i 240,0 g · m<sup>-2</sup> powierzchni niż w próbie kontrolnej [66].

## Podsumowanie

Praca przedstawia charakterystykę powszechnej choroby grzybowej pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*), jaką jest daktylium. Czynnikiem biologicznym wywołującym infekcję jest grzyb *Cladobotryum dendroides* (BULL.) W. GAMS et HOOZE. Typowymi objawami daktylium jest pajęczynowaty nalot grzybni patogena na okrywie, który bardzo szybko gęstnieje i pokrywa owocniki pieczarki. W pracy opisano optymalne warunki rozwoju choroby, źródła infekcji, a także sposoby zwalczania i zapobiegania porażeniom. Wskazano na potrzebę przestrzegania higieny w zakładzie, która jest podstawową zasadą pozwalającą efektywnie walczyć z chorobami grzybowymi w pieczarkarni.

## Literatura

- [1] Adie B.T.T., Grogan H.M. 2000. The liberation of cobweb (*Cladobotryum mycophilum*) conidia within a mushroom crop. W: Science and Cultivation of Edible Fungi. Elliott T.J. (red.), Balkema, Rotterdam: 365–372.
- [2] Adie B., Grogan H., Archer S., Mills P. 2006. Temporal and spatial dispersal of *Cladobotryum* conidia in the controlled environment of a mushroom growing room. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7212–7217.
- [3] Allan J., Shah F.A., Khan I. 2008. Establishing a baseline for fungicide sensitivity of the major mushroom pathogens in Australia. W: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi: Mushroom Science XVII. Proceedings of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science Cape Town, South Africa, 20–24 V 2008: 565–569.
- [4] Andrade M.C.N., Kopytowski Filho J., Minhoni M.T.A., Coutinho L.N., Figueiredo M.B. 2007. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. *Brazilian J. Microbiol.* 38: 243–247.
- [5] Asef M.R., Goltapeh E.M. 2002. Identification of fungicolous fungi of Iran. I. *Cladobotryum* species. *Rostaniha* 3: 11–22.

- [6] Back Ch.-G., Kim Y.-H., Jo W.-S., Chung H., Jung H.-Y. 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. *J. Gen. Plant Pathol.* 73 (3): 232–235.
- [7] Beyer D.M., Kremser J.J. 2001. Possible development of fungicide resistance by cobweb diseases on mushrooms. *Phytopathology* 91: S8.
- [8] Beyer D.M., Kremser J.J. 2004. Evaluation of fungicide tolerance and control for three fungal diseases of mushrooms. W: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. Romaine, C.P., Keil, C.B., Rinker, D.L., Royle, D.J. (red.), Penn State University, USA: 421–429.
- [9] Bhatt N. 2003. Cobweb Disease of *Agaricus bisporus*: Incidence, losses and effective management. W: The Fourth International Conference „Mushroom Biology and Mushroom Product”. Cuernavaca, Mexico, 20–23.04.2002.
- [10] Boiko O.A., Mel’nichuk M.D., Ivanova T.V. 2009. Spread, diagnosis and prevention of diseases of the mushroom. *Russian Agricultural Science* 35 (2): 94–95.
- [11] Bora T., Ozaktan H. 2000. Biological control of some important mushroom diseases in Turkey by fluorescent Pseudomonads. W: Science and Cultivation of Edible and Fungi. Griensven L.J.L.D. (red.), Balkema, Rotterdam: 689–694.
- [12] Bukowski T. 1969. Pieczarki. PWRiL, Warszawa: 158–162.
- [13] Dar G.M., Seth P.K. 1992. Determination of thermal sensitivity of *Cladobotryum dendroides* a major pathogen of *Agaricus bisporus* mushroom. *Orissa J. Agricultural Research* 5: 119–121.
- [14] Dar G.M., Seth P.K. 1992. Factors influencing cobweb disease of *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum dendroides*. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 22: 178–181.
- [15] Dar G.M., Seth P.K. 1992. Germination of *Cladobotryum dendroides* spores causing cobweb disease of *Agaricus bisporus*. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 22: 192.
- [16] Dar G.M., Seth P.K. 1992. Some preliminary studies on *Cladobotryum dendroides* causing cobweb disease of cultivated mushroom. *Plant Disease Research* 7: 83–86.
- [17] Dar G.M. 1997. Biochemical changes in *Agaricus bisporus* during infection by *Cladobotryum dendroides*. *Research and Development Reporter* 14: 34–39.
- [18] Dar G.M. 2001. Dispersal studies on cobweb disease of cultivated white button mushroom. *Appl. Biol. Res.* 3: 41–43.
- [19] Desrumaux B. 2004. Cobweb disease: an overview. *Champignonberichten* 222: 3–9.
- [20] Dmowska E., Ignatowicz S., Lewandowski M., Maszkiewicz J., Szymański J., Uliński Z. 2006. Ochrona pieczarki, Hortpress, Warszawa: 68–71.
- [21] Eicker A. 1987. A report on the use of prochloraz-manganese complex for controlling of major fungal pathogens of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in South Africa. *South African Journal of Botany* 53(5): 345–348.
- [22] Flachs K. 1939. *Dactylium dendroides* Bull. als Gelegenheitsparasit an Champignon. *Praktische Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz* 17: 6–12.
- [23] Fletcher J.T. 2002. Cobweb Disease, A New Challenge. *Mushroom News* 50: 20–25.
- [24] Fletcher J.T., Allan J., Seymour G., Godmersham P.S. 2004. Managing cobweb disease in Australia. The 16th International Society of Mushrooms Science Congress, Miami Beach, 14–17.03.2004: 26.
- [25] Fletcher J.T., Hims M.J., Hall R.J. 1983. The control of bubble diseases and cobweb disease of mushrooms with prochloraz. *Plant Pathol.* 32: 123–131.
- [26] Fletecher J.T., White P.F., Gaze R.H. 1989. Mushrooms: Pest and Disease Control. 2nd edition, Intercept, Andover, Hants, England: 58–63.
- [27] Forer L.B., Wuest P.J., Wagner V.R. 1974. Occurrence and economic impact of fungal diseases of mushrooms in Pennsylvania. *Plant Disease Reporter* 58: 987–991.
- [28] Gams W., Hoozemans A.C.M. 1970. *Cladobotryum* – Konidienformen von *Hypomyces* – Arten. *Persoonia* 6: 95–110.
- [29] Gaze R. 1995. *Dactylium* or cobweb. *Mushroom Journal* 546: 23–27.
- [30] Grogan H. 2005. Cobweb confusion – coweb isolates explained. *Mushroom Journal* 660: 21–23.
- [31] Grogan H.M. 2006. Fungicide control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum* strains with different benzimidazole resistance profiles. *Pest Manag. Sci.* 62: 153–56.
- [32] Grogan H.M. 2006. Some key issues for successful control. *Mushroom Journal* 672: 15–22.
- [33] Grogan H., Adie B. 2002. Cobweb disease of mushrooms. *Mushroom Journal* 87: 5–7.
- [34] Grogan H.M., Gaze R.H. 2000. Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104: 357– 364.

- [35] Grogan H.M., Gaze R. 2002. The story of *Dactylium Dorado*. *Mushroom Journal* 627: 36–38.
- [36] Jandaik S., Guleria D.S., Parmar Y.S. 2004. Effect of *Cladobotryum dendroides* on the yield of *Agaricus bisporus*: Inoculum factors and timing of infection. W: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. Romaine C.P., Keil C.B., Rinker D.L., Royle D.J. (red.), Penn State University, USA: 16: 503–505.
- [37] Jandaik S., Guleria D.S. 2004. Influence of cultural parameters on the growth and sporulation of *Cladobotryum dendroides*: the pathogen of cobweb on mushrooms. W: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. Romaine C.P., Keil C.B., Rinker D.L., Royle D.J. (red.), Penn State University, USA: 16: 499–501.
- [38] Jandaik S., Guleria D.S. 2004. Yield loss in *Agaricus bisporus* related to inoculum level, infection stage and inocula types of *Cladobotryum dendroides*. The 16th International Society of Mushrooms Science Congress, 14–17.03.2004, Miami Beach: 31–32.
- [39] Karaca G., Peksen. A. 2001. A study on the cultivation and diseases of mushroom in the Middle Black Sea Region. *Ondokuz Mays Universitesi, Ziraat Fakultesi Dergisi* 16: 14–21.
- [40] Kelleher F.M., Dubbs S.B., Bhavanandan V.P. 1988. Purification of galactose oxidase from *Dactylium dendroides* by affinity chromatography on melibiose-polyacrylamide. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 349–54.
- [41] Khanna P.K., Sodhi H.S., Kapoor S. 2003. Diseases of *Agaricus bisporus* and their management. *Annu. Rev. Plant Pathol.* 2: 163–205.
- [42] Lane C.R., Cooke R.C., Burden J.L. 2000. Ecophysiology of *Dactylium dendroides* – the casual agent of cobweb mould. W: Science and Cultivation of Edible Fungi. Elliott T.J. (red.), Balkema, Rotterdam: 365–372.
- [43] Machado L.C., Kimmelmeier C. 2001. Identification of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone in the galactose oxidase-producing fungus *Dactylium dendroides*. *Mycopathologia* 149 : 79–85.
- [44] Markus Z., Miller G., Avigad G. 1965. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. *Appl. Microbiol.* 13: 686–693.
- [45] Maszkiewicz J. 2001. Efficacy of chlorothalonil fungicide (Gwarant 500 SC) against wet bubble of champignon (*Mycogone perniciosa*), dry bubble of champignon (*Verticillium fungicola*) and dactylum (*Dactylium dendroides*). *Veget. Crops Res. Bull.* 55: 131–135.
- [46] McKay G.J., Egan D., Morris E., Brown A.E. 1998. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR methods. *Mycol. Res.* 102: 671–676.
- [47] McKay G.J., Egan D., Morris E., Scott C., Brown A.E. 1999. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 606–610.
- [48] McPherson M.J., Ogel Z.B., Stevens C., Yadav K.D., Keen J.N., Knowles P.F. 1992. Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. Gene cloning and sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 267: 8146–8152.
- [49] Mohammadi-Goltapeh E., Mohammadzadeh-Pasha E., Alizadeh A. 2000. Cobweb disease of white button mushroom *Agaricus bisporus* in Iran and its management. *Appl. Entomol. Phytopathology* 67: 41.
- [50] Nees von Esenbeck C.G.D. 1816. *Das System der Pilze und Schwämme*. Stahelschen Buchhandlung, Würzburg, Germany: 86.
- [51] Nees von Esenbeck C.G.D. 1817. *Das System der Pilze und Schwämme*. Stahelschen Buchhandlung, Würzburg, Germany: 329.
- [52] Ogel Z.B., Brayford D., McPherson M.J. 1994. Cellulose-triggered sporulation in the galactose oxidase-producing fungus *Cladobotryum (Dactylium) dendroides* NRRL 2903 and its re-identification as a species of *Fusarium*. *Mycol. Res.* 98: 474–480.
- [53] Pereira A.M., Kimmelmeier C. 2000. Productions of mycotoxins by galactose oxidase producing *Fusarium* using different media. *Brazilian J. Microbiol.* 31: 129–134.
- [54] Potočnik I., Milijašević S., Rekanović E., Todorović B., Stepanović M. 2008. Sensitivity of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Cladobotryum* spp. to fungicides in Serbia. Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi: Mushroom Science XVII. Proceedings of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science Cape Town, South Africa, 20–24 V 2008: 615–627.
- [55] Potočnik I., Rekanović E., Milijašević S., Todorović B., Stepanović M. 2008. Morphological and pathogenic characteristic of the fungus *Cladobotryum dendroides*, the casual agent of cobweb disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* in Serbia. *Pestic. Phytomed.* 23: 175–181.
- [56] Potočnik I., Vukojević J., Stajić M., Rekanović E., Milijašević S., Todorović B., Stepanović M. 2009. In vitro toxicity of selected fungicides from the groups of benzimidazoles and demethylation inhibitors to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 44: 365–370.
- [57] Potočnik I., Vukojević J., Stajić M., Rekanović E., Milijašević S., Stepanović M., Todorović B. 2009. Toxicity of fungicides with different modes of action to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 44: 823–827.

- [58] Potočnik I., Vukojević J., Stajić M., Rekanović E., Stepanović M., Milijašević S., Todorović B. 2010. Toxicity of biofungicide Timorex 66 EC to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection* 29: 290–294.
- [59] Raziq F., Fox R.T.V. 2006. The integrated control of *Armillaria mellea*. 1. Glasshouse experiments. *Biol. Agric. Hortic* 23: 225–234.
- [60] Raziq F., Fox R.T.V. 2006. The integrated control of *Armillaria mellea*. 2. Field experiments. *Biol. Agric. Hortic*. 23: 235–249.
- [61] Sharma S.R., Satish K. 2005. Determination of thermal death point of different mushroom moulds. W: Challenging problems in horticultural and forest pathology. Integrated plant disease management. Sharma R.C., Sharma J.N. (red.), Solan, India: 349–353.
- [62] Sharma S.R., Satish K. 2006. Diseases of mushrooms and their management. W: Challenging problems in horticultural and forest pathology. Integrated plant disease management. Sharma R.C., Sharma J.N. (red.), Solan, India: 13: 246–286.
- [63] Shatzman A.R., Kosman D. 1977. Regulation of galactose oxidase synthesis and secretion in *Dactylium dendroides*: Effects of pH and culture density. *J. Bacteriol.* 130: 455–463.
- [64] Sinden J.W. 1956. Chloride of lime – *Dactylium*. *MGA Bull.* 73: 24.
- [65] Sinden J.W. 1971. Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Annu. Rev. Phytopathology* 9: 411–432.
- [66] Singh M., Chaube H.S., Singh R.P. 2000. Effect of fluorescent pseudomonads on primordia formation, yield and control of pathogenic fungi of *Agaricus bisporus* (LANGE) IMBACH. *J. Mycol. Plant Pathol.* 30: 313–326.
- [67] Zaayen A. Van, Rutjens A.J. 1981. Thermal death points for two *Agaricus* species and for the spores of some major pathogens. *Mushroom Science* 11: 393–402.
- [68] Zaayen A. van, Adrichem J.C.J. van. 1982. Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. *Eur. J. Plant Pathol.* 88: 203–213.
- [69] Zare R., Khabbaz-Jolfaei H. 2005. Fungi isolated from *Agaricus bisporus* in Teharan Province, with special reference to *Verticillium fungicola*. *Rostaniha* 6: 5–7.
- [70] Ziombra M. 1994. Choroby i szkodniki boczniaka. BPP „Pieczarki” 2: 31–36.

## *Cladobotryum dendroides* and its effect on cultivation of *Agaricus bisporus* mushrooms

**Key words:** white button mushroom, *Agaricus bisporus*, *Cladobotryum dendroides*, cobweb

### Summary

The characteristics of cobweb diseases of white button mushroom *Agaricus bisporus* LANGE (IMBACH) was described. The casual agents of the disease is pathogenic fungus *Cladobotryum dendroides*. White, webby mycelium of the pathogen on the casing, which grows very fast and covers the mushrooms, is a typical symptom of disease. Optimal condition for disease development, infection sources and methods of disease control were also presented. The best method of reducing the risk of infection caused by *Cladobotryum* spp. is good hygiene in a mushroom growing room.

## ***Alternaria solani* – patogen pomidora i perspektywy hodowli odmian odpornych**

**Elżbieta U. Kozik, Izabela Ostrzyżek, Wojciech Szczechura**

Zakład Genetyki, Hodowli i Biotechnologii

Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach

ul. Rybickiego 15/17, 96-100 Skierniewice

e-mail: elzbieta.kozik@iwarz.pl

**Słowa kluczowe:** *Alternaria solani*, alternarioza, pomidor, dziedziczenie, odporność, hodowla odpornościowa, testy odporności

### **Wstęp**

*Alternaria solani* SORAUER powoduje duże straty gospodarcze w wielu krajach. W Polsce choroba jest szczególnie szkodliwa w uprawach polowych pomidora. *Alternarioza* jest najbardziej rozpowszechniona w regionach o częstych, obfitych opadach deszczu, wysokiej wilgotności powietrza i wysokiej temperaturze (24–29°C), zwłaszcza na glebach lekkich. Ciepła i wilgotna pogoda latem sprzyja dużemu nasileniu choroby w rejonach, gdzie dodatkowo zalegają stosunkowo długo i cyklicznie mgły, szczególnie w nocy.

W Kanadzie, Indiach, USA i Nigerii straty plonów spowodowane porażeniem liści roślin pomidora sięgają do około 80%, natomiast straty spowodowane porażeniem siewek wynoszą w tych krajach 20–40% [8]. *Alternarioza* atakuje rośliny pomidora we wszystkich stadiach wzrostu. Pierwsze objawy mogą wystąpić już w fazie siewki i rozsady, a na owocach są często widoczne nawet w fazie zawiązków. Duże nasilenie choroby często prowadzi do całkowitej defoliacji i zamierania roślin.

Pierwotnym źródłem infekcji są najczęściej porażone nasiona oraz nie rozłożone przez 2–3 lata resztki roślinne w wierzchniej warstwie gleby, na których zimuje grzybnia lub zarodniki przetrwalnikowe *A. solani* [4, 29]. W trakcie wegetacji zarodniki konidialne grzyba przenoszone są z kroplami deszczu i z wiatrem [8]. Rozwój choroby następuje w zakresie temperatury 10–35°C (temperatura optymalna 24–29°C) i zróżnicowanej wilgotności względnej powietrza.

Szkodliwość alternariozy pomidora związana jest zarówno ze spadkiem plonu wskutek zniszczenia liści przez grzyb, jak i bezpośrednim porażeniem owoców.

*A. solani* atakuje rośliny z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), głównie: pomidora, ziemniaka, papryki i bakłażana [8]. Obecnie najpowszechniej ochronę plantacji przed alternariozą realizuje się przez wykonywanie zabiegów chemicznego zaprawiania nasion i przestrzeganie zmianowania. Natomiast po wystąpieniu pierwszych objawów choroby stosowane jest opryskiwanie roślin fungycydami. Jest to jednak metoda kosztowna i może być nieefektywna w niesprzyjających dla roślin warunkach pogodowych. Potencjalnie najbardziej ekonomicznym rozwiązaniem byłoby uzyskanie odpornych odmian pomidora. Jest to zadanie ważne zarówno z punktu widzenia producentów pomidora, jak i konsumentów, ponieważ uprawa odmian odpornych na choroby pozwala na zmniejszenie zużycia pestycydów, co ma szczególne znaczenie w uprawach prowadzonych systemami integrowanymi i ekologicznymi. Jednakże postęp w hodowli odpornościowej pomidora na alternariozę jest obecnie ograniczony. Istnieją wprawdzie źródła odporności na chorobę wśród dzikich gatunków *Lycopersicon*, ale przeniesienie tej cechy do pomidora uprawnego jest trudne ze względu na poligeniczne uwarunkowanie odporności oraz jej powiązanie z niekorzystnymi cechami użytkowymi.

## Charakterystyka patogena

*Alternaria solani* należy do grzybów mikosporowych, klasy: *Hypomycetes*, rzędu: *Moniliales*, rodziny: *Dematiaceae*. Grzyby z rodzaju *Alternaria* na pożywce tworzą szybko rosnące, płaskie, wełniste kolonie o kolorze szarobiałym do oliwkowo-czarnego z rewersem brązowym do czarnego. Konidiofory są podzielone przegrodami, ciemnego koloru, rozgałęzione lub proste, zakończone łańcuszkami konidiów. Grzyb wytwarza żółte, ochrowe, jasnobrązowe lub ciemnobrunatne konidia, o powierzchni gładkiej, chropowatej albo kolczastej. Grzyby z rodzaju *Alternaria* są szeroko rozpowszechnione w glebie, powietrzu i martwym materiale organicznym, często pasożytują na roślinach. Niektóre gatunki są saprotrofami, inne wyspecjalizowanymi pasożytami. Obok *A. solani*, jednym z najbardziej rozpowszechnionych w środowisku jest gatunek *Alternaria alternata* [14]. Jest to saprotrof, ale także patogen okolicznościowy i wspólnie z *A. solani* może powodować choroby różnych gatunków roślin.

Gatunek *A. solani* po raz pierwszy został opisany w 1882 roku przez Ellisa i Martina [cyt. 36]. Gatunek *A. solani*, wcześniej znany jako *A. porri* f. sp. *solani*, charakteryzuje się wielojądrzastą grzybnią, heterokariozą (w jednej komórce znajdują się genetycznie różnicowane jądra). W komórkach *A. solani* występuje duża zawartość melaniny.

Do zakażenia roślin może dochodzić trzema drogami: przez penetrację epidermy, przez aparaty szparkowe oraz przez zranienia tkanki [16]. Warunkami infekcji są: temperatura 10–25°C oraz zwilżona powierzchnia liścia przez kilkanaście godzin. *A. solani* optimum rozwoju osiąga w wysokiej wilgotności względnej (90%) i wysokiej temperaturze (24–29°C). Objawy chorobowe widoczne są już po 2–3 dniach



od infekcji, a wytwarzanie zarodników po dalszych 3–5 dniach. Ze względu na bardzo krótki cykl rozwoju grzyba występują zakażenia policykliczne.

Zakażenie roślin odbywa się przy udziale enzymów celulazy i galakturonazy oraz toksyn wytwarzanych przez *A. solani*. Grzyb ten wytwarza jedenaście toksyn, z których najważniejsze to alternariol i solanopiron A, B oraz C. Alternariol produkowany jest przez dojrzewające zarodniki konidialne [25]. Opryskiwanie roślin samym kwasem alternariowym nie powoduje efektu fitotoksycznego, jednak dodany do zawiesiny zarodników, ułatwia proces zakażenia i powoduje powiększanie się nekrotycznych plam [19]. Stwierdzono, że dodatkowym czynnikiem koniecznym do zapoczątkowania infekcji jest nietoksyczna substancja S1 identyfikowana w wodnej frakcji po ekstrakcji chloroformem dojrzewających zarodników [18]. Substancja S1 dodana do niepatogenicznych zarodników *A. alternata* powoduje, że grzyb ten staje się patogeniczny i wywołuje nekrotyczne zmiany zarówno na pomidorach jak i ziemniakach. Działanie solanopironu, drugiej najważniejszej toksyny wytwarzanej przez *A. solani*, jak dotąd nie jest poznane.

Przeprowadzone badania molekularne metodami RAPD, AFLP oraz badania izoenzymatyczne dowodzą, iż mimo braku rozmnażania płciowego u *A. solani* występuje wysoka zmienność genetyczna wśród izolatów patogena zarówno na roślinach, jak i pożywkach. Izolaty różnią się morfologią, fizjologią i patogenicznością [40]. Różnice w patogeniczności znaleziono nawet w obrębie izolatów powstałych z poszczególnych komórek jednego konidium [38]. W obrębie *A. solani* nie wyodrębniono dotychczas ras fizjologicznych.

Stwierdzono duże zróżnicowanie genetyczne izolatów pochodzących z różnych krajów, natomiast znacznie mniejsze wśród izolatów w obrębie jednego kraju [40]. Tłumaczy się to mniejszymi odległościami rozprzestrzeniania patogena w obrębie tego samego kraju. Istotnym czynnikiem zróżnicowania izolatów jest także szeroko rozpowszechniony transport materiału roślinnego w obrębie krajów oraz intensywne kontrole i restrykcyjne prawo obowiązujące przy przewożeniu roślin między poszczególnymi państwami.

Aktualnie brak jest markerów molekularnych sprzężonych z różnicującymi cechami fizjologicznymi, morfologicznymi i patogenicznością grzyba *A. solani*. Duża różnorodność genetyczna w populacji patogena rzutuje na łatwe przełamywanie odporności, a tym samym tłumaczy brak odmian całkowicie odpornych na alternariozę.

## Objawy chorobowe na pomidorze

Choroba powodowana przez *A. solani* nazywana jest alternariozą. Jej objawy występują na różnych nadziemnych częściach roślin pomidora. Na **liściach i owocach** pojawiają się małe, brunatnoczarne plamy. Ponieważ na liściach objawy chorobowe występują już we wczesnym stadium rozwoju roślin, dlatego w języku angielskim choroba nosi nazwę „early blight”. Zmiany rozprzestrzeniają się wraz ze starzeniem

rośliny. Średnica plam wynosi 0,2–0,5 cm. Plamy te często zlewają się w większe nekrozy z koncentrycznie i strefowo ułożonymi pierścieniami. Wokół plam mogą czasami powstawać koncentryczne żółte obwódki. Przy silnym porażeniu występuje przedwczesna defoliacja. Porażane są także kwiaty, szypułki kwiatowe, ogonki liściowe i owoce. Na owocach, najczęściej tuż przy szypułce, powstają jasnobrunatne plamy przybierające formę mniej lub bardziej wgłębionej struktury, które z czasem pokrywają się fioletowoczarnym nalotem utworzonym z trzonek i zarodników konidialnych. Silnie porażone owoce często opadają. Młodsze owoce są bardziej podatne niż starsze.

U podstawy zakażonej **siewki** (ang. collar rot) tworzy się czarnobrazowa obrączka, która rozszerza się sukcesywnie w miarę upływu czasu. Może to spowodować osłabienie wzrostu rośliny bądź jej zamarcie.

**Porażenie pędów** – zarówno na pędzie głównym, jak i pędach bocznych dojrzałych roślin pojawiają się małe, ciemnozielone, gładkie, lekko zapadnięte plamy (ang. stem lesion). Z czasem stają się większe, brązowe i wydłużone. Podobnie jak na liściach mogą pojawić się także koncentryczne obwódki [8].

Dużą podatnością charakteryzują się zwykle rośliny odmian wczesnych, samo-kończących oraz rośliny stare, osłabione i chore. Większą odporność wykazują natomiast rośliny młode odmian późnych o niezdeteminowanym wzroście [30]. Badacze tłumaczą to zjawisko wysoką zawartością cukrów w tkankach młodych roślin, które hamują działanie enzymów celulolitycznych grzyba [34]. Wydaje się, że duże znaczenie ma także większe stężenie glikoalkaloidów w młodych tkankach. Solanina, chaconina i solanidyna powodują zahamowanie wzrostu *A. solani* in vitro [33].

## Źródła odporności pomidora na alternariozę

Źródła odporności znaleziono wśród dzikich gatunków pomidora. Najwyższą odpornością liści charakteryzują się linie trzech gatunków: *L. hirsutum* (PI 127827, PI 126445, PI 390514, PI 390662, PI 1390662, B 6013, LA2100, LA2124, LA2204, LA 2650, PE36, LA2552, PE34, PE35, LA1366, PI365934, PI379014), a także *L. peruvianum* (PE33, PI390671, LA1292, LA1365, LA1910, LA1983, PI270435, PI365951, PI390665, LA1675, LA1929, LA2573, LA2581, PE31, PI251312, PI306811, PI390667) i *L. pimpinellifolium* (PI 365912, PI 390519, A 1921, L4394). Dużą odporność w fazie siewek stwierdzono u *L. pimpinellifolium* (87610005) i *L. chilense* (87610011), natomiast odporność pędów występuje między innymi u *L. cheesmanii* i *L. minutum* (87610006) [24, 32, 39, 8].

Odporność ta jest jednak bardzo trudna do przeniesienia do uprawnych form pomidora ze względu na niekorzystne cechy użytkowe linii dzikich (zła jakość i późne dojrzewanie owoców), które wprowadzane są wraz z odpornością [31]. Eliminowanie tych niepożądanych cech w procesie hodowli wpływa na obniżanie poziomu odporności w kolejnych pokoleniach hodowlanych. Prawdopodobnie jest to efektem blis-

kiej odległości między genami warunkującymi zarówno jakość owocu, jak i ich późne dojrzewanie a genami odporności. Może też być to spowodowane efektem plejotropowym. Nash i Gardner [26, 27] wykorzystując *L. hirsutum* PI 126445 wyhodowali kilka późnych linii pomidora o niewielkich owocach i znaczącej gospodarczo tolerancji na alternariozę. Linie te stanowiły komponenty rodzicielskie do mieszańców F1 o różnych cechach użytkowych [15]. Jednym z tych mieszańców jest ‘Mountain Supreme’ F1 (NC EBR-3 × NC EBR-4) – odmiana średnio wczesna, charakteryzująca się odpornymi łodygami. Owoce tej odmiany są owalne i symetryczne o kolorze czerwonym, wytrzymałe na pęknięcie i trwałe w przechowywaniu. Drugą odmianą mieszańcową z tolerancją na alternariozę jest ‘Plum Dandy’ (NC EBR-5 × NC EBR-6). Jest to odmiana samokończąca, o dużym wigorze, czerwonych owocach i wysokim plonie wczesnym.

Uzyskanie nowych linii pomidora odpornych na alternariozę stanowi nadal bardzo ważny cel w hodowli odpornościowej.

## Genetyczne uwarunkowanie odporności

Mechanizm genetycznego uwarunkowania odporności na *A. solani* nie został jeszcze w pełni poznany. Prowadzone są intensywne prace na ten temat. Badania nad dziedziczeniem odporności na alternariozę z wykorzystaniem różnych źródeł odporności wskazują, że jest to cecha ilościowa kontrolowana wielogenowo [8]. Foolad i in. [13] donoszą, że odporność na alternariozę nie opiera się na modelu „gen na gen” w interakcji gospodarz–patogen. Klasyczne badania genetyczne różnych źródeł odporności wskazują na istnienie co najmniej dwóch genów o addytywnych, dominujących oraz epistatycznych efektach działania [3, 26]. Datar i Lonkar [10] donoszą natomiast o jednogenowym, dominującym podłożu dziedziczenia odporności u *Solanum habrochaites* PI 134417. Maeiro i in. [23] uzyskali w wyniku skrzyżowania linii odpornej i podatnej mieszańce F1 o pośrednim, w stosunku do rodzicielskich, stopniu odporności na liściową postać alternariozy, co wskazuje na addytywny bądź częściowo dominujący charakter dziedziczenia tej cechy. Badania Thirthamalappa i Lohithaswa [39] sugerują obecność recesywnych genów odporności na tę postać alternariozy. Odporność siewek na alternariozę także wskazuje na model addytywny i dominujący, aczkolwiek geny dominujące wydają się tu odgrywać większą rolę [24]. Jak dotąd nie są znane zależności między dziedziczeniem odporności poszczególnych organów (liści, łodyg, owoców i szyjki korzeniowej u siewek) na *A. solani*. Ponadto istnieją przypuszczenia, iż odporność owoców pomidora na *A. solani* może dziedziczyć się niezależnie od odporności na porażenie liści, gdyż objawy te nie zawsze występują równocześnie [2].

Wykorzystanie technik biologii molekularnej ze szczególnym uwzględnieniem markerów molekularnych może ułatwić określenie lokalizacji genów lub QTL (ang. Quantative Trait Loci) na chromosomach, odpowiedzialnych za odporność na alter-

nariozę oraz umożliwić wprowadzenie tej cechy do nowych odmian pomidora [12]. Dotychczas znaleziono wiele QTL odpowiedzialnych za odporność jednakże większość z nich daje relatywnie mały efekt. Foolad i in. [12] jako pierwsi opracowali mapę QTL odporności na alternariozę liści i owoców. Wykorzystali oni *Solanum habrochaites* PI 126445 jako źródło odporności. Mapowanie QTL przeprowadzone zostało na pokoleniu BC1 i zwalidowane na populacji BC1S1. Zidentyfikowano 14 QTL, wyjaśniających 57% zmienności fenotypowej. Dla wszystkich QTL allel warunkujący odporność pochodził z odpornej formy rodzicielskiej. Zhang i in. [43] stosując genotypowanie selektywne zidentyfikowali 7 QTL, z których jeden, pochodzący od rośliny podatnej, zlokalizowany był na chromosomie 3, natomiast sześć na chromosomach 4, 5, 6, 8, 10 i 11 i pochodziły one od rośliny odpornej. Badania Chaerani [7] ujawniły istnienie 6 QTL w pokoleniach F2 i F3 skrzyżowań *L. arcanum* LA2157 i *L. esculentum*. Występowanie QTL odpowiedzialnych za odporność łodyg, było analogiczne zarówno w pokoleniu F2, jak i F3. Jednakże QTL warunkujące odporność liści zostały znalezione w pokoleniu F2, natomiast nie zawsze były wykrywane w pokoleniu F3 i odwrotnie, co oznaczać może, iż są one środowiskowo-specyficzne bądź zależą od wieku rośliny. Autorzy zlokalizowali również 3 QTL odpowiedzialne za odporność pędów ściśle związane z odpornością liści. Zaznaczyć należy, że takie geny odporności mogą być nieefektywne w innych rejonach geograficznych, gdzie mogą dominować zarówno inne populacje *A. solani*, jak i inne warunki wzrostu roślin.

Jak dotąd mapy QTL nie są jeszcze wystarczająco precyzyjne, a ich wykorzystanie w procesie hodowli nie daje pewności uzyskania linii odpornych.

## Testowanie odporności

Ze względu na wysokie zróżnicowanie genetyczne patogena często przygotowuje się inokulum z kilku zmieszanych ze sobą izolatów. Inokulum może też pochodzić z kultury jednozarodnikowej [6].

Kultury patogena utrzymywane są na różnego typu pożywkach (CMA – agarowo kukurydziana, LBA – agarowo fasolowa, MEA – agarowa z ekstraktem słodowym, PDA – agarowo ziemniaczana, WA – agarowa z brzeczką, V8 juice agar – agar z sokiem wielowarzywnym) i na pożywkach zmodyfikowanych [8, 28, 35]. *Alternaria solani* często nie wytwarza zarodników konidialnych w kulturach in vitro. Dla uzyskania zarodnikowania należy przeprowadzić indukcję sporulacji. Do tego celu można wykorzystać promieniowanie UV [37], światło fluorescencyjne [11,21], wprowadzić kulturę w warunki suszy i wystawić na działanie światła słonecznego [1, 24].

Najczęściej kultury grzyba utrzymuje się w dwunastogodzinnym fotoperiodzie w temperaturze 21–24°C. W przypadku zastosowania do indukcji zarodnikowania promieniowania UV, światła fluorescencyjnego lub warunków suszy, czas uzyskania pierwszych zarodników wynosi od 8 do 17 dni [1, 37, 11, 8]. Po uzyskaniu wystarczającego stopnia zarodnikowania przemywa się kulturę grzyba wodą dejonizowaną

z opcjonalnym dodaniem niewielkiej ilości detergentu w celu zwiększenia wydajności procesu i delikatnie zdrapuje za pomocą szkiełka mikroskopowego lub pędzelka, a następnie przefiltrowuje zawiesinę w celu usunięcia pozostałości grzybni. Ostatecznie rozcieńcza się mieszaninę do wymaganego stężenia. Stwierdzono że najlepsze efekty sztucznej inokulacji uzyskuje się przy stężeniu  $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  konidiów w 1 ml zawiesiny.

Shahin i Shepard [35] opracowali metodę pozwalającą na szybkie (4 do 6 dni) uzyskanie zarodnikowania grzyba. Polega ona na zastosowaniu różnych pożywek dla hodowli kultury grzyba i do indukcji sporulacji. Kulturę patogena prowadzi się początkowo na pożywce PDA w 25°C, w ciemności. Indukcji zarodnikowania dokonuje się 48–72 godziny później, ale przed uformowaniem powietrznej grzybni. Wycina się wtedy 4 mm<sup>2</sup> bloczki pożywki przerośniętej przez grzybnię i przenosi je na pożywkę S o pH 7,4 i składzie: 20 g sacharozy, 30 g CaCO<sub>3</sub>, 20 g agaru w 1 litrze wody destylowanej. Bloczki zalewa się sterylną wodą destylowaną tak, by zostały częściowo pokryte. Przygotowany w ten sposób materiał inkubuje się przez 18–24 h w 18°C, w ciemności. Na tym etapie zaczynają powstawać konidia, które po 48–72 h pokrywają już całą powierzchnię pożywki, natomiast grzybnia wrasta w pożywkę S, co jest równoznaczne z brakiem grzybni powietrznej. Efektu powstawania grzybni powietrznej nie eliminują inne metody. Tak przygotowane kultury grzyba przepłukuje się wodą destylowaną, a następnie przefiltrowyduje się i rozcieńcza do wymaganego stężenia. Dla spowodowania powtórnej indukcji zarodnikowania kultury grzyba umieszcza się ponownie w 18°C, w ciemności. Metoda ta jest pracochłonna i znaczna część badaczy do pozyskania konidiów kultury *A. solani* utrzymuje na pożywce V8 w 12-godzinnym fotoperiodzie z zastosowaniem promieni UV.

Stopień odporności roślin na alternariozę określa się w testach szklarniowych i polowych. Wykonywane są także testy listkowe, w których pojedyncze krople inokulum nanosi się na odcięte listki pomidora umieszczone w komorze z podwyższoną wilgotnością. Jako pierwszy taki test przeprowadził Locke [20]. Część badaczy prowadzących analizy tą metodą otrzymało jednak wyniki odmienne i niekorrelujące z rezultatami uzyskanymi innymi metodami [11, 22]. Zjawisko to tłumaczy się nierównomiernym rozłożeniem hormonów i enzymów w listkach ułożonych w różnych partiach rośliny. Zmodyfikowana procedura z zastosowaniem przemycania listków w 10,7 μM NAA lub 4,0 μM 2,4-D zwiększa powtarzalność wyników [6]. Metoda ta zastosowana była na ziemniakach i należałoby przeprowadzić analogiczne testy także na pomidorach, aby potwierdzić ich przydatność.

Testy szklarniowe przeprowadza się na 4–5-tygodniowych roślinach. Stosowane są dwa sposoby inokulacji roślin zawiesiną zarodników: poprzez opryskiwanie roślin oraz nanoszenie kropli [7, 27]. Pierwsza z nich polega na opryskaniu roślin zawiesiną o stężeniu  $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^6$  konidiów w 1 ml za pomocą opryskiwacza i umieszczeniu roślin się w plastikowych komorach o wilgotności względnej 100% z 12 godzinnym fotoperiodem i temperaturą 24/18°C – dzień/noc. Przedłużenie czasu inkubowania

roślin w podwyższonej wilgotności nie zwiększa efektywności inokulacji [42]. W dniach od drugiego do piątego po inokulacji otwiera się komory wzrostu i wyłącza nawilżanie. Podwyższoną wilgotność stosuje się tylko w nocy. Oceny zmian chorobowych dokonuje się po siedmiu do dziesięciu dniach po inokulacji. Mierzy się wielkość plam zarówno na liściach inokulowanych, jak i przylegających oraz procent defoliacji. Natomiast w drugiej metodzie nanosi się kroplę inokulum na górną stronę trzeciego apikalnego listka z liścia górnej partii rośliny i mierzy wielkość plam powstałych po inkubacji. Inokulum powinno zawierać dodatek agaru, by uniknąć niekontrolowanego spłynięcia kropli. Badania porównawcze tych dwóch metod przeprowadzone zostały przez Chaerani [7]. Stwierdzono, że metody te są powtarzalne, lecz metoda kropłowa jest dokładniejsza i bardziej miarodajna. W doświadczeniach tych niektóre linie testowane obydwoma metodami dawały odmienne rezultaty. Stosowanie opryskiwania roślin często powoduje porażenie ogonków liściowych i opadanie liści, co w konsekwencji uniemożliwia ocenę wielkości plam. Dzięki zastosowaniu obu metod można jednak zbadać wpływ porażania ogonków liściowych na stopień odporności całej rośliny. Wadą metody kropłowej jest jej czasochłonność i pracochłonność. Skale stosowane przez badaczy do określenia nasilenia objawów chorobowych na roślinie są zróżnicowane. Poysa i Tu [32] zastosowali skalę 1–9, gdzie: 1 – brak symptomów chorobowych, 2 – kilka małych uszkodzeń, 3 – kilkanaście małych uszkodzeń, 4 – < 10% powierzchni liścia objętych infekcją, 5 – 10–20%, 6 – 21–50%, 7 – 51–80%, 8 – 81–99%, 9 – roślina martwa. Wartości od 1 do 3,9 świadczą o bardzo wysokim stopniu odporności, 4 do 4,9 oznaczają wysoką odporność, 5 do 5,9 – umiarkowany stopień odporności (rośliny w warunkach polowych mogą nie tracić liści), 6 do 6,9 – umiarkowany do wysokiego stopnia podatności, 7 do 9,0 – wysoki do bardzo wysokiego stopień podatności. Christ [9] zastosował skalę od 0 do 7, gdzie 0 – brak uszkodzeń, 1 – uszkodzenia do 1%, 2 – 1 do 5%, 3 – 6 do 10%, 4 – 11 do 25%, 5 – 26 do 50%, 6 – 51 do 75%, 7 – 76 do 100% porażonej powierzchni liści. W jednej z prac [8] zastosowano skalę o mniejszym zakresie od 0 do 5, gdzie: 0 – brak widocznych uszkodzeń na liściach, 1 – < 10% powierzchni porażonej, 2 – 11 do 25%, 3 – 26 do 50%, 4 – 51 do 75%, 5 – > 75% powierzchni zainfekowanej lub liść odpadnięty. Przytoczone przykłady obrazują różnorodność i dowolność przy sposobie oceny porażenia roślin dotkniętych alternariozą.

Nieznacznie zmodyfikowaną metodę i skalę oceny porażenia zastosowano w teście na siewkach [24]. Pięcioletniowe siewki inokulowano przez opryskiwanie podstawy łodyżki wodną zawiesiną zarodników konidialnych i umieszczenie ich w wysokiej wilgotności na 18 godzin. Po dwóch tygodniach rośliny wyjęto z ziemi i oceniono na podstawie skali 0 do 100, gdzie: 0 – martwa roślina, 25 – załamany pęd, 50 – dobrze rozwinięte uszkodzenia, 75 – niewielkie plamki, 100 – brak objawów choroby. Według przytoczonej skali, rośliny z wartościami 75 i 100 uznano za odporne, a 0, 25, 50 za podatne.

W testach polowych opryskuje się wodną zawiesiną zarodników konidialnych około czternasto-tygodniowe rośliny. Przyjmuje się analogiczną jak w testach szklar-

niowych skalę oceny porażenia roślin [11, 27]. Obserwacje zdrowotności roślin wykonywane są co najmniej dwukrotnie w trakcie wegetacji, począwszy od 8 dnia po inokulacji. Oceniana jest tylko dolna część roślin (do połowy lub 1/3 wysokości rośliny), gdyż powierzchnia porażenia dziesięciu górnych liści rzadko przekracza 2%. Stwierdzono też, że dopiero przy 60% defoliacji zostaje zainfekowanych 10% owoców [5].

## Podsumowanie

Alternarioza wywoływana przez *Alternaria solani* powoduje coraz większe szkody w uprawie pomidora w Europie, w tym również w Polsce. Występuje wiele izolatów patogena różnorodnych pod względem chorobotwórczości. Chociaż znaleziono wiele źródeł odporności wśród dzikich gatunków rodzaju *Lycopersicon*, jednak ciągle brakuje odpornych odmian użytkowych ze względu na trudności w ich wyhodowaniu. Jednym z głównych czynników powodujących te trudności jest poligeniczne warunkowanie odporności na alternariozę i niewyjaśnione jak dotąd, ścisłe korelacje genów odporności z niekorzystnymi cechami morfologicznymi i fizjologicznymi u form donorowych. Trwają intensywne prace nad wyhodowaniem nowych odmian odpornych i dokładniejszym poznaniem genetycznych uwarunkowań odporności pomidora na alternariozę.

## Literatura

- [1] Barksdale T.H. 1969. Resistance of tomato seedlings to early blight. *Phytopathology* 59: 443–446.
- [2] Barksdale T.H. 1971. Field evaluation for tomato to early blight resistance. *Plant Dis. Rep.* 55: 807–809.
- [3] Barksdale T.H., Stoner A.K. 1977. A study of the inheritance of tomato early blight resistance. *Plant Dis. Rep.* 61: 63–65.
- [4] Basu P.K. 1971. Existence of chlamydospores of *Alternaria porri* f. sp. *solani* as overwintering propagules in soil. *Phytopathology* 61: 1347–1350.
- [5] Basu P.K. 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Can. Plant Dis. Surv.* 54: 45–51.
- [6] Bussey M.J., Stevenson W.R. 1991. A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. *Plant Dis.* 75: 385–390.
- [7] Chaerani R. 2006. Early blight resistance in tomato: screening and genetic study, Ph.D. thesis, Wageningen University.
- [8] Chaerani R., Voorrips R.E. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*) the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 335–347.
- [9] Christ B.J. 1991. Effect of disease assessment method on ranking potato cultivars for resistance to early blight. *Plant Dis.* 75: 353–356.
- [10] Datar V.V., Lonkar S.G. 1985. Inheritance of resistance in tomato early blight. *J. Mah. Agric. Univ.* 10: 357–358.
- [11] Foolad M.R., Ntahimpera N., Christ B.J., Lin G.Y. 2000. Comparison of field, greenhouse and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Dis.* 84: 967–972.
- [12] Foolad M.R., Zhang L.P., Khan A.A., Nino-Liu D., Lin G.Y. 2002. Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* cross. *Theor. Appl. Genet.* 104: 945–958.

- [13] Foolad M.R., Sharma A., Ashrafi H., Lin G.Y. 2005. Genetics of early blight resistance in tomato. *Acta Horticulturae* 695: 397–406.
- [14] Gilchrist D.G., Grogan R.G. 1975. Production and nature of host specific toxin from *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 66: 165–171.
- [15] Gardner R.G., Shoemaker P.B. 1999. 'Mountain Supreme' early blight-resistant hybrid tomato and its parents, NC EBR-3 and NC EBR-4. *HortScience* 34: 745–746.
- [16] Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791.
- [17] Henning R.G., Alexander L.J. 1959. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. *Plant Dis. Rep.* 43: 298–308.
- [18] Langsdorf G., Furuichi N., Doke N., Nishimura S. 1990. Investigations on *Alternaria solani* infections: detection of alternaric acid and a susceptibility-inducing factor in the spore-germination fluid of *A. solani*. *J. Phytopathol.* 128: 271–282.
- [19] Langsdorf G., Park P., Nishimura S. 1991. Investigations on *Alternaria solani* infections: effect of alternaric acid on the ultrastructure of tomato cells. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 57: 32–40.
- [20] Locke S.B. 1948. A method for measuring resistance to defoliation diseases in tomato and other *Lycopersicon*. *Phytopathology* 38: 937–942.
- [21] Lukens R.J. 1960. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* 50: 867–868.
- [22] Lynch D.R., Wastie R.L., Stewart H.E., Mackay G.R., Lyon G.D., Nachmias A. 1991. Screening for resistance to early blight (*Alternaria solani*) in potato (*Solanum tuberosum* L.) using toxic metabolites produced by the fungus. *Potato Res.* 34: 297–304.
- [23] Maceiro M., Ng T.J., Barksdale T.H. 1990. Genetic resistance to early blight in tomato breeding lines. *HortScience* 25: 344–346.
- [24] Maceiro M., Ng T.J., Barksdale T.H. 1990. Inheritance of collar rot resistance in tomato breeding lines C1943 and NC EBR-2. *Phytopathology* 80: 1365–1368.
- [25] Maceiro M., Bean G.A., Ng T.J. 1991. Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines. *Phytopathology* 81: 1030–1033.
- [26] Nash A.F., Gardner R.G., 1988. Heritability of tomato early blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 12645. *Plant Disease* 72(3): 1030–1033.
- [27] Nash A.F., Gardner R.G., 1988. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 12645. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 113: 264–268.
- [28] Pashe J.S., Wharam C.M., Gudmestad N.C. 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* to QoI fungicides. *Plant Dis.* 88: 181–187.
- [29] Patterson C.L. 1991. Importance of chlamydospores as primary inoculum of *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. *Plant Dis.* 75: 274–278.
- [30] Pelletier J.R., Fry W.E. 1989. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* 79: 511–517.
- [31] Peralta I.E., Knapp S., Spooner D.M. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Sys Bot* 30: 424–434.
- [32] Poysa V., Tu J.C. 1996. Response of cultivars and breeding lines of *Lycopersicon* spp. to *Alternaria solani*. *Can. Plant Dis. Surv.* 76: 5–8.
- [34] Sands D.C., Lukens R.J. 1974. Effect of glucose and adenosine phosphates on production extracellular carbohydrases of *Alternaria solani*. *Plant Physiol.* 54: 666–669.
- [35] Shahin E.A., Shepard J.F. 1979. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology* 69 (6): 618–620.
- [36] Sherf A.F., Macnab A.A. 1986. Vegetable diseases and their control. John Wiley and Sons, New York, pp 634–640.
- [33] Sinden S.L., Goth R.W., O'Bryen M.J. 1972. Effect of potato alkaloids on the growth of *Alternaria solani* and their possible role as resistance factors in potatoes. *Phytopathology* 63: 303–307.
- [37] Spletzer M.E., Enyedi A.J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89:722–727.
- [38] Stall R.E., Alexander L.J. 1957. Heterocaryotic variation in *Alternaria solani*. *Phytopathology* 47: 34.
- [39] Thirthamallappa, Lohithaswa H.C. 2000. Genetics of resistance to early blight (*Alternaria solani* SORAUER) in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Euphytica* 113: 187–193.



- [40] Van Der Waals J.E., Korsten L., Slippers B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Dis.* 88: 959–964.
- [41] Vloutoglou I. 1999. Evaluation of tomato cultivars and hybrids for resistance to *Alternaria solani* infection. *Test of Agrochemicals and Cultivars* 20: 48–49.
- [42] Vloutoglou I., Kalogerakis S.N. 2000. Effects of inoculum concentrations, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. *Plant Pathol.* 49: 339–345.
- [43] Zhang L.P., Lin G.Y., Niño-Liu, Foolad M.R. 2003. Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum* cross by selective genotyping. *Mol. Breed.* 12: 3–19.

## ***Alternaria solani* – tomato pathogen and perspectives of breeding resistant cultivars**

**Key words:** *Alternaria solani*, early blight, tomato, inheritance, resistance, breeding for resistance, resistance tests

### **Summary**

Early blight, incited by *Alternaria solani* causes an increasing damage of tomato plants in Europe, including Poland. There are many isolates of the pathogen diversified in terms of pathogenicity. Although many sources of resistance have been found within wild species of *Lycopersicon* genus, but the development of cultivars with high levels of resistance has been hampered by the lack of strong resistance in the cultivated tomato. One of the main factors causing these difficulties is the conditionality of polygenic inheritance of the resistance to early blight and the close unexplained yet correlation of resistance genes with unfavorable physiological and morphological traits from the donor parent. Intensive breeding programme is being carried out to obtain new resistant cultivars and to gain a better knowledge on genetic basis controlling early blight resistance in tomato.



## **Fruktany i ich występowanie w roślinach uprawnych**

*Ewa Cieślik, Agnieszka Siembida*

*Małopolskie Centrum Monitoringu i Atestacji Żywności*

*Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie*

*ul. Balicka 122, 30-149 Kraków*

*e-mail: rrciesli@cyf-kr.edu.pl*

**Słowa kluczowe:** fruktany, skład chemiczny, charakterystyka ich źródeł

### **Wstęp**

Prawidłowe żywienie jako jeden z elementów stylu życia warunkuje prawidłowe funkcjonowanie organizmu, a co za tym idzie dobry stan zdrowia człowieka. Podstawowa rola żywności definiowana jako podtrzymywanie funkcji życiowych poprzez dostarczanie energii i składników odżywczych nie odpowiada jednak w pełni oczekiwaniom dzisiejszych konsumentów. Wzrasta więc zainteresowanie żywnością i jej wpływem na zdrowie człowieka, czego wyrazem jest poszukiwanie nowych, innowacyjnych składników żywności, które oprócz zaspokojenia głodu spełniają dodatkowe, ważne w fizjologii organizmu funkcje. Na ten fakt jako pierwsi zwrócili uwagę Japończycy, opracowując listę 11 składników nadającym produktom status funkcjonalności [9]. Wśród dodatków roślinnych wykorzystywanych w produkcji żywności funkcjonalnej – żywności sprzyjającej zdrowiu człowieka, wyprodukowanej z wykorzystaniem wiedzy o zależnościach między pokarmem, jego składnikami, a zdrowiem – jedno z czołowych miejsc zajmują fruktany [10, 11]. Potwierdzeniem tego są wyniki dotychczasowych badań żywieniowych, wg których fruktany są korzystnym substratem dla pożądanej flory bakteryjnej, szczególnie bifidobakterii, które metabolizują fruktany do kwasów octowego i mlekowego w proporcji 3:2, czyli najkorzystniejszej dla przewodu pokarmowego człowieka. W ten sposób utrzymują w jelicie grubym (okreźnicy) właściwe pH oraz odpowiednią ilość probiotyków, hamując rozwój bakterii gnilnych i patogennych. Co więcej, dzięki zdolności wiązania wody zwiększają one objętość treści pokarmowej i kału, wiążą cholesterol i kwasy żółciowe ograniczając dzięki temu ich wchłanianie przy jednoczesnym przyroście ich wydalania z kałem. To z kolei powoduje obniżenie poziomu trójglicerydów i cholesterolu

w surowicy krwi. Oprócz tych właściwości, fruktany charakteryzują się hipoglikemicznym działaniem oraz korzystnym wpływem na absorpcję wybranych składników mineralnych z diety [9]. Ponadto, dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym, fruktany są obecnie szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, pełniąc wiele istotnych technologicznie funkcji, w tym m.in. substancji zagęszczających, wypełniających, emulgujących, zastępujących sacharozę lub glukozę oraz tłuszcze. Z tego względu dodaje się je do fermentowanych produktów mlecznych, serów, czekolady, odżywek wspomagających odchudzanie, batonów, lodów i ciastek [26].

## Struktura chemiczna fruktanów

Fruktany, nazywane inaczej polifruktozylocukrami, są rozpuszczalnymi w wodzie polimerami zbudowanymi z jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,1) i/lub  $\beta$ -(2,6)-glikozydowymi oraz z jednej, na ogół na końcu redukującego łańcucha, cząsteczki D-glukozy, połączonej z jednostką  $\beta$ -D-fruktofuranozy za pomocą wiązania  $\alpha$ -(1-2)-glikozydowego [46].

W naturze występuje pięć różnych grup fruktanów, które rozróżnia się zgodnie z typem występujących w ich strukturze połączeń oraz położeniem cząsteczki glukozy. Są to [48, 61]:

- a) **Inuliny** – składające się z jednego liniowego łańcucha jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,1)-glikozydowymi. Wśród tych związków wyróżnia się [6]:
  - oligofruktany (fruktooligosacharydy, FOS) o stopniu polimeryzacji (DP tj. ilości jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy w łańcuchu) od 3–10, które dzielą się na:
    - krótkołańcuchowe o DP od 3–5,
    - długołańcuchowe o DP od 6–10,
  - długołańcuchową inulinę o DP od 10–60.
- b) **Neoinuliny** – składające się z dwóch liniowych łańcuchów jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,1)-glikozydowymi.
- c) **Lewany** (produkowane przez bakterie)/phlein (produkowane przez rośliny) – składające się z jednego liniowego łańcucha jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,6)-glikozydowymi.
- d) **Neolewany** – składające się z dwóch liniowych łańcuchów jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, połączonych wiązaniami  $\beta$ -(2,6)-glikozydowymi.
- e) **Fruktany mieszane** (ang. **graminan**) – zawierające dwa typy wiązań między jednostkami  $\beta$ -D-fruktofuranozy, a mianowicie  $\beta$ -(2,1)- oraz  $\beta$ -(2,6)-glikozydowe.

Wzory strukturalne poszczególnych grup fruktanów opracowali Ritsema i Smeekens w 2003 roku [45].

## Źródła fruktanów

Fruktany są szeroko rozpowszechnione wśród organizmów prokariotycznych oraz wyższych i niższych roślin. Odkryto, że fruktany wytwarzane są przez około 15% różnych gatunków roślin kwitnących należących do gospodarczo ważnych rodzin tj. *Liliaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae* [28] oraz przez bakterie, głównie *Streptococcus mutans*, a także przez grzyby *Aureobasidium pullulans* i *Aspergillus niger* [45].

Rośliny gromadzą fruktany w wakuolach, w postaci roztworów wodnych, najczęściej w jadalnych częściach, tj. korzenie palowe u cykorii (*Cichorium intybus* L.), bulwy u dalii (*Dahlia variabilis* L.) lub też cebulki u tulipanów (*Tulipa gesneriana* L.) i cebuli (*Allium cepa* L.). Węglowodany te mogą być również gromadzone w niedojrzałych nasionach oraz w komórkach wzrostowych (wegetatywnych) zbóż i traw. Długość łańcuchów roślinnych fruktanów sięga od 10 do kilkudziesięciu jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranazy. Jednakże rośliny syntetyzują i gromadzą fruktany, kiedy asymilacja netto  $\text{CO}_2$  przewyższa poziom wymagany dla ich normalnego wzrostu i rozwoju, po czym wykorzystują je podczas wzrostu po uprzedniej defoliacji oraz podczas wiosennego kiełkowania [9]. Ponadto wyniki licznych badań wyłoniły szereg czynników determinujących stężenie nie trawionych węglowodanów w różnych częściach roślin. Są to: gatunek rośliny, część rośliny, stadium rozwoju (dojrzałości), warunki środowiska, tj. temperatura (zwłaszcza podczas wzrostu korzeni i pędów), intensywność nasłonecznienia i jego czas, a także dostępność pożywienia i status wodny [7].

Z kolei fruktany produkowane z udziałem grzybów oraz bakterii mają o wiele dłuższe łańcuchy, które mogą sięgać ponad 100 tys. jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranazy, zaś DP fruktanów powstałych z ich udziałem determinowany jest rodzajem szczepu grzybów i bakterii, a także rodzajem enzymów z grupy transferaz produkowanych przez te mikroorganizmy [21]. Enzymy pochodzenia bakteryjnego odpowiedzialne są za syntezę fruktanów zwanych lewanami, enzymy zaś produkowane przez grzyby nitkowe i pleśnie odznaczają się zdolnością syntezy fruktooligosacharydów [31]. Badania wykazały także, iż proces ich syntezy zachodzi szybko i bez udziału energii słonecznej – z tego względu ich produktywność jest większa aniżeli skrobi [27].

## Charakterystyka poszczególnych rodzin oraz ich przedstawicieli

### Rodzina *Asteraceae*

Astrowate (*Asteraceae* DUM.), dawniej złożone (*Compositae* Gts.) – jest to rodzina roślin należąca do rzędu astrowców (*Asterales*). Jest ona jedną z najliczniejszych rodzin roślin naczyniowych oraz dwuliściennych, obejmującą około 30 tysięcy gatunków [44]. Fruktanami charakterystycznymi dla tej rodziny są liniowe inuliny, za których syntezę odpowiedzialne są dwa enzymy, a są nimi [36]: 1-SST (sacharozo : sacharozo 1-frukto-

zylotransferaza, EC 2.4.1.1.99), 1-FFT (fruktan : fruktan 1-fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.100).

Wśród przedstawicieli tej rodziny występują m.in.: cykoria, topinambur, banany, mniszek pospolity (lekarski), łopian większy, dalia, stokrotka, piołun oraz namorzynowe drzewa tropikalne.

**Cykoria (*Cichorium L.*)** – jest rośliną zielną, która liczy 10 gatunków rosnących w umiarkowanie ciepłych strefach Europy, Azji i Afryki. W Polsce występują dwa gatunki, a mianowicie cykoria endywia (*Cichorium endivia L.*) będąca efemerofitem oraz cykoria podróżnik (*Cichorium intybus L.*) będąca zadomowionym antropofitem [66]. Spośród nich, szczególnie szeroko rozpowszechniona jest cykoria podróżnik (*Cichorium intybus*), która rośnie między innymi na nieużytkach, miedzach i pastwiskach. Nazywana jest czasem cykorią polną lub dziką bądź też podróżnikiem błękitnym lub małym słonecznikiem. W lecznictwie wykorzystuje się zarówno jej ususzone zielone części roślin oraz korzenie, a czasem także świeże liście i kwiaty [47]. Istnieją dwie odmiany cykorii podróżnik, a mianowicie: *Cichorium intybus L.* var. *foliosum* (odmiana liściowa) oraz *Cichorium intybus L.* var. *sativum* (odmiana korzeniowa). Odmiana liściowa jest stosowana do wyrobu sałatek, odmiana korzeniowa zaś jest wykorzystywana w dwojaki sposób. Po pierwsze, jako dodatek do kawy zbożowej, po drugie zaś w żywieniu zwierząt gospodarskich, takich jak świnia, koń, cielę, brojler, kura nośna [57]. Badania przeprowadzone z udziałem świeżych korzeni palowych cykorii podróżnik wykazały, że około 80% ich suchej masy łącznie stanowią węglowodany, w tym od 15 do 20% inuliny oraz od 5 do 10% oligofruktozy [20], których stopień polimeryzacji jest zmienny, gdyż zależy od warunków (stopnia hydrolizy) przetwarzania korzeni palowych w celu pozyskania z nich fruktanów [30]. Z kolei badanie Van Loo [57] dowiodło, iż inulina wyekstrahowana z korzeni cykorii podróżnik zawiera w 30 do 50% łańcuchy o średnim DP równym 10, zaś pozostałe 50 do 70% łańcuchów jest dłuższe. W przypadku oligofruktozy, uzyskane rezultaty wykazują, iż jest ona całkowicie skomponowana z łańcuchów o DP równym 10. Co więcej, dalsze badania wykazały, że miejscem gromadzenia się tych fruktanów są korzenie palowe, a także sok mleczny produkowany przez jej łodygi [21].

**Topinambur (*Helianthus tuberosus L.*)** nazywany również słonecznikiem bulwiastym oraz jerozolimskim karczochem (ang. Jerusalem artichoke) – jest byliną występującą dziko w Ameryce Północnej, w Polsce zaś mającą status kenofitu [66]. Jest on blisko spokrewniony ze słonecznikiem zwyczajnym (*Helianthus annuus L.*), zaś w zależności od odmiany, może osiągać od 2 do 4 m wysokości i rozwijać podobny, choć mniejszy od słonecznika zwyczajnego kwiatostan. W Polsce, w 1998 roku zarejestrowano hodowlę 2 odmian, a mianowicie ‘Rubin’ (o małych bulwach nieregularnego kształtu i fioletowej barwie) oraz ‘Albik’ (o dużych bulwach, maczugowatym kształcie i żółtej barwie). W późniejszych latach stały się one przedmiotem licznych badań, m.in. w kierunku ustalenia ich składu chemicznego. Skład ten zależy od wielu czynników. Należą do nich m.in.: odmiana, warunki uprawy i termin zbioru

[18]. Badanie w tym kierunku przeprowadzili Florkiewicz i in. [14], wykorzystując dwie polskie odmiany topinamburu pochodzące z uprawy w Radzikowie. W materiale uzyskanym po zbiorze plonu jesienią (w październiku) oraz wiosną (w marcu – po zimowym przechowywaniu w glebie), głównym składnikiem zgromadzonym zarówno w bulwach i częściach nadziemnych tej rośliny, była inulina, przy czym poziom fruktanów w badanych bulwach wahał się w granicach  $41,4\text{--}50,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  suchej masy. Dalsza analiza wykazała, że istotnie statystycznie więcej tego składnika zawierały bulwy zbierane jesienią niż bulwy zbierane po zimowym przechowywaniu w glebie. Z kolei nieistotne statystycznie różnice zawartości fruktanów odnotowano w przypadku analizy zastosowania dwóch różnych odmian hodowlanych bulw. Wyniki tego badania są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez Johna [24], który ponadto wykazał, że im późniejszy jest zbiór, tym mniejsza jest masa molekularna cząsteczek fruktanów. Zjawisko to tłumaczy się zachodzącym w okresie zimowania dodatkowym wytwarzaniem średniołańcuchowych fruktanów i sacharozy – potrzebnej do regulacji ciśnienia osmotycznego w komórce – na skutek niskiej temperatury. Wyniki badań zaprezentowanych w części dotyczącej bulw topinamburu, są dowodem silnego wpływu warunków klimatyczno-glebowych na zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie, w ogólnej zawartości suchej masy w ich bulwach.

### Rodzina *Liliaceae*

Liliowate (*Liliaceae* Juss.) – jest to rodzina roślin należąca do klasy jednoliściennej. Wszystkie rodzaje i gatunki można spotkać wyłącznie na półkuli północnej. Wyróżniają się one posiadaniem cebuli właściwej, czyli przekształconego, podziemnego pędu o funkcji okrywającej (łuska zewnętrzna) i spichrzowej (łuska wewnętrzna) [44]. Fruktanami charakterystycznymi dla tej rodziny są liniowe neoinuliny, za których syntezę odpowiedzialny jest enzym 6G-FFT (2,1-fruktan : 2,1-fruktan 1-fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.243). Produktem jego aktywności jest neokestoza (6G-fruktozylosacharoza) – trisacharyd będący pierwszym przedstawicielem grupy neoinulin [45]. Wśród przedstawicieli tej rodziny występują m.in.: czosnek, cebula, por, szparag.

**Czosnek pospolity** (*Allium sativum* L.) zwany inaczej zwyczajnym – jest byliną, w uprawie występującą jako roślina dwuletnia lub jednoroczna. Jest warzywem, przyprawą i rośliną leczniczą znaną zwykle tylko pod nazwą rodzajową. Pochodzi z Azji, skąd rozprzestrzeniony został jako roślina uprawna do Europy i północnej Afryki, z czasem trafił również na inne kontynenty [66]. Już od 1940 roku zaczęto badać skład polisacharydów występujących w czosnku. Shiomi [51] jako pierwszy dowiódł, że typowymi fruktanami występującymi w czosnku są 1-kestoza i neokestoza. Nowsze rezultaty badań wskazują jednak, że struktura fruktanów w czosnku opiera się na neokestozie, ich średni DP zaś wynosi 50 [3]. Z kolei wg Gulewicz i in. [20] czosnek zawiera od 3–6% oligofruktozy oraz 9–16% inuliny. Rezultaty tych badań spójnie jednak dowodzą, że czosnek pospolity jest źródłem fruktanów typu neoinulin, które gromadzone są w jego ząbkach, stanowiąc łącznie 75% ich suchej masy.

Do rodziny *Liliaceae* należy również **cebula zwyczajna** (*Allium cepa* L.), zwana inaczej cebulą jadalną czy też czosnek cebulą. Jest ona gatunkiem rośliny pochodzącym ze Środkowej Azji [66], który został doceniony już ponad 1 tys. lat temu, nie tylko ze względu na swoje walory smakowe i odżywcze, ale także dzięki właściwościom leczniczym, które zostały potwierdzone przez nowoczesne nauki medyczne [19]. Badania wykazały, że główną częścią (65–80%) suchej masy cebulek tej rośliny są nie trawione węglowodany, tj. fruktooligosacharydy (FOS) oraz cukry proste [13, 39]. Średnia zawartość cukrów prostych kształtuje się na poziomie: 28% (glukoza), 24% (fruktoza) i 10% (sacharoza), pozostałą zaś część suchej masy stanowią FOS (ok. 18%) [4]. Jednakże w przypadku fruktozy, jej wyższe stężenia odnotowano w zewnętrznych warstwach cebulek, podczas gdy sacharoza i glukoza są równo rozmieszczone we wszystkich warstwach [8]. Z kolei FOS, wykazujące różny stopień polimeryzacji, są głównym materiałem zapasowym w cebulkach tej rośliny [5]. Gromadzą się one podczas ich tworzenia, przy czym proces ten jest najintensywniejszy na etapie wzrostu i kiełkowania. Wśród FOS wyznaczono obecność: trisacharydów (DP 3) tj.: 1-kestoza i neokestoza; tetrasacharydów (DP 4) tj.: nystoza, 1,6G-kestotetroza, 1i6G-kestotetoza; pentosacharydów (DP 5) tj.: 1,1,1-kestopentoza, 1,1,6G-kestopentoza, 1,1i6G-kestopentoza, 1i1,6G-kestopentoza oraz oligofruktozy i inuliny, których stężenia stanowiły odpowiednio 11%, 10%, 8%, 2–6% i 2–6% wobec ogólnej zawartości nie trawionych węglowodanów w cebulkach tej rośliny [4, 20]. Niemniej jednak, DP fruktanów zawartych w cebulkach tej rośliny może sięgać od 3 do 15 [25], badanie zaś Galdón i in. [15], wykazało różnice w zawartości poszczególnych cukrów prostych, całkowitej zawartości fruktanów oraz stosunku stężenia fruktozy do stężenia glukozy między poszczególnymi odmianami uprawnymi. Wyniki tego badania są zgodne z rezultatami poprzednio opublikowanych badań m.in. Jaime i in. [23], O'Donoghue i in. [40] oraz Rodrigues i in. [49].

Kolejnym przedstawicielem rodziny *Liliaceae* jest szparag dziki (*Asparagus racemosus* L.) nazywany również Satavar, Shatavari lub Shatamull [59]. Jest gatunkiem byliny, a zarazem jedynym przedstawicielem rodzaju *Asparagus*, który zawiera jadalne części w postaci młodych pędów, potocznie nazywanych szparagami. Występuje naturalnie w obszarze śródziemnomorskim i na terenach przyległych, przy czym głównym miejscem jego bytowania są Indie i Himalaje. W Polsce rośnie w południowej części kraju. Preferuje gleby żwirowe i kamieniste, które występują na terenach nizinnych, a także na zboczach gór [66]. Jednakże to jego bulwiaste korzenie (zwane inaczej korzeniami spichrzowymi) oraz kłącza są cennym materiałem roślinnym pod względem zawartości fruktanów, których obecność oznaczono w ich wodnych wyciągach w ilości ponad 15% fruktanów typu neoinulin [50], a wśród nich izokestozy i neokestozy oraz fruktanów o  $3 \leq DP \leq 8$  oraz  $9 \leq DP < 20$  [52].



## Rodzina Poaceae

Wiechlinowate (*Poaceae*), według zaś starszego nazewnictwa trawy (*Gramineae* JUSS.) – jest to rodzina roślin, głównie zielnych, należąca do klasy jednoliściennych. W jej obrębie występuje około 850 rodzajów i około 11 tys. gatunków kosmopolitycznych. W Polsce występuje ponad 150 gatunków traw. Stanowi ona główny komponent roślinności stepowej, łąkowej i pastwiskowej. Należą do niej również ważne rośliny uprawne, w tym zboża [44]. Fruktanami charakterystycznymi dla tej rodziny są liniowe lewany i neolewany oraz rozgałęzione fruktany typu mieszanego, za których syntezę odpowiedzialne są enzymy tj.: 1-SST (sacharozo : sacharozo 1-fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.1.99), 6-SFT (sacharozo : fruktan 6- fruktozylotransferaza, EC 2.4.1.1.10), lewanosacharaza (lewan 2,6- $\beta$ -D-fruktan) [45]. Jednakże zdolność do syntezy i gromadzenia rozpuszczalnych cukrów, skrobi i fruktanów, mają wyłącznie zimowe gatunki traw oraz owies będący zbożem jarym, miejscem zaś gromadzenia się tych węglowodanów są ich organy wegetatywne tj. łodygi, liście i owoce (ziarniaki) [7].

Wśród przedstawicieli tej rodziny występują m.in. pszenica, żyto, jęczmień, owies, tymotka, życica trwała, perz, stokłosa oraz kupkówka.

**Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.)** – jest gatunkiem zbóż uprawianym powszechnie w strefie umiarkowanej Eurazji oraz Ameryki Północnej [67]. Badanie przeprowadzone przez Livingstona i in. [32] wykazało zawartość bardzo złożonej mieszaniny fruktanów, o DP mieszczącym się w przedziale od 5 do 10, która oparta jest na trisacharydzie neokestozie, u którego do obydwu łańcuchów jednostek  $\beta$ -D-fruktofuranozy, zarówno z wiązaniami  $\beta(1-2)$  i  $\beta(2-6)$ -glikozydowymi, przyłączona zostaje kolejna jednostka  $\beta$ -D-fruktofuranozy. Co więcej, wykazano że głównymi fruktanami występującymi w organach wegetatywnych owsa są FOS o DP 3, a są nimi 1-kestoza oraz 6G-kestoza (neokestoza). Z kolei, w obrębie FOS o DP 4 występują 1,1-ketotetroza (nystoza), 1,6G-ketotetroza, 6G,1-ketotetroza oraz 6G,6-ketotetroza. Oprócz tego, odkryto również FOS o DP 5, które występują w postaci 7 różnych izomerów [22]. Dalsze badania Livingstona i in. [33] wykazały również odmienne rozmieszczenie różnych typów węglowodanów w zależności od analizowanej części i odmiany rośliny oraz jej aklimatyzacji wobec niskich zimowych temperatur. Skłonność do gromadzenia cukrów prostych oraz krótkołańcuchowych fruktanów o DP 5 w ww. warunkach odnotowano wyłącznie w przypadku owsa odmiany ‘Wintok’. Co więcej, szybkość ich gromadzenia się była większa w obszarze wierzchołkowym (kompleksie merystemu) aniżeli w niższych częściach jej łodygi. Wyników takich nie odnotowano w przypadku najmniej odpornej na zimno odmiany owsa jaką jest ‘Fulghum’. Wyniki tego badania są zgodne z ogólnie przyjętą tezą Trunovej [55], według której przyrost stężenia fruktanów w określonych częściach rośliny pociąga za sobą przyrost ich odporności na mróz.

**Żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.)** – jest gatunkiem zbóż uprawianym w północno-wschodniej Europie. Zostało rozpowszechnione jako jednoroczna roślina ozima, rzadziej jara. Uprawiane jest na glebach lekkich [67]. Wykazano, że głównymi fruktanami występującymi w organach wegetatywnych żyta są FOS o DP 3, a są nimi 1-kestoza i 6-kestoza. Z kolei, w obrębie FOS o DP 4 występują 1,1-ketotetroza oraz 1,6-ketotetroza [22].

**Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.)** – jest gatunkiem zbóż, a zarazem kosmopolityczną rośliną uprawną, której największe uprawy znajdują się w Europie, wschodniej Azji oraz Indiach, obu Amerykach a także Australii. W uprawie wykorzystywane są różne odmiany gatunków jarych jak i ozimych, w zależności od ich przeznaczenia użytkowego (np. odmiany jakościowe, chlebowe, na ciastka) [67]. Liczne badania wykazały, że w przypadku pszenicy, głównym czynnikiem determinującym stężenie fruktanów w ziarnach jest faza ich dojrzałości [37]. Potwierdzeniem tego są wyniki badania Bancala i in. [2], w którym największą zawartość fruktanów odnotowano w jej niedojrzałych ziarnach w okresie tzw. fazy mleczej. Według Wanga i Nobela [64], prawdopodobną przyczyną takiego rezultatu jest proces wypełniania niedojrzałych ziaren pszenicy w zależności od zawartości węgla pochodzącego z dwóch źródeł: aktualnej asymilacji i aktywacji rezerw zgromadzonych w łodydze zarówno przed jak i po jej zakwitnięciu. Dowodzą temu także rezultaty badań Paradiso i in. [40] oraz Van Loo i in. [56], w których wykazano, że stężenie fruktanów zmniejsza się już między drugim a trzecim tygodniem po zakwitnięciu łodygi pszenicy i wynosi zaledwie od 1 do 4%. Z kolei, Dahlqvist i Nilsson [12] w swym badaniu wyznaczyli skład fruktanów zgromadzonych w ziarnach pszenicy. Według nich około 30% stanowią fruktany o DP 3, 13% fruktany o DP 4, 6% fruktany o DP 5, 50% zaś fruktany o DP 5. Według nowszych wyników badań są to głównie 6-kestotrioza oraz fruktany typu mieszanego oparte na 1,6-kestotetrozie [27], których głównym miejscem gromadzenia się są liście oraz wierzchołkowe tkanki łodyg w przeciwieństwie do jej niższych części, w których dominują głównie fruktany typu phlein, co jest zgodne z wynikami badania Bancala i in. [2]. Co więcej, badanie Yanga i in. [65] wykazało, że w wyniku procesu aklimatyzacji pszenicy, miejscem magazynowania fruktanów stają się, oprócz liści i tkanek wierzchołkowych łodyg, również tkanki źdźbła [1].

**Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.)** – jest gatunkiem zbóż uprawianym w Europie, Azji, Afryce, USA, Argentynie. W Polsce jest pospolitą rośliną uprawną [68]. Wang i Tillberg [62, 63], jako pierwsi odkryli, że miejscem gromadzenia się fruktanów u jęczmienia są liście. Badanie to wykazało również, iż gromadzenie skrobi zachodziło po lub też w mniejszym stopniu niż akumulacja fruktanów. Z kolei Wagner i in. [60] ustalili, że stanowią one 75% suchej masy liści jęczmienia, pod względem struktury zaś zaliczane są do mieszanego typu fruktanów [38]. Z kolei Gulewicz i in. [20] podają, że zawartość inuliny i oligofruktozy w ziarnach jęczmienia kształtuje się na poziomie od 0,5 do 1,5%.

## Rodzina *Agavaceae*

Agawowate (*Agavaceae*) – to rodzina roślin należących do klasy okrytonasiennych, która obejmuje około 247 gatunków sukulentów liściowych lub drzew i która zaliczana jest do endemicznych (czyli występujących na ściśle określonym obszarze) na kontynencie Ameryki Południowej. Głównym przedstawicielem tej rodziny jest rodzaj *Agave*, którego ojczyzną jest Meksyk [66]. Do czynników pozytywnie wpływających na wzrost wszystkich gatunków agaw zalicza się: ciepły, śródziemnomorski klimat oraz dużą zawartość soli wapnia i żelaza w glebie [42]. Rośliny te zbudowane są z gruboszowatych bylin o skróconej łodydze i grubych liściach o kolczastych brzegach, które zebrane są w przyziemną rozetę. Mają one również liczne, niepozorne kwiaty o różnych barwach, w tym m.in. zielonkawej, żółtej lub brunatnej, które zebrane są na szczycie tworząc wiechę lub kłos. Agawa jest sukulentem, ponieważ kwitnie tylko raz (po kilkunastu lub kilkudziesięciu latach życia), po czym wydaje owoce, a następnie obumiera [44]. López i in. [34] przeprowadzili badanie, które wykazało, że agawy wykorzystują metabolizm kwasowy gruboszowatych bylin (ang. *Crasulaceam Acid Metabolism – CAM*) dla wiązania CO<sub>2</sub>, dzięki temu podstawowym produktem tej fotosyntezy są fruktany. Początkowo twierdzono, iż głównym miejscem syntezy i gromadzenia się fruktanów są łodygi agaw, jednakże badanie Wang i Nobla [64] dowiodło, że największe stężenia fruktanów występują w naczyniowych tkankach łyka agaw i są prawie nieobecne zarówno w chlrenchymie i miąższu dojrzałych liści.

Skład chemiczny wszystkich gatunków agaw jest złożony i do chwili obecnej nie do końca zidentyfikowany [17].

Jednym z najbardziej znanych gatunków agaw jest *Agave tequilana* WEBER var. *azul.*, który taksonomicznie został sklasyfikowany jako członek grupy *Ridigea*. Warty uwagi jest również fakt, że oprócz odmiany „azul”, istnieje także szereg innych, w tym m.in. „azul listado”, „sigüin”, „moraleño”, „chato” lub „sahuayo”, „bermejo”, „zopilote”, „pata de mula” lub „criollo” i „mano larga” [16]. Jednakże to odmiana „azul” jest preferowana już od ponad 200 lat, z powodu jej stosunkowo krótkiego cyklu życia i dużej wydajności gromadzenia fruktanów, które jako składnik soku pozyskiwanego z jej rdzenia (tzw. piña) wykorzystywane są do produkcji tequili, czyli najszlachetniejszej meksykańskiej wódki. Badanie López i in. [34] wykazało, że fruktany obecne w liściach *Agave tequilana* WEBER var. *azul.* mają stopień polimeryzacji rzędu od 3 do 29 jednostek oraz że należą do fruktanów typu mieszanego oraz agavins, a nie inulin, jak dotychczas myślano. Z kolei, Mancilla-Margalli i López [35] dowiedli różnic strukturalnych między fruktanami występującymi w agawach gatunku *A. tequilana* rosnących w różnych regionach środowiskowych. Różnorodność tą wytłumaczono faktem odmiennych mechanizmów adaptacji tych roślin do trudnych warunków środowiskowych, w których bytują.

Z kolei fruktany wyizolowane z *Agava americana*, rosnącej i uprawianej w Południowej Afryce, są obecnie stosowane do produkcji spirytusu. W trakcie badania struk-

tury węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie w celu rozwoju i ułatwienia zastosowania innych dodatków wyciągowych, przebadano także strukturę fruktanów. Badanie to wykazało, że cukrowce te mają stopień polimeryzacji (DP) rzędu od 6 do 50 jednostek oraz strukturę charakterystyczną dla fruktanów typu mieszanego [43].

W tabeli 1 przedstawiono zawartość fruktanów w wybranych produktach spożywczych.

**Tabela 1.** Zawartość fruktanów w wybranych produktach spożywczych [źródło: 58]

Produkty zawierające fruktany	Porcja produktu	Zawartość fruktanów [g]	
		w 100 g produktu	w 1 porcji produktu
Produkty pszenne:			
otręby	4 g	1,4–4,0	0,1
chleb (biały)	2 kromki (65 g)	0,7–2,8	1,8
makaron ugotowany	1 miseczka (165 g)	1,4–4,1	2,5
pełnoziarniste płatki śniadaniowe	1 miseczka (60 g)	0,8–3,2	1,9
krakersy	2 sztuki (40 g)	0,8–3,4	1,4
pieczywo chrupkie	2 kromki (30 g)	1,0–3,8	1,1
Produkty żytnie:			
mąka	100 g	0,5–1,0	0,1
(100%) chleb żytni	2 kromki (65 g)	0,35–0,63	0,4
pieczywo chrupkie	2 kromki (30 g)	0,4–0,72	0,2
Ziarna jęczmienia	100 g	0,3–0,7	0,7
Cykoria korzeniowa (proszek)	0,5 szklanki (75 g)	35,7–47,6	30,4
Napoje zawierające wyciąg z cykorii korzeniowej jako zamiennik kofeiny	1,5 łyżeczki (7 g)	35,7–47,6	3,0
Cebula	2 łyżki (35 g)	1,1–10,1	2,1
Por	0,5 miseczki (85 g)	3,0–10,0	5,6
Szparagi	6 sztuk (90 g)	1,4–4,1	2,6
Czosnek	1 ząbek (3 g)	9,0–16,0	0,5
Główka karczocha	1 średnia (120 g)	2,0–6,8	5,5
Topinambur (proszek)	0,5 szklanki (75 g)	16,0–20,0	15,0
Banany	1 średni (90 g)	0,3–0,7	0,6

## Podsumowanie

W pracy przedstawiono przegląd najnowszego piśmiennictwa krajowego i zagranicznego dotyczącego charakterystyki fruktanów i źródeł ich występowania. Zwrócono uwagę na wpływ pewnych czynników na stężenie fruktanów w różnych częściach tych roślin oraz na ich strukturę chemiczną w aspekcie możliwości ich wykorzystania w przemyśle spożywczym, chemicznym i farmaceutycznym – jako żywności funkcjonalnej.

## Literatura

- [1] Bancal P., Gaudillère J.P. 1989. Rate of accumulation of fructan oligomers in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) during the early stages of chilling treatment. *New Phytol.* 112: 459–463.
- [2] Bancal P., Carpita N.C., Gaudillère J.P. 1992. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytol.* 120: 313–321.
- [3] Baumgartner S., Dax T. G., Praznik W., Falk H. 2000. Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydr. Res.* 328(2): 177–183.
- [4] Benkeblia N., Onodera S., Shiomi N. 2004. Effect of gamma irradiation and temperature on fructans (fructooligosaccharides) of stored onion bulbs *Allium cepa* L. *Food Chem.* 87(3): 377–382.
- [5] Benkeblia N., Takahashi N., Ueno K., Onodera S., Shiomi N. 2005. Tetra- and penta-fructooligosaccharide (FOS) isomers assessment in onion bulb tissues: effect of temperature and storage time. *Tetra. Assym.* 16(1): 33–37.
- [6] Bielecka M., Biedrzycka E., Majkowska A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Inter.* 35(2–3): 125–131.
- [7] Chatterton N.J., Watts K.A., Jensen K.B., Harrison P.A., Horton W.H. 2006. Nonstructural carbohydrates in oat forage. *J. Nutr.* 136: 2111–2113.
- [8] Chope G.A., Terry L.A., White P.J. 2007. The effect of the transition between controlled atmosphere and regular atmosphere storage on bulbs of onion cultivars SS1, Carlos and Renate. *Post. Biol. Tech.* 44: 228–239.
- [9] Cieślík E., Proszak A., Pisulewski P.M. 2001. Funkcjonalne właściwości fruktanów. *Żyw. Nauka. Technol. Jakość* 1(26): 5–13.
- [10] Cieślík E. 2004. Cechy funkcjonalne żywności pochodzenia roślinnego. VI Krajowe Warsztaty Żywieniowe, Postępy w epidemiologii i ocenie żywności funkcjonalnej, Sesja I: 11–12.
- [11] Cieślík E. 2005. Zawartość azotanów (V) i azotanów (III) w bulwach topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Ekologii* Nr kol. 1.
- [12] Dahlqvist A., Nilsson U. 1984. Cereal fructosans: Part I – Isolation and characterization of fructosans from wheat. *Food Chem.* 14: 103–112.
- [13] Darbyshire B., Henry R.J. 1978. The distribution of fructans in onions. *New Phytol.* 81: 29–34.
- [14] Florkiewicz A., Cieślík E., Filipiak-Florkiewicz A. 2007. Wpływ odmiany i terminu zbioru na skład chemiczny bulw topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). *Żyw. Nauka. Technol. Jakość* 3(52): 71–81.
- [15] Rodríguez Galdón B., Tascón Rodríguez C., Rodríguez Rodríguez E.M., Díaz Romero C. 2009. Fructans and major compounds in onion cultivars (*Allium cepa*). *J. Food Comp. Anal.* 22(1): 25–32.
- [16] Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci.* 170: 904–909.
- [17] Giżyńska M., Matławska I. 2007. Znaczenie gatunków z rodzaju *Agawa*. *Herba Polonica* 53(2).
- [18] Góral S. 1998. Zmienność morfologiczna i plonowanie wybranych klonów słonecznika bulwiastego – topinambur (*Helianthus tuberosus* L.). *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 2: 6–11.
- [19] Griffiths G., Trueman L., Crowther T., Thomas B., Smith B. 2002. Onions – a global benefit to health. *Phy. Res.* 16: 603–615.
- [20] Gulewicz P., Powałowski S., Trojanowska K. 2003. Charakterystyka ważniejszych prebiotyków. *Żyw. Nauka. Technol. Jakość* 34(1 Supl.): 27–39.
- [21] Gupta A.K., Kaur N. 2001. Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation developments in crop science 26. *Plant Sci.* 161: 1183–1184.
- [22] Hinch D.K., Livingston D.P., Premakumar R., Zuther E., Obel N., Cacula C., Heyer A.G. 2007. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 1611–1619.
- [23] Jaime L., Martín-Cabrejas M.A., Mollá E., López-Andréu F.J., Esteban R.M. 2001. Effect of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 49: 982–988.
- [24] John P. 1994. Control of fructan metabolism in the Compositae. Proc. of the International Compositae Conference, 111–119.
- [25] Kahane R., Vialle-Guérin E., Boukema I., Tzanoudakis D., Bellamy Ch., Chamaux Ch., Kik Ch. 2001. Changes in non-structural carbohydrate composition during bulbing in sweet and high-solid onions in field experiments. *Environ. Exp. Bot.* 45: 73–83.

- [26] Karczmarewicz E., Skorupa E., Lorenc S.R. 2002. Wpływ probiotyków i prebiotyków na gospodarkę wapniowo-fosforanową i metabolizm kostny. *Ped. Wspól., Hepat. i Żyw. Dziecka* 4(1): 63–69.
- [27] Kawakami A., Yoshida M. 2005. Fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta* 223: 90–104.
- [28] Kleessen B., Hartmann L., Blaut M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* 86 (2): 291–300.
- [29] Knudsen K.E.B. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67: 319–338.
- [30] Kolida S., Gibson G.R. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J. Nutr.* 137: 2503–2506.
- [31] Kubik C., Piasecka K., Anyszka A., Bielecki S. 2006. Polifruktany i fruktooligosacharydy (FOS) – występowanie, otrzymywanie i zastosowanie. *Biotech.* 2(73): 103–116.
- [32] Livingston III DP, Knieval D.P., Gildow F.E. 1994. Fructan synthesis in oat. 1. Oligomer accumulation in stems during cold hardening and their in vitro synthesis in a crude enzyme extract. *New Phytol.* 127: 27–36.
- [33] Livingston D., Premakumar R., Tallury S.P. 2005. Carbohydrate concentrations in crown fractions from winter oat during hardening at sub-zero temperatures. *Ann. Bot.* 96: 331–335.
- [34] López M.G., Mancilla-Margalli N.A., Mendoza-Diaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* WEBER var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51(27): 7835–7840.
- [35] Mancilla-Margalli N.A., López M.G. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasylirion* species. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7832–7839.
- [36] McCallum J., Clarke A., Pither-Joyce M. 2006. Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content. *Theor. Appl. Genet.* 112: 958–967.
- [37] Merendino N., D’Aquino M., Molinari R., De Gara L., Grazia M. D’Egidio, Paradiso A., Cecchini C., Corradini C., Tomassi G. 2006. Chemical characterization and biological effects of immature durum wheat in rats. *J. Cereal Sci.* 43: 129–136.
- [38] Nagaraj V.J., Riedl R., Boller T., Wiemken A., Meyer A.D. 2001. Light and sugar regulation of the barley sucrose : fructan 6-fructosyltransferase promoter. *J. Plant Physiol.* 158: 1601–1607.
- [39] O’Donoghue E.M., Somerfield S.D., Shaw M., Bendall M., Hedderly D., Eason J. 2004. Evaluation of carbohydrates in Pukekohe Longkeeper and Grano cultivars of *Allium cepa*. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5383–5390.
- [40] Paradiso A., Cecchini C., de Pinto M.C., De Gara L., D’Egidio M.G. 2003. Fructans and vitamin C contents in immature and mature kernels of *Triticum durum* and their wholemeal. Proceedings of Second International Workshop ‘Durum Wheat and Pasta Quality, Recent Achievements and New Trends’: 219–221.
- [41] Pozzo A.M.C., Abrameto M., Pellejero G., Aschkar G., Gil M.I., Van Konijnenburg A. 2005 Efecto del periodo de conservación sobre algunas propiedades nutracéuticas y organolépticas en los bulbos de cultivares nacionales de cebollas (*Allium cepa* L.) en el valle inferior de Río Negro. *Revista Investigaciones Agropecuarias* 34: 115–130.
- [42] Praznik, W., Huber, A., and Cieślík, E. 2004. Fructans: occurrence and applications in food. Chemical and Functional Properties of Food Saccharides. CRS Press LLC, the USA.
- [43] Ravenscroft N., Cescutti P., Hearshaw M.A., Ramsout R., Rizzo R., Timme E.M. 2009. Structural analysis of fructans from *Agave americana* grown in South Africa for spirit production. *J. Agric. Food Chem.* 57(10): 3995–4003.
- [44] Reveal J.L. 1999. System of Classification, Plant Taxonomy, Department of Plant Biology. University of Maryland.
- [45] Ritsema T., Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 223–230.
- [46] Roberfroid M.B., Slavin J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 461–480.
- [47] Roberfroid M.B. 2000. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition* 16(7/8): 677–679.
- [48] Roberfroid M.B. 2007. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *J. Nutr.* 137: 2493–2502.
- [49] Rodrigues A.S., Fogliano V., Graziani G., Mendes S., Vale A.P., Gonçalves C. 2003. Nutritional value of onion regional varieties in Northwest Portugal. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2: 519–524.
- [50] Singh R.S., Dhaliwal Rajesh, Puri Munish 2006. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Proc. Bioch.* 41: 1703–1707.
- [51] Shiomi N. 1979. Isolation and identification of 1-kestose and neokestose from onion bulbs (*Allium cepa*). *J. Faculty Agric. Hokkaido Uni.* 58: 548–556.

- [52] Shiomi N. 1992. Content of carbohydrate and activities of fructosyltransferase and invertase in asparagus roots during the fructooligosaccharide- and fructopolysaccharide accumulating season. *New Phytol.* 122: 421–432.
- [53] Thakur M., Bhargava S., Dixit V.K. 2009. Effect of *Asparagus racemosus* on sexual dysfunction in hyperglycemic male rats. *Pharmaceut. Biol.* 47(5): 390–395.
- [54] Trafalska E., Grzybowska K. 2004. Probiotyki – alternatywa dla antybiotyków? *Wiad. Lek.* 57(9–10).
- [55] Trunova T.L. 1965. Light and temperature systems in the hardening of winter wheat and the significance of oligosaccharides for frost resistance. *Fiziol. Rast.* 12: 70–77.
- [56] Van Loo J., Coussement P., de Leenheer L., Hoebregs H., Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 525–552.
- [57] Van Loo J. 2007. How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion Animals. *J. Nutr.* 137: 2594–2597.
- [58] Venter C.S. 2007. Prebiotics: an update. *JFECS* 35: 17–25.
- [59] Visavadiya N.P., Narasimhacharya R.L. 2005. Hypolipidemic and antioxidant activities of *Asparagus racemosus* in hypercholesteremic rats. *Indian J. Pharm. Sci.* 37(6): 376–380.
- [60] Wagner W., Keller F., Wiemken A. 1983. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z Pflanz.* 112: 359–372.
- [61] Waleckx E., Gschaedler A., Colonna-Ceccaldi B., Monsun P. 2008. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* WEBER var. *azul* during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chem.* 108: 40–48.
- [62] Wang C., Tillberg J.E. 1996. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 97: 339–345.
- [63] Wang C., Tillberg J.E. 1997. Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* 136: 131–135.
- [64] Wang N., Nobel P.S. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol.* 116: 709–714.
- [65] Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L. 2004. Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331–343.
- [66] Zając A., Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zając M. 2002. Flowering plants and pteridophytes of Poland: a checklist. Krytyczna lista roślin naczyniowych Polski. Instytut Botaniki PAN im. Władysława Szafera w Krakowie, ISBN 83-85444-83-1.
- [67] Zamudio D.M., Pinos-Rodríguez J.M., González S.S., Robinson P.H., García J.C. and Montañez O. 2009. Effects of *Agave salmiana* OTTO ex SALM-DYCK silage as forage on ruminal fermentation and growth in goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148: 1–11.

## Fructans and their occurrence in cultivated plants

**Key words:** fructans, chemical composition, characterization of their sources

### Summary

Fructans, or polyfructosylsucroses, are water-soluble polymers of fructose build upon a  $\beta$ -D-fructofuranosyl units linked to each other by  $\beta$ (2-1) and/or  $\beta$ -(2,6) bonds, meanwhile a glucose moiety may be linked to the reducing end of the chain by an  $\alpha$ -(1->2) bond.

Five different groups of fructans are found in the nature and can be distinguished according to the type of linkage in structure and the position of glucose moiety. These groups consist of inulins, neoseris inulins, levans (produced by bacteria)/phleins (produced by plants), neoseris levans, and the mixed fructans group (graminan).

The reason for the variety of fructans structures in plants is unknown, however, summing up the results of many studies, it was assumed that the central role is played by factors such as: plant species, plant part, stage of development (mature) and environmental conditions, including temperature (especially during the growth of roots and shoots), the intensity of insolation and its time, and the availability of food and water status.

Characteristic fructans for *Asteraceae* DUM., formerly *Compositae* GIS. family are linear inulin type fructan. Two enzymes are responsible for inulin type fructan synthesis like 1-SST, 1-FFT - for plants, and only one enzyme – fructosyltransferase – for most bacteria. Among the members of this family are: chicory, Jerusalem artichoke, bananas, common dandelion (medical), larger burdock, dahlia, daisy wormwood, tropical mangrove trees.

Characteristic fructans for *Liliaceae* JUSS. family are linear neo inulin-type fructan. There is one enzyme responsible for neo inulin synthesis. This is 6G-FFT. Among members of this family are: garlic, onion, pore, asparagus.

Characteristic fructans for *Poaceae* family are linear levane and neo levane and mixed fructans (graminan). Three enzymes are responsible for their synthesis: 1-SST, 1-FFT, levansucrase. Among the members of this family are: wheat, rye, barley, oat, timothy, perennial ryegrass, wheatgrass, orchardgrass and bromegrass.

The chemical composition of all species of agaves from the family *Agavaceae* is folded and still not completely understood. To this family belong: *Agave tequilana* WEBER var. *azul.*, *Agava forucroydes* LEM., *Agave salmiana*, *Agava Americana*, in which found mixed fructans group (graminan) and agavins and not inulin, as it was previously thought. Of these, the economically important species for Mexican agro-industry is *Agave tequilana* WEBER var. *azul* not only because it is only one plant allowing to production of Mexico's most famous vodka – tequila, but it is also because of a high content of fructans.



## **Wpływ selenu i niskocząsteczkowych antyoksydantów na jakość nasienia zwierząt gospodarskich**

*Zofia Luberda-Bieńkowska, Anna Majewska*

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,  
ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn  
e-mail: luberda@uwm.edu.pl*

**Słowa kluczowe:** nasienie zwierząt, status antyoksydacyjny, selen,  $\alpha$ -tokoferol, kwas L-askorbinowy, glutation

### **Wstęp**

Wartość biologiczna nasienia zwierząt w dużym stopniu jest wyznaczana przez jego status antyoksydacyjny, czyli jego odporność na stres oksydacyjny. Męskie komórki rozrodcze są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu (RFT), które w niewielkich ilościach są niezbędne dla zapewnienia prawidłowego przebiegu procesu zapłodnienia. Jednakże pojawienie się tych metabolitów w nadmiarze wywołuje stan określany stresem oksydacyjnym. Stan ten pojawia się wówczas, kiedy zostaje zachwiana równowaga między systemami generującymi RFT, a antyoksydacyjnymi mechanizmami obronnymi w komórce.

Stres oksydacyjny jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za zakłócenie funkcji biologicznych nasienia. W wyniku peroksydatywnych uszkodzeń fosfolipidów błonowych następuje naruszenie integralności plazmolemy, a w dalszej kolejności uszkodzenie chromatyny plemników. Ulegają zakłóceniu procesy energetyczne. Obniża się przeżywalność i ruchliwość plemników, zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym [14, 21]. Zakłóceniom mogą również ulegać ostatnie etapy procesu zapłodnienia w tym reakcja akrosomowa czy fuzja plemnik–oocyt [20]. Prawidłowa homeostaza oksydacyjna komórek znajdujących się w układach biologicznych wytwarzana jest przez różne systemy, które zapewniają odpowiednie poziomy RFT, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek.

Do podstawowego enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego męskich komórek rozrodczych można zaliczyć dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, reduktazę glutationową czy peroksydazę glutationową, która w swej budowie zawiera selen. Powyższe systemy enzymatyczne są wspierane przez niskocząsteczkowe antyoksydanty takie jak m.in.  $\alpha$ -tokoferol, glutation czy kwas L-askorbinowy.

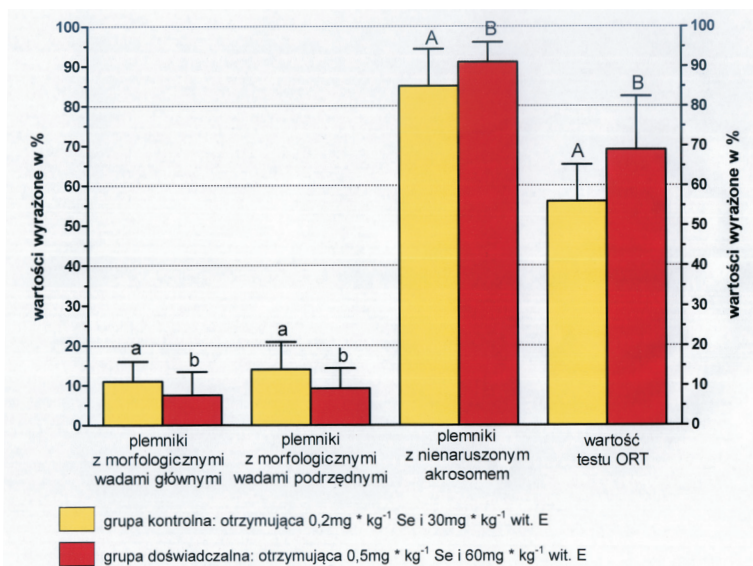
Badania ostatnich lat wykazały, że status antyoksydacyjny nasienia zwierząt można znacznie poprawić przez odpowiednią suplementację diety. Celem prezentowanej pracy jest przegląd współczesnego piśmiennictwa światowego, dotyczącego wpływu suplementacji diety selenem i niskocząsteczkowymi antyoksydantami na wskaźniki rozrodcze nasienia, mające istotne znaczenie dla procesów reprodukcji zwierząt gospodarskich.

## Wpływ selenu

Suplementacja diety samców selenem wpływa pozytywnie zarówno na cechy jakościowe nasienia jak i jego wartość biologiczną. W wielu badaniach wykazano, że żywienie knurów selenem od 0,3 do 0,5 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> diety wpływa korzystnie na produkcję nasienia, ruchliwość, morfologię plemników oraz płodność tych zwierząt [8, 13, 16, 17, 18]. Selen stymuluje także aktywność peroksydazy glutationowej w plazmie nasienia, plemnikach oraz jądrach zwierząt. Wzrost aktywności peroksydazy glutationowej – jednego z głównych enzymów antyoksydacyjnych – z kolei wzmacnia ochronę plemników przed stresem oksydacyjnym [13, 22].

Niedobór selenu w żywieniu zwierząt może prowadzić do zaburzeń strukturalnych i funkcjonalnych ich materiału genetycznego. W plemnikach knurów żywionych dietą niskoselenową występują uszkodzenia strukturalne mitochondriów. Znacznie obniża się poziom ATP. Suplementacja diety selenem (0,5 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) skutecznie zapobiega uszkodzeniom morfologicznym struktur plemnikowych i pobudza syntezę energii, co pozytywnie przekłada się na ruchliwość omawianych gamet [18]. Pozytywny wpływ selenu na morfologię męskich komórek rozrodczych wiąże się z jego funkcją strukturalną, bowiem mikroelement ten jest składnikiem selenoprotein w obszarze wstawki plemnika. Przy odpowiedniej diecie selenowej wraz ze wzrostem jakości plemników rośnie ich zdolność zapładniająca. Marin-Guzman i in. [16] wykazali, że plemniki knurów żywionych selenem (0,5 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) mają większą zdolność penetracji osłony przejrzystej oocytów podczas procesu zapłodnienia.

Badania wielu autorów [11, 13, 16, 18] wykazały, że znacznie korzystniejsze efekty w procesach reprodukcyjnych zwierząt uzyskuje się przy zastosowaniu w ich żywieniu zwierząt selenu łącznie z witaminą E. Suplementacja diety knurów odpowiednimi dawkami selenu w połączeniu z tą witaminą wpływa korzystnie m.in. na koncentrację i morfologię plemników, integralność błon komórkowych czy zdolność zapładniającą nasienia. Obserwacje te wykazały, że oba te suplementy działają synergistycznie z tym, że większą rolę przypisuje się selenowi [16]. U młodych knurów, którym zwiększono w kilogramie paszy zawartość selenu drożdżowego z 0,2 do 0,5 mg oraz witaminy E



**Rysunek 1.** Wybrane parametry nasienia knurów żywionych dietą suplementowaną selenem i witaminą E; opracowanie własne według danych Kołodziej i Jacyno [13]  
 Wartości oznaczone literami a, b różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ )  
 Wartości oznaczone literami A, B różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,01$ )

z 30 do 60 mg, odnotowano wyższą koncentrację plemników oraz ich ogólną liczbę w ejakulacie w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie obniżył się odsetek plemników z wadami morfologicznymi. Odnotowano także znaczny wzrost osmotycznej oporności błon plemników (ORT – osmotic resistance test) (rys. 1). Kolejny wyznacznik integralności błon komórkowych, a mianowicie „wyciek” aminotransferazy asparaginianowej z plemników do plazmy był również niższy u wspomnianych zwierząt żywionych dietą z podwyższoną zawartością selenu i witaminy E [13].

Należy podkreślić, że nasienie knurów żywionych dietą suplementowaną selenem charakteryzuje się lepszymi parametrami jakościowymi i biologicznymi podczas przechowywania w stanie płynnym w porównaniu do nasienia osobników pozbawionych tego mikroelementu [8]. Warto również wspomnieć o badaniach, w których określano wpływ selenu aplikowanego zwierzętom w formie iniekcji na wartość ich materiału genetycznego. W badaniach na trykach wykazano, że comiesięczna iniekcja selenu przez cały rok miała korzystny wpływ na jakość uzyskiwanego od nich nasienia, w tym koncentracji, ruchliwości czy morfologii plemników. Poza tym systematyczne iniekcje tego pierwiastka spowodowały wyrównanie wyżej wymienionych parametrów jakościowych nasienia w ciągu roku [19]. Należy również nadmienić o badaniach, które nie potwierdziły pozytywnego efektu selenu na parametry nasienia. I tak dla przykładu Hawkes i in. [9] nie odnotowali wpływu suplementacji diety selenem na jakość nasienia mężczyzn, pomimo znacznego wzrostu stężenia tego pierwiastka w surowicy krwi i plazmie nasienia badanych osobników.

## Udział selenu w spermatogenezie

Strategiczny dla procesów rozrodczych jest udział selenu w procesie wytwarzania i dojrzewania męskich komórek rozrodczych. Selen bierze istotny udział w powstawaniu komórek Sertoliego i komórek rozrodczych w rozwijających się jądrach. Wykazano [4, 18], że już we wczesnych etapach spermatogenezy Se zostaje włączony do selenoprotein wstawki plemnika.

W interesujących badaniach Marin-Guzman i in. [17] określali wpływ selenu na proces spermatogenezy knurów w różnym wieku. Badania przeprowadzono na knurach żywionych suplementowaną selenem paszą ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) od momentu odsadzenia do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Autorzy ci wykazali, że knury w wieku 6,2 miesięcy, żywione dietą z selenem w porównaniu z osobnikami kontrolnymi (bez selenu) charakteryzowały się znacznie wyższą liczbą komórek Sertoliego oraz spermatyd. Dorosłe knury (18 miesięcy) żywione selenem charakteryzowały się nieco niższym stopniem wzrostu populacji komórek Sertoliego i spermatyd niż młode osobniki. Istotnie natomiast wzrosła liczba spermatocytów II rzędu, a populacja spermatocytów I rzędu wykazywała tendencję wzrostową. Badania te jednoznacznie wykazały, że wpływ Se na populację komórek Sertoliego był znacznie wyższy u knurów w wieku 6,2 miesięcy niż u osobników dorosłych. Jeżeli chodzi natomiast o rozwój komórek rozrodczych to oddziaływanie selenu zaznacza się bardziej u osobników dorosłych.

Marin-Guzman i in. [17] wykazali również, że Se u dorosłych knurów wywiera zasadniczy wpływ na całkowitą liczbę plemników w jądrach. U młodych osobników (5,4 i 6,2 miesięcy) cytowani autorzy nie odnotowali takich zależności, a niewielka tendencja wzrostowa populacji tych komórek pojawiła się u knurów w wieku 9 miesięcy. Dopiero u dojrzałych płciowo knurów (18 miesięcy) całkowita liczba plemników w jądrach uległa znacznemu podwyższeniu. Prezentowane powyżej badania potwierdziły, że selen jest niezbędny zarówno na etapie różnicowania komórek gametogenicznych w gonadzie męskiej jak i u osobników dorosłych, gdzie wywiera zasadniczy wpływ na produkcję nasienia.

## Wpływ chemicznej formy selenu na parametry nasienia

Badania porównawcze [11] wykazały, że o wiele lepsze efekty reprodukcyjne uzyskuje się przy suplementacji diety samców selenem organicznym w postaci selenoaminokwasów niż selenem nieorganicznym w postaci seleninu sodu –  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Knury, których diety suplementowano organicznym selenem ( $0,2$  i  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) oraz witaminą E ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) w porównaniu do knurów z grupy kontrolnej, żywionych z dodatkiem  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  selenu nieorganicznego i  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  wit. E charakteryzowały się wyższą koncentracją plemników i całkowitą ich liczbą w ejakulacie oraz większą objętością jąder. Odsetek plemników z wadami morfologicznymi u wspom-

nianych zwierząt był znacznie niższy, a wartość testu ORT plasowała się na wyższym poziomie. Suplementacja diety selenem organicznym jest bardziej efektywna w ochronie błon plemnikowych niż selenem w formie nieorganicznej. Świadczy o tym m.in. znacznie niższy „wyciek” aminotransferazy asparaginianowej z męskich komórek rozrodczych zwierząt żywionych Se organicznym niż zwierząt z grupy kontrolnej.

Należy również podkreślić, że suplementacja diety knurów selenem organicznym (selenometionina) w ilości 0,2 mg na 1 kg paszy znacznie poprawia parametry kinetyczne ruchu plemników i ich zdolność zapładniającą podczas przechowywania w stanie płynnym w temperaturze 18°C w porównaniu do knurów żywionych identycznymi dawkami Se nieorganicznego [11].

Podsumowując, korzystny wpływ selenu na jakość nasienia wynika przede wszystkim z jego trzech funkcji na poziomie molekularnym a mianowicie:

1. Udział w spermatogenezie (koncentracja, całkowita liczba plemników w ejakulacie).
2. Udział w budowie selenoprotein w obszarze wstawki plemnika (morfologia, ruchliwość).
3. Składnik peroksydazy glutationowej w układzie rozrodczym zwierząt (status antyoksydacyjny nasienia).

## Wpływ $\alpha$ -tokoferolu

$\alpha$ -Tokoferol (witamina E) jest głównym rozpuszczalnym w tłuszczach antyoksydantem błon komórkowych. Chroni fosfolipidy błonowe przed peroksydacyjnym działaniem wolnych rodników. Antyoksydacyjne działanie  $\alpha$ -tokoferoli polega głównie na zmiataniu wtórnych wolnych rodników organicznych i terminacji reakcji peroksydacji lipidów.

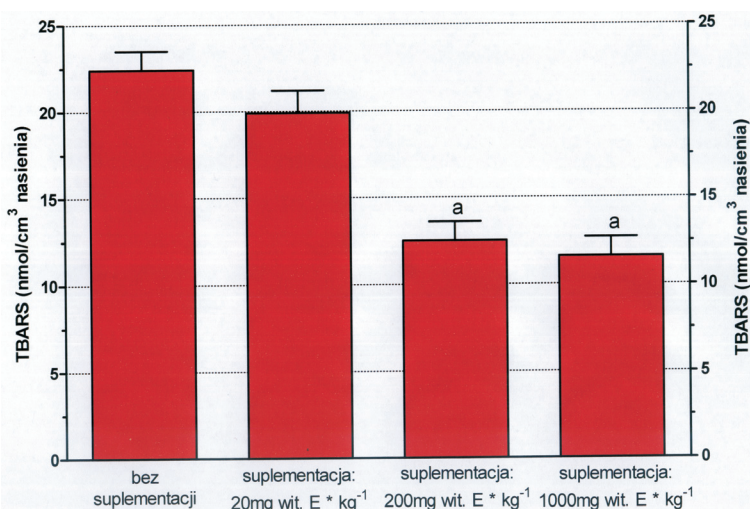
Suplementacja diety  $\alpha$ -tokoferolem poprzez redukcję peroksydacji lipidów wzmacnia integralność błon komórkowych plemników i tym samym poprawia zdolność zapładniającą nasienia [3, 22, 23]. Odnotowano, że siedmiodobowe doustne podawanie knurom octanu  $\alpha$ -tokoferolu (1000 IU na dzień) przyczyniło się do znacznego wzrostu liczby plemników w 1 cm<sup>3</sup> ejakulatu. Jednocześnie istotnie obniżył się poziom produktów indukowanej peroksydacji lipidów w plazmie nasienia tych zwierząt [3]. Surai i in. [23] wykazali również, że wraz ze wzrostem zawartości  $\alpha$ -tokoferolu w dawce pokarmowej koguta (20, 200 i 1000 mg · kg<sup>-1</sup>) ulegają obniżeniu wskaźniki indukowanej peroksydacji lipidów w nasieniu, mierzonej zawartością TBARS – substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (rys. 2). Cytowani autorzy odnotowali także, że  $\alpha$ -tokoferol nie tylko znacznie obniża wrażliwość nasienia drobiu na peroksydację lipidów, ale także już w dawce od 20 mg · kg<sup>-1</sup> wywiera wpływ na status wielonienasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach plemnikowych. Zawartość ważnych funkcyjnie kwasów tłuszczowych – 20:4n:6 i 22:4n:6 w tych lipidach była wysoce skorelowana z poziomem  $\alpha$ -tokoferolu w nasieniu. Taka suplementacja miała również wpływ na przegrupowanie składu procentowego po-

szczególnych klas fosfolipidów plewnnikowych. Wzrosła proporcjonalnie zawartość fosfatydyloetanoloamin, a zmalała sfingomielin.

Reasumując,  $\alpha$ -tokoferol wzmacnia status antyoksydacyjny nasienia poprzez dwa powiązane ze sobą mechanizmy. Pierwszym z nich jest ochrona przed peroksydacyjnymi uszkodzeniami struktur plewnnikowych, drugim natomiast korzystne zmiany w profilu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon komórkowych plewnników [23].

Surai i in. [23] zaznaczają jednocześnie, że poprawę statusu antyoksydacyjnego nasienia można uzyskać poprzez suplementację dawek żywieniowych  $\alpha$ -tokoferolem tylko w relatywnie limitowanym zakresie. Dalsze zwiększanie tej witaminy w diecie zwierząt nie poprawia znacząco jakości nasienia, a wręcz zbyt wysokie dawki tej witaminy stosowane przez dłuższy czas mogą obniżyć zdolność reprodukcyjną ptaków. Potwierdziły to także badania Danikowskiego i in. [6], w których wykazano, że pod wpływem wysokich dawek – 100, 1000, 10 000 i 20 000 IU  $\alpha$ -tokoferolu  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> diety stosowanych przez 12 miesięcy następuje wzrost uszkodzeń morfologicznych plewnników oraz obniżenie koncentracji i całkowitej liczby plewnników w ejakulacie koguta. Zawartość  $\alpha$ -tokoferolu w nasieniu istotnie wzrosła, wraz ze wzrostem zawartości tej witaminy w paszy, jednocześnie zmalał poziom produktów peroksydacji lipidów. Mimo wzrostu ochrony antyoksydacyjnej zastosowane w doświadczeniu wysokie dawki  $\alpha$ -tokoferolu wywierały negatywny wpływ na zdolność zapładniającą nasienia kogutów.

Wysokie dawki  $\alpha$ -tokoferolu (220 IU  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) wpływają na obniżenie stężenia prostaglandyny PGF<sub>2</sub> w gruczole prostaty i pęcherzykach nasiennych dojrzałych knurów



**Rysunek 2.** Wpływ diety kogutów suplementowanej  $\alpha$ -tokoferolem na wrażliwość nasienia wobec peroksydacji lipidów; opracowanie własne według danych Surai i in. [23]

Wartości oznaczone literą a różnią się od grupy kontrolnej statystycznie istotnie ( $p < 0,001$ )

[17]. Obniżenie poziomu prostaglandyn w układzie rozrodczym jest prawdopodobnie wynikiem antyoksydacyjnego działania  $\alpha$ -tokoferolu, który może hamować cyklo-oksigenazową peroksydację kwasu arachidonowego i syntezę kolejnych nadtlenkowych intermediatów [10].

## Wpływ kwasu L-askorbinowego i glutationu

Kwas L-askorbinowy (witamina C) w wyższych stężeniach jest znaczącym antyoksydantem, w układach biologicznych dzięki silnym właściwościom redukcyjnym. Dostępne dane dotyczące wpływu kwasu L-askorbinowego na jakość nasienia zwierząt nie są spójne. U knurów nie odnotowano wpływu tej witaminy na koncentrację nasienia [1]. U królików, u których analizowano wpływ kwasu L-askorbinowego i  $\alpha$ -tokoferolu w dawkach odpowiednio:  $1 \text{ g} \cdot \text{dcm}^{-3}$  wody i  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  paszy na jakość nasienia i jego zdolność zapładniającą wykazano, że pojedyncza suplementacja tych witamin nie zmieniła parametrów nasienia. Natomiast łączne podanie obu antyoksydantów w tych samych ilościach znacząco wpłynęło na parametry kinetyczne ruchu plemników, w tym średnią drogę przebytą przez plemniki w jednostce czasu (z  $57,09$  do  $60,73 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ), jednakże nie miało to wpływu na wskaźnik zapładnialności [5]. Bardziej wyrazisty wpływ kwasu L-askorbinowego na jakość nasienia królików uzyskano podczas suplementacji wody do picia jeszcze wyższymi dawkami tej witaminy ( $1,5 \text{ g} \cdot \text{dcm}^{-3}$ ) łącznie z  $\alpha$ -tokoferolem ( $1 \text{ g} \cdot \text{dcm}^{-3}$ ). Pod wpływem tych witamin nastąpiła redukcja peroksydacji lipidów w plazmie nasienia. Dodatek antyoksydantów znacząco zwiększył objętość ejakulatów, koncentrację nasienia, ogólną liczbę ruchliwych plemników przy jednoczesnym obniżeniu liczby martwych i uszkodzonych męskich komórek rozrodczych. Istotnie obniżyły się w plazmie nasienia aktywności enzymów: aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej oraz dehydrogenazy mleczanowej, podczas gdy aktywność transferazy glutationowej uległa znacznemu wzrostowi [24]. Jeżeli chodzi o nasienie drobiu to nie odnotowano oddziaływania kwasu L-askorbinowego na podstawowe jego parametry. Suplementacja rozcieńczalnika do przechowywania nasienia indora w stanie płynnym witaminą C w ilościach  $1\text{--}400 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  nie miała wpływu na takie cechy nasienia jak: ruchliwość i przeżywalność plemników oraz integralność plazmolemy [7].

Jednym z ważnych niskocząsteczkowych antyoksydantów jest tripeptyd – glutation, który swoje właściwości antyoksydacyjne zawdzięcza obecności grupy tiolowej – SH. Peptyd ten występuje zarówno w plemnikach jak i plazmie nasienia zwierząt. Podstawową funkcją glutationu jest ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym spowodowanym w szczególności peroksydacją lipidów plazmolemy [15]. Jednoznacznie wykazano, że peptyd ten hamuje procesy peroksydacji lipidów w plazmie nasienia knura [3]. Wykazano również, że egzogeny glutation dodawany do inseminacyjnego medium podczas zapłodnienia oocytów świni *in vitro* poprzez swoje

właściwości „zmiatacza” wolnych rodników wpływa pozytywnie na proces zapłodnienia i wczesną embriogenezę [2]. U buhaja wpływ egzogenego glutationu na zapłodnienie in vitro zależy od jego stężenia w stosowanych mediach oraz od cech osobniczych dawcy nasienia [12].

## Wnioski

1. Selen i niskocząsteczkowe antyoksydanty wywierają pozytywny wpływ na jakość i wartość biologiczną nasienia zwierząt gospodarskich z tym, że wielkość tych zmian zależy od rodzaju i dawki suplementu, a także od rasy i cech osobniczych zwierzęcia.
2. Wzbogacenie diety żywieniowej samców selenem skutkuje wzrostem liczby męskich komórek rozrodczych. Poprawia ruchliwość, morfologię oraz zdolność zapładniającą plemników. Wpływa również na wzrost aktywności peroksydazy glutationowej w nasieniu.
3. Suplementacja diety zwierząt gospodarskich selenem organicznym w postaci selenoaminokwasów wpływa znacznie korzystniej na jakość nasienia niż Se nieorganicznym.
4.  $\alpha$ -Tokoferol wzmacnia status antyoksydacyjny nasienia poprzez funkcję prewencyjną wobec peroksydacji lipidów w plemnikach i plazmie nasienia oraz korzystny wpływ na status wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach plemnikowych.
5. Najkorzystniejsze efekty rozrodcze uzyskuje się jeżeli selen jest aplikowany łącznie z  $\alpha$ -tokoferolem.
6. Glutation i kwas L-askorbinowy również wywierają pozytywny wpływ na jakość nasienia również poprzez swoje właściwości antyoksydacyjne.

## Literatura

- [1] Audet I., Laforest J.P., Martineau G.P., Matte J.J. 2004. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J. Anim. Sci.* 82: 626–633.
- [2] Boquest A.C., Abeydeera L.R., Wang W.H., Day B.N. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 51: 1311–1319.
- [3] Brzezińska-Ślebodzińska E., Ślebodziński A.B., Pietras B., Wiczorek G. 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Element Res.* 47: 69–74.
- [4] Calvin H.J., Grosshans K., Musciant-Shikora S.R., Turner S.J. 1987. A developmental study of rat sperm and testis selenoproteins. *J. Reprod. Fertil.* 81: 1–11.
- [5] Catellini C., Lattaioli P., Bernardini M. 1999. Effect of dietary supplementation with  $\alpha$ -tocopheryl acetate and ascorbic acid on qualitative characteristics and fertilizing ability of rabbit semen. *World Rabbit Sci.* 7(4): 217–220.
- [6] Danikowski S., Sallmann H.P., Halle I., Flachowsky G. 2002. Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86: 376–382.
- [7] Donoghue A.M., Donoghue D.J. 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Sci.* 76: 1440–1445.



- [8] Estienne M.J., Harper A.F., Knighty W., Speight S. 2009. Enhanced fertility in boars fed diets supplemented with Sel-Plex® selenium. *Livestock Update*, February, 1–7 Virginia Polytechnic Institute and State University, US.
- [9] Hawkes W.C., Alkan Z., Wong K. 2009. Selenium supplementation does not affect testicular selenium status or semen quality in North American men. *J. Androl.* 20 (5): 525–533.
- [10] Hope W.C., Dalton C., Machlin L.J., Filipski R.J., Vane F.M. 1975. Influence of dietary vitamin E on prostaglandin biosynthesis in rat blood. *Prostaglandins* 10: 557–571.
- [11] Jacyno E., Kołodziej A., Kawęcka M., Kamyczek M., Pietruszka A., Elzanowski C. 2005. Reproductive performance of young boars receiving during their rearing inorganic or organic selenium + vitamin E in diets. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 8(1): 1–8. <http://www.ejpau.media.pl/>.
- [12] Kim I.H., Van-Langendonck A., Van-Soom A., Vansoose G., Casi A.L., Hendriksen P.J.M. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52: 537–547.
- [13] Kołodziej A., Jacyno E. 2004. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 7(1): 1–8. <http://www.ejpau.media.pl/>
- [14] Lubarda Z., Strzeżek J. 1990. Wybrane aspekty peroksydacji lipidów w nasieniu. *Post. Nauk Roln.* 4/5/6: 95–107.
- [15] Lubarda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5(1): 5–17.
- [16] Marin-Guzman J., Mahan D.C., Chung Y.K., Pate J.L., Pope W.F. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75: 2994–3003.
- [17] Marin-Guzman J., Mahan D.C., Pate J.L. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim. Sci.* 78: 1537–1543.
- [18] Marin-Guzman J., Mahan D.C., Whitmoyer R. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. Anim. Sci.* 78: 1544–1550.
- [19] Seremak B. 1999. Wpływ comiesięcznych iniekcji selenu na jakość nasienia tryków w ciągu roku. *Fol. Univ. Agric. Stetin.* 194 *Zootechnica* 37: 63–68.
- [20] Sikka S.C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 8: 851–862.
- [21] Strzeżek J., Łapkiewicz S., Lecewicz M. 1999. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 17(4): 181–188.
- [22] Surai P., Kostjuk I., Wishart G., Macpherson A., Speake B.K., Noble R.C., Inov I., Kutz E. 1997. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol. Trace Element Res.* 64: 119–132.
- [23] Surai P., Kutz E., Wishart G. J., Noble R.C., Speake B.K. 1997. The relationship between the dietary provision of  $\alpha$ -tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *J. Reprod. Fertil.* 110: 47–51.
- [24] Yousef M.I., Abdallah G.A., Kamel K. I. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 76(1–2): 99–111.

## **Effect of selenium and low-molecular weight antioxidants on the semen quality of farm animals**

**Keywords:** animals semen, antioxidant status, selenium,  $\alpha$ -tocopherol, L-ascorbic acid, glutathione

### **Summary**

This paper reviews recent results of research regarding the effect of selenium and several antioxidants on quality characteristics of farm animal semen. Administration of selenium with  $\alpha$ -tocopherol significantly enhances the antioxidant status of semen.  $\alpha$ -Tocopherol plays a key role in protecting spermatozoa against lipid peroxidation. Selenium has a positive effect on the activity of glutathione peroxidase, which is one of the antioxidant enzymes occurring in semen. Selenium is essential for normal spermatogenesis. The function of selenium is mediated by selenoproteins, which are structural component of the sperm midpiece, and are required for normal sperm morphology and motility. Furthermore, selenium is involved in sperm-egg fertilization processes. The contributions of other antioxidants, such as L-ascorbic acid, and glutathione to the antioxidant defense system of the semen have been also addressed.

## **Ekspresja genu GnRH i genu receptora GnRH (GnRHR) w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych\***

*Magdalena Ciechanowska<sup>1</sup>, Magdalena Łapot<sup>1</sup>, Tadeusz Malewski<sup>2</sup>,  
Krystyna Mateusiak<sup>1</sup>, Tomasz Misztal<sup>1</sup>, Franciszek Przekop<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego PAN, 05-110 Jabłonna,*  
<sup>2</sup> *Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 3, 00-679 Warszawa*  
*e-mail: m.ciechanowska@ifzz.pan.pl*

**Słowa kluczowe:** owca, podwzgórze, przysadka, GnRH, mRNA GnRH, mRNA GnRHR, receptory: GABA<sub>A</sub>, μ-opioidowe, CRH, dopaminowe – DA-2

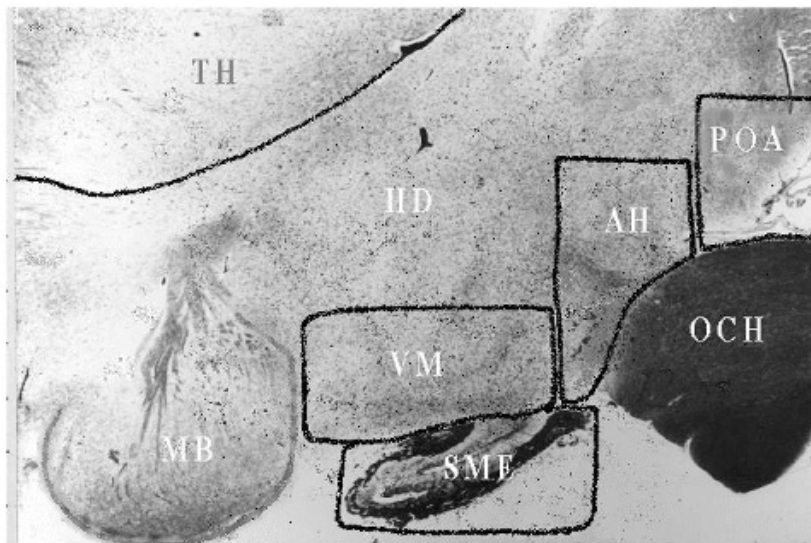
### **Wstęp**

Niepłodność, zakłócenia procesów owulacji i sekrecji gonadotropin są poważnymi schorzeniami cywilizacyjnymi, stwarzającymi istotne problemy zarówno medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej. Dotychczasowe badania nad rozrodem zwierząt przyczyniły się przede wszystkim do wyjaśnienia neuroendokrynnych mechanizmów regulujących uwalnianie GnRH/LH w różnych stanach fizjologicznych organizmu [26], także u zwierząt hodowlanych utrzymywanych w nieodpowiednich warunkach zootechnicznych (stresogennych), u których obserwowano nawet długotrwałe zaburzenia cykli estralnych [36]. Analiza ekspresji genu GnRH i genu receptora GnRH (GnRHR) w ośrodkowym układzie nerwowym była tematem nielicznych tylko prac. Nie określono jednoznacznie współzależności, jakie zachodzą pomiędzy poziomami mRNA GnRH i GnRHR w podwzgórz ssaków.

Wydawało się więc, że kompleksowa analiza procesów zaangażowanych w regulację sekrecji gonadotropin na poziomie molekularnym pozwalająca lepiej zrozumieć

---

\* Za te badania autorzy otrzymali Dyplom Uznania Sekretarza V Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN.



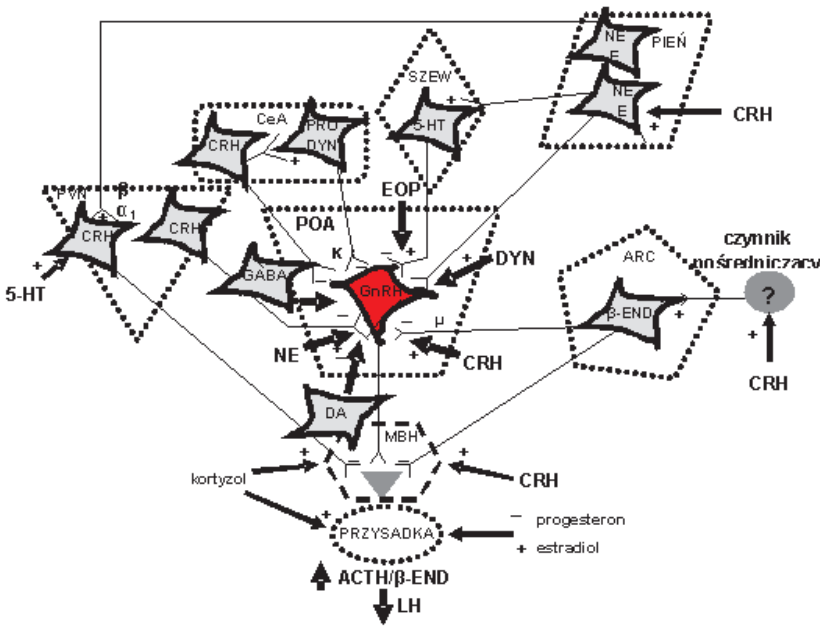
**Rysunek1.** Przekrój przez mózg owcy; czarnymi liniami zakreślono analizowane struktury; POA – pole przedwzrokowe, AH – przednie podwzgórze, VM – brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze, SME – szypuła/wyniosłość pośrodkowa, TH – wzgórze, HD – podwzgórze grzbietowe, MB – ciała suteczkowate

mechanizmy kontrolujące uwalnianie GnRH z podwzgórza i sekrecję gonadotropin z przedniego płata przysadki mózgowej, powinna być przedmiotem kolejnych badań, zmierzających do wyjaśnienia przyczyn zaburzeń funkcji rozrodczych.

Doświadczenia, których wyniki przedstawiono w tej pracy przeprowadzono na samicach owiec rasy Merynos Polski, w różnych okresach cyklu płciowego, a na ich wykonanie uzyskano uprzednio stosowne zezwolenia Lokalnej Komisji Etycznej.

Poziomy ekspresji genów GnRH i GnRHR w wybranych strukturach obszaru przedwzrokowo-podwzgórzowego (okolicy przedwzrokowej, przednim podwzgórze, brzuszno-przyśrodkowym podwzgórze, szypule/wyniosłości pośrodkowej) [10] oraz w przednim płacie przysadki mózgowej (rys. 1) określano przy użyciu techniki RT-PCR i/lub RT-PCR w czasie rzeczywistym (Real Time-PCR) i wyrażano względem genu referencyjnego – dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Niniejsze doświadczenia stanowiły pierwszy etap badań molekularnych mechanizmów zaangażowanych w kontrolę sekrecji GnRH/LH u owcy, a mając na uwadze tylko nieliczne istniejące wyniki badań nad ekspresją genu GnRH w podwzgórze owcy [19, 38] oraz brak informacji o ekspresji genu receptora GnRH w tej strukturze i jego ewentualnej funkcji w regulacji ekspresji genu GnRH w różnych stanach fizjologicznych miały one charakter poznawczy.

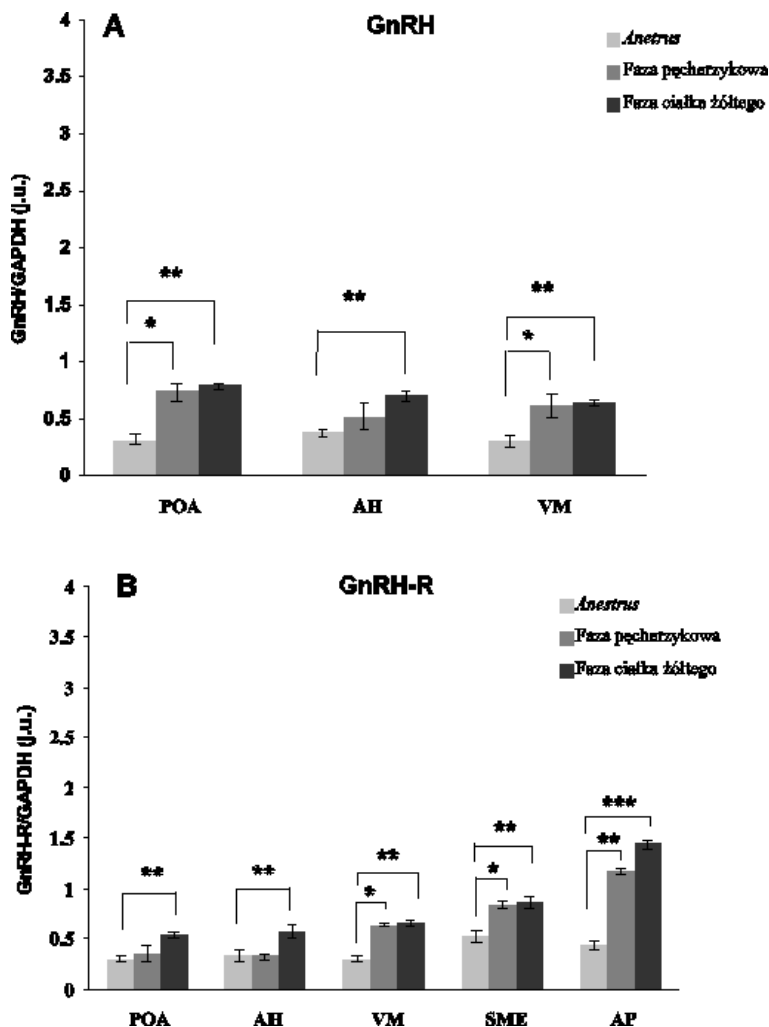
## Ekspresja mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz sekrecja LH u anestralnych owiec i samic w cyklu estralnym



**Rysunek 2.** Schemat oddziaływań układów neuralnych zlokalizowanych w różnych obszarach mózgu na aktywność sekrecyjną GnRH/LH: + – aktywacja, – – hamowanie, PVN – jądro przykomorowe, CeA – jądro środkowe ciała migdałowatego, EOP – układ opioidergiczny, POA – pole przedwzrokowe, ARC – jądro łukowate, 5-HT – serotonina, CRH – kortykoliberyna, DYN – dynorfina, NE/E – układ noradrenergiczny, POMC – układ proopiomelanokortykotropowy, GABA – kwas  $\gamma$ -amino-masłowy, DA – dopamina

W badaniach własnych wykazano po raz pierwszy obecność mRNA GnRHR w podwzgórzu owcy oraz określono współzależności między poziomami ekspresji GnRH i GnRHR (rys. 3) a uwalnianiem LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym w różnych stanach fizjologicznych. Stwierdzono także, że poziomy transkryptu obu genów zawsze były wyższe u owiec w fazie ciała żółtego i prawie zawsze w fazie pęcherzykowej, niż u osobników anestralnych. [10, 5, 9, 31] (rys. 3). Także poziom LH w surowicy krwi estralnych samic był istotnie wyższy niż odnotowany u zwierząt w sezonowym *anestrus*.

Badania nad neuroendokrynną regulacją sekrecji gonadotropin u owcy wykazały, że różnice w sekrecji GnRH/LH w okresie rozrodczym i sezonie anestralnym są powodowane zarówno zmianami aktywności układów neuralnych podwzgórza kontrolujących uwalnianie GnRH (rys. 2), jak i zróżnicowanym w poszczególnych stanach



**Rysunek 3.** Poziomy mRNA GnRH (A) i mRNA GnRH-R (B) w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owiec anestralnych oraz w fazach: ciała żółtego i pęcherzykowej cyklu estralnego. Legenda: POA – okolica przedwzrokowa, AH – przednie podwzgórze, VM – brzuszno-przysadkowe podwzgórze, SME – szypuła/wyniosłość pośrodkowa, AP – przedni płat przysadki mózgowej.

\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

fizjologicznych wpływem tych układów na aktywność neuronów gonadoliberyny [1, 11, 16, 17, 25, 30, 41, 42, 45, 46]. Nasze obecne prace udokumentowały, że regulacja uwalniania GnRH/LH może zachodzić na poziomie genomowym i angażować liczne ośrodkowe mechanizmy, odmienne w różnych stanach fizjologicznych [9].

## Wpływ stresu na ekspresję mRNA GnRH i GnRHR oraz sekrecję LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owiec w poszczególnych fazach cyklu płciowego

Fizjologiczne współzależności, charakterystyczne dla poszczególnych okresów cyklu rozrodczego, mogą jednak podlegać poważnym zaburzeniom u zwierząt poddanych działaniu stresu. W omawianych doświadczeniach jako czynnik stresogenny zastosowano łagodne impulsy prądu elektrycznego [9] przekazywane na przednie kończyny zwierzęcia z przerwami: przez 3 godziny podczas jednego dnia (stres krótkotrwały), lub przez 5 godzin dziennie przez 4 kolejne dni (stres o przedłużonym działaniu). Wykazano, że stres wywiera różny wpływ na ekspresję obu badanych genów, a charakter obserwowanych zmian zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz czasu oddziaływania bodźca stresogennego (tab. 1). U owiec anestralnych zarówno stres krótkotrwały, jak i stres o przedłużonym działaniu powodowały wzrost poziomów mRNA GnRH i mRNA GnRHR w podwzgórzu oraz mRNA GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej. Wzrost sekrecji LH stwierdzono tylko u owiec poddanych krótkotrwałemu działaniu stresora [31].

**Tabela 1.** Wpływ krótkotrwałego i przedłużonego stresu\* na poziom mRNA GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na stężenie LH w surowicy krwi anestralnych owiec (A) i samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego (B)

Obszar	Stres krótkotrwały				Stres przedłużony			
	mRNA GnRH		mRNA GnRHR		mRNA GnRH		mRNA GnRHR	
	A	B	A	B	A	B	A	B
POA	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
AH	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓
VM	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓
SME	nd	nd	↑	↑	nd	nd	↑	↓
AP	nd	nd	↑	↑	nd	nd	↑	↓
LH	A		B		A		B	
	↑		↑		—		↓	

\* Czynnikiem stresogennym były łagodne impulsy prądu elektrycznego o natężeniu 3 mA przekazywane na przednie kończyny zwierzęcia w ciągu 0,5 s., po których następowała 1 s. przerwy. Po 20 min. działanie stresora przerywano na 40 min., po których następowało kolejne 20 min. drażnienia; stres krótkotrwały: 3 godz. w ciągu 1 dnia (08:00–11:00); stres przedłużony: 5 godz. dziennie przez 4 kolejne dni (08:00–13:00); ↑ – podwyższenie poziomu, ↓ – obniżenie poziomu, — – brak istotnych zmian, nd – nie wykazano.

GnRHR – receptor GnRH, POA – okolica przedwzrokowa, AH – przednie podwzgórze, VM – brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze, SME – szypuła/wyniosłość pośrodkowa AP – przedni płat przysadki mózgowej. Grupę kontrolną stanowiły owce niestresowane.

U owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego stres krótkotrwały podwyższał poziom mRNA GnRH i mRNA GnRHR, natomiast stres o przedłużonym działaniu obniżał ekspresję tych genów w podwzgórzu [10], z wyjątkiem genu GnRHR w okolicy przedwzrokowej, w której stwierdzono podwyższony poziom mRNA GnRHR. Podobny kierunek zmian poziomu ekspresji genu GnRH i genu GnRHR

w podwzgórzu ze zmianami uwalniania LH sugeruje, że przedłużony stres może zakłócać procesy owulacji nie tylko przez zmiany uwalniania GnRH/LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym, ale także poprzez zmiany biosyntezy GnRH oraz aktywnych form receptora tego neurohormonu [10]. Dokładne wyjaśnienie mechanizmów tego zjawiska wymaga dalszych badań nad określeniem powiązań, jakie zachodzą między poziomami pierwotnego transkryptu i mRNA cytoplazmatycznego, który podlega procesowi translacji.

Wyniki badań własnych sugerują ponadto, że podłożem zróżnicowanych w odpowiedzi na stres poziomów mRNA GnRH i GnRHR jest zmieniająca się, w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia, aktywność układów neuralnych podwzgórza. Za takim poglądem przemawiają także obserwacje nad ekspresją genów GnRH i GnRHR w podwzgórzu szczurów [23, 34, 44] poddanych czynnikiem stresogennym.

Z nielicznych doświadczeń przeprowadzonych na szczurach wynika, że podwzgórzowe układy neuralne, które uczestniczą w aktywacji lub hamowaniu uwalniania GnRH, modulują także ekspresję genów GnRH i GnRHR [13, 22, 24, 25, 27–29, 39, 43]. Dla bardziej wnikliwej analizy mechanizmów, poprzez które stres zakłóca sekrecję gonadotropin i procesy owulacji u zwierząt, prześledzono wpływ układów GABA-ergicznego,  $\beta$ -endorfinergicznego i CRH-ergicznego na poziomy mRNA GnRH i mRNA GnRHR u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. W tym celu dokonywano aktywacji lub blokowania receptorów GABA<sub>A</sub>-ergicznym,  $\mu$ -opioidergicznym, CRH-ergicznym poprzez ośrodkowe infuzje ich specyficznych agonistów lub antagonistów. Małe dawki tych związków były infundowane do III komory mózgu w sposób pulsacyjny przez 5 godzin dziennie podczas 3 kolejnych dni, począwszy od 14 dnia cyklu.

### **Wpływ aktywacji i zablokowania receptorów GABA<sub>A</sub> w podwzgórzu na poziomy mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego**

Wykazano, że aktywacja receptorów GABA<sub>A</sub> poprzez dokomorowe infuzje muscimolu (specyficzny agonista receptorów GABA<sub>A</sub>) powoduje istotne obniżenie ekspresji mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz sekrecji LH z komórek gonadotropowych przedniego płata przysadki mózgowej [4]. Wzrost poziomów mRNA GnRH i mRNA GnRHR wystąpił natomiast u owiec, którym infundowano bikukulinę (specyficzny antagonist receptorów GABA<sub>A</sub>) (tab. 2). U zwierząt tych stwierdzono także podwyższone stężenia LH w surowicy krwi [4]. Uzyskane wyniki sugerują, że GABA działając przez mechanizm GABA<sub>A</sub>-receptorowy, może hamować uwalnianie GnRH/LH poprzez udział w regulacji biosyntezy GnRH i GnRHR [4].



**Tabela 2.** Wpływ aktywacji lub blokowania receptorów  $\mu$ -opiodowych (A), GABA<sub>A</sub> (B), CRH (C) na poziomy mRNA GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na stężenie LH w surowicy krwi owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego\*

	A				B				C			
	$\beta$ -endorfina		nalokson		muscimol		bikukulina		CRH		antagonista CRH	
	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR	GnRH	GnRHR
POA	↓	↑	—	—	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓
AH	↓	↓	—	—	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	—
VM	↓	↓	—	—	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
SME	nd	↓	nd	—	nd	↓	nd	↑	nd	↓	nd	↑
AP	nd	↓	nd	—	nd	↓	nd	↑	nd	↓	nd	↑
LH	↓		—		↓		↑		↓		↓	

\*Infuzje do III komory mózgu przeprowadzano w sposób pulsacyjny, w odstępach 40 min. przez 5 godz. dziennie {08.00–13.00} podczas 3 kolejnych dni począwszy od 14 dnia cyklu estralnego {14–16 dzień}. Owce kontrolne otrzymywały 2  $\mu$ l płynu Ringera na minutę. Owcom doświadczalnym infundowano odpowiednio:  $\beta$ -endorfinę, nalokson (antagonista receptorów  $\mu$ -opiodowych), muscimol (agonista receptorów GABA<sub>A</sub>), bikukulinę (antagonista receptorów GABA<sub>A</sub>) CRH lub antagonistę CRH ( $\alpha$ -helical CRH<sub>9-41</sub>). Zwierzęta otrzymywały 20  $\mu$ g odpowiedniego związku na 1 ml płynu Ringera, a dawka wynosiła 4  $\mu$ g dziennie na osobnika; w porównaniu z owcami kontrolnymi: ↑ – podwyższenie poziomu, ↓ – obniżenie poziomu, — – brak istotnych zmian, nd – nie wykazano.

GnRHR – receptor GnRH, POA – okolica przedwzrokowa, AH – przednie podwzgórze, VM – brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze, SME – szypuła/wyniosłość pośrodkowa AP – przedni płatek przysadki mózgowej.

## Wpływ dokomorowych infuzji $\beta$ -endorfiny lub naloksonu na ekspresję mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego

Podobnie jak muscimol, także  $\beta$ -endorfina obniżyła poziomy mRNA GnRH we wszystkich analizowanych strukturach podwzgorza, co wskazuje, że zarówno układ  $\beta$ -endorfinergiczny jak i GABA-ergiczny hamują sekrecję gonadotropin w cyklu estralnym, nie tylko przez obniżenie uwalniania GnRH, ale także poprzez zahamowanie biosyntezy tego hormonu. Aktywacja receptorów  $\mu$ -opiodowych indukowała też różne zmiany poziomów transkryptu GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym: wzrost poziomu mRNA GnRHR w okolicy przedwzrokowej, znaczne obniżenie wartości tego wskaźnika w brzuszno-przyśrodkowym podwzgorzu/szypule wyniosłości pośrodkowej oraz w przednim płacie przysadki mózgowej [7] (tab. 2). Wydaje się zatem, że hamowanie uwalniania GnRH przez  $\beta$ -endorfinę w fazie pęcherzykowej cyklu zachodzi na poziomie genomowym, poprzez wpływ tego neuromodulatora na biosyntezę GnRH i jego białka receptorowego.

Infuzje antagonisty receptora  $\mu$ -opiodowego (naloksonu) nie wpłynęły w sposób istotny na poziomy transkryptu żadnego z badanych genów. Prawdopodobnie użyta w niniejszych doświadczeniach dawka tego związku była zbyt niska, aby skutecznie wyłączyć aktywność opiodergiczną. Dane literaturowe wskazują, że wysokie dawki naloksonu infundowane do III komory mózgu powodują wzrost sekrecji LH u owiec [33]. Interpretując brak wpływu naloksonu na uwalnianie LH należy jednak uwzględnić fakt, że u szczurów [20] i u owiec [16] w późnej fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, aktywność układu  $\beta$ -endorfinergicznego w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu ulega drastycznemu obniżeniu; w okresie, w którym dochodzi do fizjologicznego spadku aktywności tego układu, oddziaływanie antagonisty receptora  $\mu$ -opiodowego może być mało skuteczne.

### **Wpływ CRH i antagonisty CRH na ekspresję mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego**

Mimo że wpływ układu CRH-ergicznego na sekrecję GnRH/gonadotropin był intensywnie badany u różnych gatunków zwierząt [3, 15, 35], dotychczas nie było informacji o wpływie CRH na ekspresję genu GnRH i genu receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym *in vivo*. Wyniki naszych badań, przeprowadzonych na owcach w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, wykazały po raz pierwszy, że przedłużona aktywacja receptorów CRH w podwzgórzu obniża poziom mRNA GnRH w tej strukturze, natomiast zablokowanie tych receptorów zwiększa ekspresję genu GnRH. Zarówno aktywacja jak i zablokowanie receptorów CRH wywierały także wpływ na ekspresję genu GnRHR w poszczególnych strukturach podwzgórza i gruczole przysadki. Infuzja CRH do III komory mózgu zwiększyła poziom mRNA GnRHR w okolicy przedwzrostkowej i zmniejszyła wartości tego wskaźnika w pozostałych obszarach. Zablokowanie receptorów CRH wywierało przeciwstawny wpływ na poziomy transkryptu genu receptora w porównaniu z odnotowanym po ich aktywacji. Neuroendokryne mechanizmy, które prowadzą do zróżnicowanej ekspresji mRNA GnRHR w odpowiedzi na CRH nie są znane. Wiadomo jednak, że receptory GnRH są zlokalizowane w różnych strukturach podwzgórza owcy, a ich wpływ na ekspresję genu GnRH i/lub uwalnianie gonadoliberyny prawdopodobnie angażuje prawdopodobnie obecne tam liczne układy neuralne. Te obszarowo specyficzne zmiany w poziomie ekspresji genu receptora mogą być wynikiem odmiennej w poszczególnych strukturach lokalizacji GnRHR. Nie wykluczone bowiem, że receptory GnRH są obecne na komórkach różnych układów neuralnych, wykazujących zróżnicowaną wrażliwość na CRH. Wydaje się także, że poziom ekspresji genu receptora może być w znacznej mierze zależny od aferentnego dopływu sygnałów z różnych ośrodków podwzgórza do komórek wykazujących ekspresję GnRHR.

Zmniejszenie lub zwiększenie poziomów mRNA GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej pod wpływem CRH lub antagonisty CRH wydają się być następstwem odpowiednio zmniejszonego lub zwiększonego uwalniania GnRH z podwzgórza. Wyniki te sugerują, że obniżona lub wzmożona sekrecja LH z przysadki po aktywacji lub zablokowaniu receptorów CRH w podwzgórzu jest zapoczątkowana na poziomie genomowym przez kompleksowe oddziaływanie CRH na ekspresję genu GnRH i genu GnRHR.

### **Wpływ układu dopaminergicznego na poziomy mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u anestralnych owiec**

U owcy, gatunku o sezonowym charakterze rozrodczym, stan anestralny indukowany wydłużoną fazą świetlną związany jest przede wszystkim ze wzrostem aktywności układu dopaminergicznego w podwzgórzu, który w okresie długiego dnia wywiera hamujący wpływ na uwalnianie GnRH/LH [1, 2, 12, 18, 46]. Badania własne dowodzą, że wzrostowi sekrecji LH po zablokowaniu receptorów dopaminergicznym DA-2 w podwzgórzu anestralnych owiec, towarzyszą istotne zmiany w ekspresji genów GnRH i GnRHR [6]. Uzyskane wyniki sugerują, że obniżenie sekrecji LH w sezonie anestralnym jest następstwem nie tylko obniżonego uwalniania GnRH, lecz także zmniejszonej syntezy tego decapeptydu. Zablokowanie receptora dopaminergicznego DA-2 spowodowało obniżenie poziomu mRNA GnRH w brzusno-przyśrodkowym podwzgórzu. Wydaje się jednak, że nie było ono wynikiem zmniejszonej aktywności transkrypcyjnej tego genu, lecz konsekwencją wykorzystania transkryptu w procesie biosyntezy białka oraz uwalniania hormonu z granul neurosekrecyjnych do naczyń wrotnych krążenia podwzgórzowo-przysadkowego. Potwierdzeniem słuszności takiego przypuszczenia jest odnotowany w niniejszych doświadczeniach istotny wzrost poziomu mRNA GnRHR w komórkach gonadotropowych przysadki. Wiadomo bowiem, że poziom aktywnych form receptora błonowego w gonadotropach determinuje zdolność odpowiedzi tych komórek na GnRH.

Wydaje się również, że obniżenie poziomu mRNA GnRHR w brzusno-przyśrodkowym podwzgórzu/szypule wyniosłości pośrodkowej prowadzi do zmniejszonej biosyntezy GnRHR; zmniejszenie gęstości aktywnych form receptora GnRH w tej strukturze umożliwia prawdopodobnie wzrost uwalniania GnRH. Za takim poglądem przemawia fakt, że aktywacja GnRHR w brzusno-przyśrodkowym podwzgórzu u szczurów prowadzi do zmniejszonego uwalniania GnRH z zakończeń aksonalnych GnRH w tej strukturze [14, 40]. Dokomorowe infuzje sulpirydu (specyficzny antagonist receptorów dopaminergicznym DA-2) stymulowały ekspresję genu GnRHR w okolicy przedwzrostkowej i przednim podwzgórzu anestralnych owiec i nie powodowały istotnych zmian poziomów mRNA GnRH w tych strukturach. Wyjaśnienie fizjologicznego znaczenia współzależności między mRNA GnRH a mRNA GnRHR w tych obszarach wymaga jednak dalszych badań.

## **Wpływ dokomorowych infuzji małych dawek GnRH na ekspresję mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u anestralnych owiec**

Wyniki badań *in vivo* i *in vitro* wskazują, że podwzgórzowy GnRH poprzez mechanizm ultrakrótkiego ujemnego sprzężenia zwrotnego może hamować uwalnianie GnRH z zakończeń neuralnych w podwzgórzu szczurów [14, 40]. Brak jest pogłębionych badań nad wyjaśnieniem tego zjawiska na poziomie molekularnym. Pierwsze prace wykonane na anestralnych owcach wykazały, że małe dawki GnRH infundowane do III komory mózgu powodują podwyższenie poziomu mRNA GnRH w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu oraz mRNA GnRHR we wszystkich analizowanych strukturach układu podwzgórzowo-przysadkowego [32]. Ten wzrost ekspresji mRNA obu badanych genów, odnotowany w niniejszym układzie doświadczalnym, może być zapowiedzią wzmożonej biosyntezy GnRH i receptora tego neurohormonu lub jedynie zwiększonej stabilności transkryptów. Zmiany mRNA GnRH w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu i mRNA GnRHR w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu/szypule wyniosłości pośrodkowej po infuzji GnRH były przeciwstawne do obserwowanych w tych strukturach po zablokowaniu receptora dopaminergicznego DA-2. Mając na uwadze fakt, że wyłączenie ośrodków dopaminergicznych zwiększyło uwalnianie GnRH/LH, można przypuszczać, że infundowany dokomorowo GnRH powoduje zmiany na poziomie genomowym, zmniejszając biosyntezę GnRH i zwiększając syntezę GnRHR. Zwiększenie aktywnych form receptora GnRH może wywierać hamujący wpływ na uwalnianie GnRH w wyniosłości pośrodkowej. Potwierdzenie lub zaprzeczenie takiej sugestii wymaga jednak dalszych badań nad wpływem aktywacji i blokowania receptora GnRH w podwzgórzu w różnych stanach fizjologicznych na poziomy mRNA GnRH i mRNA GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy i uwalnianie GnRH/LH.

### **Podsumowanie**

Wyniki badań nad regulacją sekrecji gonadotropin na poziomie genomowym u owcy wykazały po raz pierwszy obecność mRNA GnRHR w różnych strukturach podwzgórza. Obecność transkryptu GnRH-R w podwzgórzu owcy może sugerować udział receptora w regulacji biosyntezy GnRH w neuronach podwzgórza i/lub uwalniania neurohormonu na ich zakończeniach. Wydaje się bowiem, że receptory GnRH są obecne w różnych strukturach podwzgórza owcy, a ich wpływ na ekspresję genu GnRH i/lub uwalnianie gonadoliberyny może angażować obecne tam liczne układy neuralne.

Stwierdzono także, że poziomy ekspresji genów GnRH i jego receptora w podwzgórzu oraz genu receptora GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej zmieniają się w zależności od stanu fizjologicznego owiec. Stres w specyficzny sposób moduluje ekspresję obu genów; wpływ stresu zależy od fazy cyklu rozrodczego oraz czasu oddziaływania bodźca stresogennego.

Układy neuralne: GABA-ergiczny,  $\beta$ -endorfinergiczny i CRH-ergiczny hamujące uwalnianie GnRH/LH w cyklu estralnym obniżają także poziom mRNA genu GnRH w podwzgórzu i wpływają, lecz w różny sposób, na ekspresję genu receptora w tej strukturze i w przednim płacie przysadki mózgowej. Ta zróżnicowana w poszczególnych obszarach podwzgórza ekspresja mRNA GnRHR może sugerować, że receptory GnRH są obecne w różnych układach neutralnych oraz że poziom ekspresji genu receptora może być w znacznej mierze zależny od aferentnego dopływu sygnałów z różnych ośrodków podwzgórza do komórek wykazujących ekspresję GnRHR.

Zmiany poziomów transkrypty dla GnRH i GnRHR w poszczególnych strukturach układu podwzgórzowo-przysadkowego anestralnych owiec wywołane działaniem antagonisty receptorów dopaminergicznych DA-2 oraz infuzjami niskich dawek GnRH wskazują, że wpływ dopaminy i GnRH na aktywność wydzielniczą układu GnRH/LH w sezonowym *anestrus* może zachodzić także na poziomie genomowym.

Zróżnicowana ekspresja genów zarówno GnRH jak i jego receptora, obserwowana w poszczególnych strukturach podwzgórza badanych owiec może wynikać z odmiennej aktywności transkrypcyjnej tych genów, stabilności/degradacji transkryptów i/lub poziomu biosyntezy GnRH i aktywnych form jego receptora.

## Literatura

- [1] Adams V.L., Goodman R.L., Salm A.K., Coolen L.M., Karsch F.J., Lehman M.N. 2006. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 147: 4843–4851.
- [2] Bertrand F., Thierry J.-C., Picard S., Malpoux B. 1999. Implication of DA-2 like dopaminergic receptors in the median eminence during establishment of long-day of LH secretion in the ewe. *J. Endocrinol.* 163: 243–254.
- [3] Caraty A., Miller D.W., Delaleu B., Martin B. 1997. Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing hormone. *J. Reprod. Fertil.* 111: 249–257.
- [4] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2008. Effect of GABA<sub>A</sub> receptor modulation on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of follicular phase ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 111: 235–248.
- [5] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2008. Expression of the GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the hypothalamus and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of anestrus and luteal phase ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 108: 345–355.
- [6] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2008. Implication of dopaminergic system on GnRH and GnRH-R genes expression in the hypothalamus and GnRH-R gene expression in the anterior pituitary gland of anestrus ewes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 116: 357–362.
- [7] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2008. The central of  $\beta$ -endorphin and naloxone on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the anterior pituitary gland in follicular phase ewes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 116: 40–46.
- [8] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. The effects of CRF and its antagonist on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus and GnRH-R in the anterior pituitary gland of follicular phase ewes. *Neuroendocrinol. Let.* (w druku).

- [9] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Mateusiak K., Przekop F. 2010. Neuroendocrine regulation of GnRH release, and expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the hypothalamic-pituitary unit. *Reprod. Biol.* 10: 85–124.
- [10] Ciechanowska M., Łapot M., Malewski T., Misztal T., Mateusiak K., Przekop F. 2007. Effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median eminence and anterior pituitary gland in the ewes during follicular phase of the estrous cycle. *Acta Neurobiol. Exp.* 67: 1–12.
- [11] Conover C.D., Kuljis R.O., Rabii J., Advis J.B. 1993. B-endorphin regulation of luteinizing hormone-releasing hormone release at the median eminence in ewes: immunocytochemical and physiological evidence. *Neuroendocrinology* 57: 1182–1195.
- [12] Curlevis J.D., Naylor A.M., Mac Neilly A.S. 1992. Evaluation of a possible role dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the steroid-dependent suppression of luteinizing hormone secretion in the seasonally anestrus ewes. *Neuroendocrinology* 3: 387–391.
- [13] Fueshko S.M., Key S., Wray S. 1998. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons maintaining in nasal explants decrease LHRH messenger ribonucleic acid levels after activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Endocrinology* 139: 2734–2740.
- [14] De Paolo L.V., King R.A., Corollo A.J. 1987. In vivo and in vitro examination of autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120: 272–279.
- [15] Dobson H., Ghuman S., Prabhakar S., Smith R. 2003. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 125: 151–163.
- [16] Domański E., Chomicka L.K., Ostrowska A., Gajewska A., Mateusiak K. 1991. Release of luteinizing hormone releasing hormone,  $\beta$ -endorphin and norepinephrine by the nucleus infundibularis-median eminence during periovulatory period in the sheep. *Neuroendocrinology* 54: 151–158.
- [17] Goodman R.J., Robinson J. E., Kendrick K.M., Dyer R.G. 1995. Is the inhibitory action of estradiol on luteinizing hormone pulse frequency in anestrus ewes mediated by noradrenergic neurons in the preoptic area? *Neuroendocrinology* 61: 284–292.
- [18] Goodman R.L., Thiery J.E., Delaleu B., Malpoux B. 2000. Estradiol increases multiunit activity in the A<sub>15</sub> area of ewes exposed to inhibitory photoperiod. *Biol. Reprod.* 63: 1352–1357.
- [19] Harris T.G., Robinson J.E., Evans N.P., Skinner D.C., Herbison A.E. 1998. Gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression changes before the onset of the estradiol induced luteinizing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139: 57–64.
- [20] Herbison A.E. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr. Rev.* 19: 302–329.
- [21] Jansen H.T., Cutter C., Hardy S., Lehman M.N., Goodman R.L. 2003. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone system in the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology* 144: 3663–3676.
- [22] Kang S.M., Seong J.Y., Cho S., Cho H., Kim K. 1995. Acute increases of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamus area of ovariectomized estrogen and progesterone treated adult female rats. *Neuroendocrinology* 61: 486–492.
- [23] Kang S.S., Kim S.R., Leonhardt S., Jarry H., Wuttke W., Kim K. 2000. Effect of interleukin-1 $\beta$  on gonadotropin releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *Neuroendocrinology* 12: 421–429.
- [24] Kim K., Lee B.J., Cho B.N., Kang S.S., Choi W.S., Park S.D., Lee C.C., Cho W.K., Wuttke W. 1994. Blockade of the noradrenergic neurotransmission with diethylodithiocarbonic acid decreases the mRNA level of gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus of ovariectomized steroid treated prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 59: 539–544.
- [25] Kim K., Lim S., Cho B.N., Kang S.S., Lee B.J., Choi K.H., Chung C.H., Lee C.C., Cho W.K., Wuttke W. 1993. A partial blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hydroxydopamine decreases mRNA level of gonadotropin-releasing hormone in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58: 146–152.
- [26] Kochman K., Przekop F., Okrasa S. 2007. Ośrodkowa regulacja neuralna procesów rozrodczych w: „Fizjologiczna regulacja procesów rozrodczych samicy”. Krzymowski T. (red.) Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawsko-Mazurskiego w Olsztynie: 21–46
- [27] Leonhardt S., Seong J.Y., Kim K., Thorun J., Wuttke W. 1995. Activation of central GABA<sub>A</sub> but not GABA<sub>B</sub> receptors rapidly reduces pituitary LH release and gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 61: 655–662.

- [28] Li S., Pelletier G. 1993. Chronic administration of muscimol and protobarbital decreases gonadotropin-releasing hormone mRNA levels in male rat hypothalamus determined by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 58: 136–139.
- [29] Li S., Pelletier G. 1995. Inhibitory effect of the pentyl octadecaneuropeptide (ODN), on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *NeuroReport* 6: 1354–1356.
- [30] Lincoln G.A. 2002. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotropin and prolactin rhythms: lesson from Soay ram model. *Reproduction*, Suppl. 59: 131–141.
- [31] Łapot M., Ciechanowska M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2007. The effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor genes in the discrete regions of the hypothalamus and pituitary of anestrus ewes. *Reprod. Biol.* 7: 55–71.
- [32] Łapot M., Ciechanowska M., Malewski T., Mateusiak K., Misztal T., Przekop F. 2008. Changes in mRNA GnRH and mRNA GnRH receptor (GnRH-R) levels in the hypothalamic-anterior pituitary unit of anestrus ewes after infusion of GnRH into third cerebral ventricle. *Reprod. Biol.* 8: 149–161.
- [33] Misztal T., Romanowicz K., Barcikowski B. 2002. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 187–198.
- [34] Nappi R.E., Rivest S. 1997. Effect of immune and metabolic challenges on luteinizing hormone-releasing hormone neural system in cycling female rats: an evaluation at the transcriptional level. *Endocrinology* 138: 1374–1384.
- [35] Polkowska J., Przekop F. 1997. The effect of corticotropin-releasing factor (CRF) on the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) hypothalamic neuronal system during preovulatory period in the ewe. *Acta Neurobiol. Exp.* 57: 93–99.
- [36] Przekop F. 2007. Stres i jego wpływ na procesy rozrodcze zwierząt. W: „Fizjologiczna regulacja procesów rozrodczych samicy”, Krzymowski T. (red.) Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: 421–431.
- [37] Rivest S., Rivier C. 1995. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulations of neurons controlling reproductive function. *Endocr. Rev.* 16: 177–199.
- [38] Robinson J.E., Healey A.E., Harris T.G., Messent E.A., Skinner D.C., Taylor J.A., Evans N.P. 2000. The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA in neurons of rostral diencephalons in the rat. *J. Endocrinol.* 124: 285–289.
- [39] Roth C., Jung K., Kim K., Arias P., Moguilevsky J., Jarry H., Leonhardt S., Wuttke W. 1997. Involvement of gamma amino butyric acid (GABA) in the postnatal function of the pulse generator as determined on the basis of GnRH and GnRH-receptor gene expression in the hypothalamus and pituitary. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 105: 353–358.
- [40] Sarkar D.K. 1987. In vitro secretion of LHRH in ovariectomized rats is regulated by a possible autocrine feedback mechanism. *Neuroendocrinology* 45: 510–513.
- [41] Scott C.J., Cummis J.T., Clarke I.J. 1992. Effect on plasma luteinizing hormone levels of microinjection of norepinephrine and adrenaline into the septo-preoptic area of the brain of the ovariectomized ewes, changes with season and chronic estrogen treatment. *Journal of Neuroendocrinology* 4: 131–141.
- [42] Scott C.J., Clarke I.J. 1993. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors but not GABA-B receptors. *Endocrinology* 132: 1789–1796.
- [43] Seong J.Y., Jarry H., Kühnemuth S., Leonhardt S., Wuttke W. 1995. Effect of GABAergic compound on gonadotropin releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 136: 2587–2593.
- [44] Tanebe K., Nishijo A., Maraguchi A., Ono T. 2000. Effect of chronic stress on hypothalamic interleukin-1b, interleukin-2, and gonadotropin-releasing hormone gene expression in ovariectomized rats. *J. Neuroendocrinol.* 12: 13–21.
- [45] Tomaszewska-Zaremba D., Przekop F. 2005. Effect of GABA<sub>B</sub> receptor modulation on gonadotropin-releasing hormone and  $\beta$ -endorphin release, and on the catecholaminergic activity in the ventromedial hypothalamus-infundibular nucleus region of anestrus ewes. *J. Neuroendocrinol.* 17: 49–56.
- [46] Tortonese D.J. 1999. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photo-periodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 140: 750–757.

## Expression of the GnRH and GnRH receptor (GnRHR) genes in hypothalamus-pituitary system of ewes during different physiological states

**Key words:** ewe, hypothalamus, pituitary, GnRH, mRNA GnRH, mRNA GnRHR, receptors: GABA<sub>A</sub>-ergic,  $\mu$ -opioidergic, CRH-ergic, dopaminergic DA-2

### Summary

This review is focused on the relationship between the neuroendocrine control of GnRH/LH secretion and the expression of GnRH and GnRHR genes in the hypothalamic-pituitary system during different physiological states of animals and under the stress conditions. In this aspect we analyzed the role of several neurotransmitter/neurohormone systems in the hypothalamus, i.e. the controlling of GnRH release and the expression of GnRH and GnRHR genes.

The results obtained on sheep and rats showed that the expression of both genes in some physiological states is to a high degree related to LH secretion but not in others. The neural systems in the hypothalamus, which are involved in the suppression of GnRH/LH secretion ( $\beta$ -endorphinergic, GABA-ergic, CRH-ergic) in the cycling ewes, also inhibit GnRH mRNA expression in the hypothalamus. The infusion of  $\beta$ -endorphin, muscimol (GABA<sub>A</sub> receptor agonist) and CRH decreases GnRH gene expression. However, agonists and antagonists of  $\mu$ -opioidergic, GABA<sub>A</sub>-ergic and CRH-ergic receptors affect in a specific way the expression of GnRHR gene in discrete areas of the hypothalamus of follicular phase ewes. Thus suggests, that the GnRHR genes of selected hypothalamic structures are located in different neural systems. In the anestrus ewes the increase of LH secretion was followed with the decrease in GnRH mRNA in the ventromedial hypothalamus and GnRHR mRNA in the ventromedial hypothalamus/stalk-median eminence after the blockade of dopaminergic DA-2 receptors in the hypothalamus. It is likely that these events are related to an increase in biosynthesis GnRH with concomitant decreased of GnRHR protein in the hypothalamus allowing to an increase in GnRH release. The increase of GnRH mRNA in the ventromedial hypothalamus after a prolonged infusion of small GnRH doses into the third cerebral ventricle suggests that the ultrashort loop of the negative feedback action of GnRH in the hypothalamus on the GnRH release is exerted at the genomic level.

Much more information is necessary to establish the precise manner in which several neurotransmitter/neurohormone systems in the hypothalamus regulate GnRH and GnRHR genes expression and the role of GnRHR mRNA in GnRH gene expression.



## **Prawna ochrona odmian roślin w Unii Europejskiej i USA – system *sui generis***

**Tomasz Zimny<sup>1</sup>, Sławomir Sowa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Instytut Nauk Prawnych PAN, Zakład Prawa Prywatnego  
00-330 Warszawa; ul. Nowy Świat 72  
e-mail: [tzimny@inp.pan.pl](mailto:tzimny@inp.pan.pl)*

<sup>2</sup>*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin,  
Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin  
Radzików, 05-870 Błonie  
e-mail: [s.sowa@ihar.edu.pl](mailto:s.sowa@ihar.edu.pl)*

**Słowa kluczowe:** odmiany roślin, regulacje prawne, własność intelektualna, ochrona odmian

### **Wstęp**

Postęp biologiczny w rolnictwie uzależniony jest m.in. od efektywnie prowadzonej działalności hodowlanej. O ile hodowla roślin prowadzona była praktycznie od czasów, gdy człowiek rozpoczął uprawę, o tyle jako działalność odrębna, wyspecjalizowana, pojawiła się w XIX w. W przypadku odmian, których powstanie możliwe było dzięki wykorzystaniu środków publicznych kwestia opłacalności samej działalności hodowlanej mogła zejść na dalszy plan, a powstałe w jej wyniku odmiany mogły być dostępne powszechnie. Inaczej sytuacja kształtowała i kształtuje się w przypadku odmian wyhodowanych przez podmioty prywatne bądź dzięki ich środkom. W tym przypadku musi istnieć mechanizm pozwalający im na zwrot zainwestowanych funduszy. Środkiem służącym temu celowi było stworzenie systemu ochrony odmian roślin, który pozwala hodowcom na ograniczenie swobody wykorzystywania tworzonych przez nich odmian przez inne podmioty, a przede wszystkim pozwala im, przynajmniej teoretycznie, na pobieranie opłat od osób wykorzystujących składniki chronionych odmian. Pierwsze europejskie uregulowania w tym zakresie pojawiły się w latach 40. i 50. XX w. [18].

Wraz z pojawieniem się w hodowli roślin nowych metod inżynierii genetycznej i biotechnologii zmianie zaczęło ulegać również podejście urzędów patentowych do kwestii ochrony odmian za pomocą patentów. Doprowadziło to do sytuacji, w której hodowcy mogą, w pewnym zakresie, otaczać nowe odmiany także ochroną patentową.

Mimo postępującej harmonizacji, między regulacjami obowiązującymi w różnych częściach globu, doszukać się można szeregu istotnych różnic, które rzutują na sytuację hodowców czy rolników. Różnice takie, przekładające się na zakres uprawnień przyśługujących wspomnianym grupom, występują na przykład między uregulowaniami obowiązującymi w Stanach Zjednoczonych Ameryki i Unii Europejskiej.

W ostatnich latach prawo własności intelektualnej przeszło kilka istotnych przemian. Polegały one nie tylko na tym, że ochroną zaczęto otaczać dobra do tej pory nie chronione, ale również na tym, że ochrona ta udzielana była w coraz większej liczbie krajów. Ochrona własności intelektualnej ma istotny wpływ na rozwój danej gałęzi gospodarki. Z jednej strony może ów rozwój stymulować zapewniając inwestorom możliwość czerpania zysków z dokonanych inwestycji, z drugiej strony może ten rozwój hamować, ograniczając przepływ informacji czy możliwość wykorzystania chronionych technologii [5].

Obecnie można wyróżnić dwa główne modele ochrony interesów hodowców. W ramach pierwszego z nich tworzy się tzw. systemy *sui generis*, czyli systemy swoiste, tworzone specjalnie po to, aby chronić odmiany roślin. Charakteryzują się one szczególnym zestawem przesłanek udzielenia ochrony oraz szczególnym sposobem ukształtowania zakresu ochrony i praw hodowców. Drugim sposobem ochrony jest wykorzystanie systemu patentowego. Przepisy prawa patentowego modyfikuje się na ogół w pewnym stopniu, aby lepiej nadawały się do ochrony wynalazków, jakimi są wynalazki biotechnologiczne. Zarówno przesłanki udzielenia ochrony, jak i jej zakres oparte są na systemie ochrony patentowej. Oba modele różnią się między sobą zarówno pod względem przedmiotu ochrony, jak i jej zakresu.

Art. 27.3 lit. b Porozumienia w sprawie Handlowych Aspektów Praw Własności Intelektualnej (TRIPS od ang. Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights) nakazuje stronom wprowadzenie patentowego systemu ochrony odmian roślin bądź systemu *sui generis*, bądź ich kombinacji. Systemy *sui generis* zostały zaprojektowane po to, aby chronić interesy hodowcy za pomocą prawa do odmiany. Dlatego też akty prawne implementujące taki system zawierają szereg regulacji odnoszących się bezpośrednio do odmian roślin, zarówno definiują przesłanki otaczania danej odmiany ochroną (np. odrębność, wyrównanie), jak i określają sposoby stosowania tej ochrony.

Najważniejszy akt prawa międzynarodowego w dziedzinie ochrony odmian *sui generis* – konwencja UPOV – do roku 1991 przewidywał zakaz otaczania odmian ochroną podwójną, tzn. zarówno *sui generis*, jak i patentową. Liczne akty prawa patentowego (np. Konwencja o udzielaniu patentów europejskich – EPC) zawierają wprost wyrażony zakaz patentowania odmian roślin, w związku z czym oferowana przez nie ochrona odmian jako takich nie jest możliwa i mogą być one chronione patentem tylko wtedy, gdy same nie stanowią przedmiotu wynalazku.

Niniejszy artykuł zawiera przegląd podstawowych informacji dotyczących ochrony interesów hodowców za pomocą praw swoistych, czyli przyznawanych w ramach systemów *sui generis*.

## Konwencja UPOV [7]

Podstawowym aktem prawa międzynarodowego, który reguluje kwestie ochrony odmian za pomocą praw do odmiany jest Konwencja na rzecz ochrony nowych odmian roślin (UPOV). Podpisano ją w Paryżu w 1961 r., od tamtego czasu została kilkakrotnie zmieniona, ostatnio w 1991 r. Celem tego aktu jest ochrona nowych odmian roślin prawem własności intelektualnej po to, aby wspierać postęp w rolnictwie poprzez zachęcanie hodowców do tworzenia nowych odmian roślin. Obecnie stronami konwencji jest 65 podmiotów, w tym Unia Europejska<sup>1</sup>, Polska i USA.

Zgodnie z treścią konwencji, każda ze stron, zobowiązana jest do stworzenia instrumentów umożliwiających hodowcom ubieganie się o „prawo hodowcy”, czyli prawo, którego istota wyraża się w tym, że bez zgody hodowcy niedozwolone są następujące działania dotyczące materiału do rozmnożeń (art. 14):

- wytwarzanie i rozmnażanie,
- przygotowywanie do rozmnożenia,
- oferowanie na sprzedaż,
- sprzedaż lub inne sposoby wprowadzania na rynek
- eksport,
- import
- składowanie w powyższych celach [3].

Aby uzyskać taką ochronę, hodowca<sup>2</sup> musi wytworzyć odmianę charakteryzującą się nowością, odrębnością, wyrównaniem i trwałością. Zgodnie z treścią konwencji w jej ostatniej wersji ochroną można otoczyć odmiany dowolnego gatunku, a więc nie tylko wykorzystywane rolniczo.

Hodowca może uzyskać prawo ochronne dla swojej odmiany jeżeli charakteryzuje się ona nowością, odrębnością, wyrównaniem i trwałością. Odmiana zostaje uznana za nową, jeśli w dniu składania wniosku o przyznanie prawa hodowcy materiał siewny lub plon rośliny danej odmiany nie został sprzedany lub w inny sposób przekazany innej osobie przez hodowcę lub za jego zgodą, do celów eksploatacji odmiany na terytorium umawiającej się strony, gdzie złożony został wniosek, przed upływem roku od daty złożenia wniosku lub czterech (a w przypadku drzew i winorośli – sześciu) lat jeżeli wspomniane wprowadzenie na rynek miało miejsce poza terytorium państwa będącego stroną umowy. Oznacza to, że hodowca, który

---

<sup>1</sup> To, że Unia Europejska jest stroną konwencji nie oznacza automatycznie, że wszyscy członkowie UE przystąpili do konwencji. Istnieją kraje, które nie podpisały konwencji UPOV, ale istnieje w nich system ochrony odmian wprowadzony przez prawo unijne.

<sup>2</sup> Zgodnie z art. 1 ust. iv konwencji hodowcą jest osoba, która wytworzyła odmianę lub ją odkryła, osoba będąca pracodawcą lub zleceniodawcą takiej osoby, jeżeli przewiduje to ustawodawstwo strony, a także następcy prawni wymienionych osób.

chce zarejestrować odmianę, co do zasady powinien to zrobić najpóźniej w rok po tym, gdy przekazał ją do eksploatacji.

Odmianę uznaje się za odrębną, jeśli wyraźnie odróżnia się od innych odmian, o których istnieniu powszechnie wiadomo w momencie składania wniosku. Jednocześnie, złożenie wniosku o przyznanie prawa ochronnego w dowolnym kraju będącym stroną konwencji powoduje, że staje się ona odmianą „o której powszechnie wiadomo” w myśl wspomnianego przepisu.

Wyrównanie odmiany to cecha przejawiająca się w tym, że zależnie od różnic, jakich można się spodziewać ze względu na zmienność spodziewaną ze względu na szczególnie właściwości jej rozmnażania, odmiana jest wystarczająco jednolita, jeśli chodzi o jej istotne cechy charakterystyczne [1].

Trwałość odmiany stwierdza się jeżeli jej istotne cechy pozostają niezmienione po wielokrotnym rozmnażaniu lub, w przypadku danego cyklu rozmnażania, pod koniec każdego takiego cyklu.

Ochrona rozciąga się również (z wyjątkiem zakazu eksportu, importu i składowania w tych celach) na odmiany wywiedzione zasadniczo z innej odmiany, o ile chroniona odmiana nie jest również odmianą zasadniczo wywiedzioną<sup>3</sup>.

Ponadto chronione są też odmiany, które nie różnią się wyraźnie od odmiany chronionej oraz odmiany, których wytwarzanie wymaga powtarzalnego używania odmiany chronionej [15]. Innymi słowy, prawo hodowcy chroni nie tylko konkretną odmianę, ale także np. uzyskiwane dzięki niej odmiany mieszańcowe.

Prawo hodowcy może być przyznane na okres co najmniej 20 lat, a w przypadku drzew i winorośli – co najmniej 25 lat (art. 19 konwencji).

Od generalnej zasady wprowadzanej przez prawo hodowcy istnieją jednak pewne wyjątki. Trzy z nich wprowadzane są przez konwencję obowiązkowo, zaś wprowadzenie czwartego zostało pozostawione decyzji stron. Zgodnie z art. 15 konwencji, prawo hodowcy nie rozciąga się na:

- działania prywatne, dokonywane w celach niekomercyjnych,
- działania dokonywane w celach eksperymentalnych,
- działania dokonywane w celu wyhodowania nowych odmian, z wyjątkiem odmian pochodnych, odmian nie odrębnych od odmian chronionych oraz składników odmian mieszańcowych. (tzw. przywilej hodowlany).

---

<sup>3</sup> Odmianę uważa się za zasadniczo wywiedzioną z innej odmiany (zwanej „odmianą macierzystą”), jeżeli: jest wywiedzona głównie z odmiany macierzystej lub z odmiany, która jest sama wywiedzona głównie z odmiany macierzystej, zachowując przejaw zasadniczych właściwości, które wynikają z genotypu lub kombinacji genotypów odmiany macierzystej odróżnia się wyraźnie od odmiany macierzystej i pomijając różnice wynikające ze sposobu wywiedzenia, odpowiada odmianie macierzystej w przejawie zasadniczych właściwości, które wynikają z genotypu lub kombinacji genotypów odmiany macierzystej. Odmianą zasadniczo wywiedzioną jest więc taka odmiana, która ma cechy odmiany macierzystej i niewiele się od niej odróżnia.

Ponadto konwencja przewiduje możliwość wprowadzenia przez państwa kolejnego wyjątku polegającego na zezwoleniu rolnikowi na zachowywanie części zebranego ziarna w celu wysiania go na własnym polu w następnym sezonie (przywilej farmerski).

## **Przywilej hodowlany**

Celem wprowadzenia tego wyjątku od prawa do odmiany jest wspieranie postępu w hodowli poprzez umożliwianie innym hodowcom pracy nad wytworzeniem nowych odmian przy wykorzystaniu już istniejących. Wyjątek ten jest niezwykle ważny z punktu widzenia hodowców, ponieważ w pewnym stopniu uniezależnia ich od posiadacza praw do odmiany, którą wykorzystują w swoich pracach. Jednocześnie stanowi on dosyć silny wyłom w monopolu posiadacza praw do odmiany.

## **Przywilej farmerski (odstępstwo rolne)**

Zachowywanie nasion, bądź innych części roślin ze zbiorów, w celu wykorzystania ich jako materiału do rozmnożeń ma podłoże nie tylko ekonomiczne (pozwala zaoszczędzić na opłatach licencyjnych), ale również uwarunkowane jest względami tradycji. Praktyka taka jest powszechna w wielu krajach i to od dawna. W związku z tym, w konwencji przewidziano możliwość wprowadzenia przepisów pozwalających na zachowywanie materiału rozmnożeniowego w celu wykorzystania go we własnym gospodarstwie. Ponieważ jednak takie ograniczenie monopolu hodowcy może istotnie godzić w jego interesy ekonomiczne, konwencja nie obliguje stron do wprowadzenia tego przywileju, a ponadto pozwala im na wprowadzanie go w ograniczonym zakresie (np. jedynie odnośnie do niektórych gatunków roślin). Kwestie dotyczące warunków, w jakich ów przywilej może być wykorzystywany przez rolników są przedmiotem licznych sporów zostaną one szerzej omówione przy okazji analizy przepisów UE.

## **Wyczerpanie prawa do odmiany**

Instytucja wyczerpania prawa do odmiany w stosunku do materiału wprowadzonego na rynek przez hodowcę lub za jego zgodą ma na celu umożliwienie obrotu i swobodnego wykorzystania materiału przez legalnego nabywcę. Zgodnie z art. 16 konwencji, prawo do odmiany nie rozciąga się na działania dotyczące materiału odmiany chronionej, odmian pochodnych, odmian nieodrębnych od odmian chronionych oraz składników odmian mieszańcowych, jeżeli materiał ten został wprowadzony na rynek przez hodowcę lub za jego zgodą, oraz na działania dotyczące materiału wywiezionego z materiału wprowadzonego na rynek chyba, że działania te

mają na celu rozmnażanie tej odmiany lub eksport do kraju, w którym nie podlegałyby ona ochronie.

Skutkiem rozwiązania przyjętego w konwencji jest to, że materiał odmiany po wprowadzeniu na rynek może być przedmiotem normalnego obrotu, również z wykorzystaniem pośredników w tym obrocie pod warunkiem, że działania dotyczące obrotu nie mają na celu rozmnażania samej odmiany, co w oczywisty sposób godziłoby w interesy hodowcy. Zakaz eksportu materiału do krajów, w których odmiana nie podlegałaby ochronie ma przede wszystkim na celu uniknięcie sytuacji, w której przepisy o ochronie odmian byłyby omijane w ten sposób, że odmiana rozmnażana byłaby w innym kraju, wbrew woli hodowcy i z naruszeniem jego interesów.

### **Stosunek konwencji UPOV do uregulowań krajowych bądź regionalnych**

Przedstawiona konwencja obliguje strony do wprowadzenia przepisów, które umożliwiłyby hodowcom uzyskiwanie praw chroniących ich odmiany. W związku z tym akty prawne przyjęte w tym zakresie przez strony konwencji oparte są w dużej mierze na konwencji UPOV. Zawiera ona bowiem przepisy, które wyznaczają pewne minimalne warunki ochrony odmian. Przepisy wprowadzane w krajach będących jej stronami nie mogą przyznawać ochrony słabszej niż określana przez przepisy konwencji. Dotyczy to zarówno przepisów polskich jak i wspólnotowych, czy amerykańskich.

### **Rozporządzenie 2001/94/WE w sprawie wspólnotowego systemu ochrony odmian roślin [11]**

Rozporządzenie to wprowadzono w celu zharmonizowania przepisów o ochronie roślin na terenie Unii Europejskiej. Jak można się przekonać na podstawie lektury preambuły, zostało ono wprowadzone z uwzględnieniem zarówno konwencji UPOV, jak i porozumienia TRIPS, jak również EPC. Rozporządzenie wprowadza europejski system ochrony odmian, będący systemem *sui generis*. W związku z tym, jego postanowienia oparte są w dużym stopniu na konwencji UPOV.

Wspólnotowy system ochrony odmian roślin istnieje równolegle do systemów ochrony odmian istniejących w poszczególnych krajach UE [6]. Nie oznacza to jednak, że systemy te są od siebie zupełnie niezależne. Z art. 92 Rozporządzenia wynika bowiem, że niedopuszczalna jest sytuacja, w której odmiana chroniona prawem wspólnotowym jednocześnie była chroniona prawem czy patentem krajowym. Otoczenie odmiany ochroną w ramach systemu wspólnotowego zamyka więc drogę od ubiegania się o przyznanie osobnego prawa ochronnego w poszczególnych państwach.

Zgodnie z art. 5.1 rozporządzenia, przedmiotem wspólnotowego prawa ochronnego mogą być „Odmiany wszystkich botanicznych rodzajów i gatunków oraz mieszańce między rodzajami i gatunkami”. Pojęcie „odmiana” oznacza zaś „zbiorowość roślin jednej botanicznej jednostki systematycznej najniższego znanego stopnia, którą, niezależnie od tego czy w pełni odpowiada warunkom przyznania prawa do odmian roślin, można:

- określić na podstawie przejawianych właściwości wynikających z określonego genotypu lub kombinacji genotypów,
- odróżnić od każdej innej zbiorowości roślin na podstawie przejawiania co najmniej jednej wspomnianej właściwości,
- uznać za jednostkę systematyczną ze względu na jej właściwość rozmnażania się bez zmian”.

Definicja odmiany zawarta w rozporządzeniu pokrywa się w zasadzie z definicją zawartą w art. 1 pkt. vi. konwencji UPOV.

W podobny sposób uregulowane zostały również kwestie związane z zakresem uprawnień przysługujących hodowcy<sup>4</sup>. Warto zauważyć, że w rozporządzeniu zdecydowano się na wprowadzenie przywileju farmerskiego. Z punktu widzenia niniejszego opracowania istotne będzie wspomnienie, że autorzy rozporządzenia zdecydowali się na wprowadzenie przywileju farmerskiego.

Ustawodawca europejski zdecydował się na wprowadzenie tego wyjątku od prawa ochronnego, w pewnym stopniu ograniczył jednak jego zastosowanie. Przede wszystkim, z przywileju farmerskiego skorzystać mogą jedynie rolnicy uprawiający określone w rozporządzeniu gatunki roślin<sup>5</sup>. Ponadto jedynie posiadacze małych gospodarstw zwolnieni są z obowiązku zapłaty wynagrodzenia posiadaczowi prawa do odmiany. Pozostali rolnicy „obowiązani są do zapłaty godziwego wynagrodzenia posiadaczowi; wysokość wynagrodzenia powinna być w rozsądnym stopniu niższa od wysokości wynagrodzenia pobieranego w przypadku umowy licencyjnej na produkcję materiału rozmnożeniowego tej samej odmiany, na tym samym obszarze”<sup>6</sup>.

---

<sup>4</sup> Zgodnie z art. 11 hodowcą jest osoba, która wyhodowała lub odkryła i rozwinęła odmianę lub jej następcą prawną. Natomiast to, czy za hodowcę może być uznany pracodawca lub zleceniodawca hodowcy zależy od przepisów krajowych.

<sup>5</sup> Zgodnie z art. 14.2 są to wśród roślin pastewnych: ciecierzycza pospolita, łubin żółty, lucerna siewna, koniczyna aleksandryjska, koniczyna perska, groch zwyczajny, bobik, wyka siewna, rajgras włoski; wśród zbóż: owies zwyczajny, jęczmień, ryż, kanar, żyto, pszenżyto, pszenica, pszenica durum, orkisz; ponadto przywilej dotyczy ziemniaka oraz roślin oleistych i włóknistych: rzepaku, rzepiku i lnu oleistego z wyłączeniem lnu włóknistego.

<sup>6</sup> To, kogo można uznać za posiadacza małego gospodarstwa zależy m.in. od gatunku rośliny, którą uprawia i możliwości produkcyjnych gospodarstwa.

Pojawia się tu pytanie o to, jakie wynagrodzenie powinien uiścić rolnik, który zawiera umowę z hodowcą i jak powinno być ono ustalone. Na to pytanie nie można udzielić jednoznacznej odpowiedzi. Zgodnie z art. 5.3 Rozporządzenia 1768/95 w sprawie ustanowienia przepisów wykonawczych w zakresie odstępstwa rolnego przewidzianego w art. 14 ust. 3 rozporządzenia Rady (WE) nr 2100/94 w sprawie wspólnotowego systemu ochrony odmian roślin [13], „Poziom wynagrodzenia uważa się za niższy w rozsądnym stopniu (...) jeżeli nie przekracza poziomu koniecznego dla ustanowienia bądź stabilizacji, jako czynnik ekonomiczny określający zakres korzystania z odstępstwa, racjonalnie zrównoważonej proporcji między korzystaniem z licencjonowanego materiału rozmnożeniowego a korzystaniem z materiału ze zbioru poszczególnych odmian objętych wspólnotowym systemem ochrony odmian roślin. Proporcję taką należy uznać za racjonalnie zrównoważoną, jeżeli zapewnia posiadaczowi odmiany otrzymanie, w całości, prawnie uzasadnionego wynagrodzenia z tytułu całokształtu korzystania z jego odmiany.”

Jak łatwo zauważyć, przytoczony fragment jest niejasny i trudno wywieść z niego jakieś konkretne dyrektywy określania wysokości wynagrodzenia; nie pozwala on na precyzyjne określenie tej wysokości. Pewnych wskazówek mogą tu dostarczyć inne przepisy oraz orzecznictwo. Wysokość wynagrodzenia za wykorzystanie materiału rozmnożeniowego w ramach przywileju farmerskiego może być ustalona w umowie między hodowcą a rolnikiem (wówczas strony mają swobodę w jej określaniu) bądź też na podstawie umów zawartych między organizacjami posiadaczy a rolnikami. Jeżeli takich umów nie zawarto, to wynagrodzenie powinno wynosić 50% (w niektórych przypadkach 40%) kwot pobranych za licencjonowaną produkcję materiału rozmnożeniowego najniższej kategorii, kwalifikującego się do urzędowej certyfikacji w odniesieniu do tej samej odmiany, na tym samym obszarze. W kwestii wynagrodzeń wypowiedział się również Trybunał Sprawiedliwości Wspólnot Europejskich w sprawie C-7/05<sup>7</sup> stwierdzając, że wynagrodzenie ryczałtowe wynoszące 80% kwoty pobieranej na tym samym obszarze z tytułu licencjonowanej produkcji materiału rozmnożeniowego najniższej kategorii tej samej odmiany nie spełnia wymogu, zgodnie z którym wynagrodzenie takie powinno być „znacząco niższe” od kwoty pobieranej za licencjonowaną produkcję materiału rozmnożeniowego i aby określić właściwą stawkę należy uwzględnić sytuację danych odmian oraz sytuację rozpatrywanego obszaru<sup>8</sup>.

Mimo że nie da się jednoznacznie określić wysokości opłat za wykorzystywanie materiału rozmnożeniowego w ramach przywileju farmerskiego, to jednak należy zauważyć, że poza drobnymi rolnikami wszyscy korzystający z niego muszą za wykorzystanie materiału uiścić jakąś opłatę. Ponadto, należy zwrócić uwagę na to, że

<sup>7</sup> Saatgut-Treuhandverwaltungs GmbH przeciwko Ulrichowi Deppemu i in., 2006/C 178/07.

<sup>8</sup> pkt. 28 uzasadnienia.



przywilej farmerski obejmuje materiał jedynie niektórych gatunków roślin i nie może być rozciągany na odmiany innych gatunków. Poza tym przywilej ten pozwala jedynie na wykorzystywanie materiału we własnym gospodarstwie, a więc nie pozwala na udostępnianie czy sprzedawanie go innym rolnikom.

Rozporządzenie 2100/94 przewiduje dłuższe okresy ochrony, niż okresy minimalne określone w UPOV. Podstawowy okres ochrony wynosi 25 lat dla odmian większości gatunków, oraz 30 lat dla odmian winorośli, ziemniaków i drzew.

Prawo ochronne przyznawane przez Wspólnotowy Urząd do spraw Odmian Roślin chroni odmianę na terenie całej Unii [2]. Do hodowcy należy decyzja, czy zdecyduje się na ochronę na podstawie przepisów krajowych, czy też wystąpi o wspólnotowe prawo ochronne. Należy jednak pamiętać, że decydując się na ochronę za pomocą prawa wspólnotowego, hodowca uzyskuje jednolitą ochronę na całym obszarze Unii, natomiast decydując się na ochronę za pomocą systemów krajowych, może uzyskać różny stopień ochrony w różnych krajach, natomiast w Grecji, na Malcie, na Cyprze i w Luksemburgu nie uzyska ochrony, gdyż tam krajowe systemy ochrony odmian nie funkcjonują. Ponadto, decyzja o ochronie w różnych krajach osobno skutkować będzie koniecznością wnoszenia opłat za ochronę w każdym z tych krajów. Do hodowcy należy decyzja co do tego czy odmianę chronić za pomocą systemów krajowych czy systemu wspólnotowego.

Opłata za wniosek wynosi obecnie 900 EUR. Do tej opłaty należy doliczyć jeszcze opłaty za przygotowanie i przeprowadzenie badania technicznego w wysokości do 3000 EUR oraz coroczne opłaty za obowiązywanie prawa do danej odmiany, w wysokości 300 EUR rocznie [11].

Dla porównania opłaty pobierane za uzyskanie polskiego prawa do odmiany wynoszą maksymalnie 500 PLN za złożenie wniosku, 700 PLN za każdy sezon badania odmiany, 100 PLN za przyznanie prawa oraz 400 PLN za każdy rok obowiązywania prawa (w pierwszych 5 latach 200 PLN) [12]. Należy tu jednak zwrócić uwagę, że prawo unijne gwarantuje ochronę w 27 krajach, zaś prawo polskie – w Polsce.

### **Amerykański system *sui generis*, Ustawa o ochronie odmian roślin („Plant Variety Protection Act (PVPA)”)**

PVPA wprowadzono w USA w 1970 roku. W 1994 r. akt ten uległ istotnym zmianom. Jest to akt, który wprowadza system *sui generis* ochrony odmian roślin na terytorium Stanów Zjednoczonych. Ponieważ USA również są stroną UPOV, postanowienia tego aktu również zbliżone są do postanowień konwencji.

Sprzedż bądź oferowanie na sprzedaż materiału siewnego rośliny dozwolone jest wyłącznie za zgodą posiadacza prawa do odmiany. Okres ochrony wynosi dla

większości gatunków 20 lat, natomiast w przypadku odmian winorośli oraz drzew – 25 lat.

Co ciekawe, hodowca może wybrać jeden z dwóch sposobów ochrony swojej odmiany. Pierwszy z nich polega na tym, że do obrotu wprowadzany może być zarówno certyfikowany, jak i niecertyfikowany materiał siewny danej odmiany. Skutkiem wyboru tego sposobu ochrony jest to, że w razie naruszenia prawa do odmiany hodowca może wytoczyć przeciwko naruszającemu jedynie powództwo cywilne.

Drugi sposób polega na tym, że do obrotu może być wprowadzany wyłącznie certyfikowany materiał siewny. Rezultatem wyboru tej opcji jest to, że naruszający prawo do odmiany może również odpowiadać karnie za wprowadzanie do obrotu materiału siewnego. Odpowiedzialność ta powstaje na podstawie przepisów federalnej ustawy o nasiennictwie (Federal Seed Act).

Lista możliwych naruszeń prawa do odmiany zawarta w art. 111 omawianego aktu jest zbyt długa aby przytaczać ją w całości w niniejszym opracowaniu. Wymienione są w niej m.in. takie działania, jak: sprzedaż czy oferowanie do sprzedaży materiału siewnego chronionej odmiany, dostarczanie materiału siewnego innej osobie bez poinformowania jej, że odmiana podlega ochronie na podstawie PVPA, rozmnażanie, w celu sprzedaży materiału, import lub eksport materiału siewnego itd. Ponieważ zmiany w PVPA dokonane w 1994 r. miały na celu dostosowanie aktu do wymogów stawianych przez konwencję UPOV, zakres działań, których nie wolno dokonywać bez zgody posiadacza prawa do odmiany zasadniczo pokrywa się z zakresem wynikającym z Konwencji [8].

PVPA przewiduje również możliwość stosowania przywileju farmerskiego, co więcej, art. 113 PVPA, w którym te kwestie zostały uregulowane nie przewiduje opłat za korzystanie z tego przywileju. Opłaty takie mogą być jednak wprowadzone przez inne prawo federalne lub stanowe.

## Przepisy polskie

Hodowcy polscy mogą oczywiście wnioskować o przyznanie ich odmianie unijnego prawa ochronnego. Jeżeli z jakiejś przyczyny hodowca nie jest zainteresowany ochroną danej odmiany na terenie całej Unii, może on skorzystać z ochrony na podstawie przepisów krajowych w jednym, bądź większej liczbie państw.

Głównym polskim aktem prawnym regulującym kwestie ochrony odmian jest przyjęta 2003 r. Ustawa o ochronie prawnej odmian [16]. Ustawa ta została wprowadzona do polskiego porządku prawnego pod wpływem dostosowywania prawa polskiego do prawa wspólnotowego, w związku z czym jej uregulowania są zbliżone do uregulowań zawartych w rozporządzeniu 2100/94/WE i konwencji UPOV. Ustawa polska funkcjonuje jako pewnego rodzaju alternatywa w stosunku do wspomnianego wyżej rozporządzenia. Urzędem zajmującym się zarządzaniem polskim systemem ochrony odmian (m.in. prowadzeniem księgi odmian chronionych oraz badaniem

odrębności, wyrównania i trwałości) jest Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU).

Zgodnie z ust. 6 art. 4 ustawy, „wyłączonego prawa nie przyznaje się, jeżeli odmiana została zgłoszona do ochrony albo jest chroniona przez Wspólnotowy Urząd Ochrony Odmian Roślin”. Oznacza to, że jeżeli dana odmiana podlega ochronie ustalonej na podstawie przepisów rozporządzenia 2100/94/WE, niemożliwe jest otoczenie jej ochroną na podstawie przepisów polskich.

Ponadto ustawa polska ustala to, kto może być uznawany za hodowcę w ten sposób, że jest nim nie tylko ten, kto wyhodował lub odkrył odmianę i ją wyprowadzi, ale pracodawca tego kogoś i jego następcy prawni. Jeżeli prawo do odmiany przysługuje pracodawcy osoby, która odmianę odkryła i wyprowadziła bądź wyhodowała, osobie takiej należy się wynagrodzenie za korzystanie z odmiany (art. 4a). Wprowadzenie takiej definicji hodowcy stanowi rozstrzygnięcie kwestii, którą w rozporządzeniu 2100/94/WE<sup>9</sup> pozostawiono do rozstrzygnięcia państwom członkowskim.

Od prawa do odmiany istnieją wyjątki podobne, jak w przypadku rozporządzenia wspólnotowego i konwencji UPOV. Nieco inaczej niż w rozporządzeniu został jednak uregulowany przywilej farmerski oraz kwestie odpłatności za korzystanie z niego. Otóż zgodnie z art. 23 ustawy, „Posiadacz gruntów rolnych może, za opłatą uiszczaną na rzecz hodowcy, używać materiału ze zbioru jako materiału siewnego odmiany chronionej wyłącznym prawem”. Wyjątek ten dotyczy wyłącznie wymienionych w ustawie gatunków:

- a) pszenicy zwyczajnej,
- b) żyta,
- c) jęczmienia,
- d) pszenżyta,
- e) owsa,
- f) kukurydzy,
- g) rzepaku ozimego,
- h) ziemniaka.

Ponadto, przywilej nie dotyczy odmian mieszańcowych i odmian powstałych ze swobodnego krzyżowania się linii gatunków obcocyplnych (odmian syntetycznych).

Katalog gatunków wymienionych w ustawie jest więc nieco inny, niż zawarty w art. 14.2 rozporządzenia 2100/94/WE, w związku z czym, hodowca może zdecydować się na wybór polskiego systemu ochrony odmian, np. ze względu na chęć uniknięcia stosowania przywileju farmerskiego w stosunku do odmiany, którą zamierza chronić.

---

<sup>9</sup> Zgodnie z art. 11.4 rozporządzenia „jeżeli hodowca jest pracownikiem, prawo do wspólnotowej ochrony odmian roślin określa prawo krajowe właściwe dla stosunku pracy, w ramach którego wyhodowano lub odkryto i rozwinięto odmianę”.

Oprócz tego, inaczej została uregulowana kwestia odpłatności za korzystanie z przywileju farmerskiego. Otóż zgodnie z ust. 3 art. 23, „posiadacz gruntów rolnych o powierzchni do 10 ha może używać materiału ze zbioru odmiany chronionej wyłącznym prawem, będącej odmianą roślin, o których mowa w ust. 2 pkt 1, jako materiału siewnego bez konieczności uiszczania opłaty na rzecz hodowcy.” Ustawodawca polski uzależnił, więc możliwość bezpłatnego stosowania przywileju farmerskiego wyłącznie od powierzchni gospodarstwa, nie zaś od gatunku uprawianej rośliny i faktycznych możliwości produkcyjnych gospodarstwa, jak to ma miejsce w przypadku rozporządzenia 2100/94/WE.

Należy tu jeszcze wspomnieć, że zgodnie z art. 37 Ustawy o ochronie prawnej odmian, naruszanie prawa do odmiany stanowi przestępstwo zagrożone karą grzywny, ograniczenia wolności bądź pozbawienia wolności do roku. Taka sama kara grozi za oznaczanie nazwą odmiany chronionej materiału siewnego lub materiału ze zbioru innej lub nieznannej odmiany.

Osoba naruszająca cudze prawo do odmiany (np. rolnik, który uprawia rośliny danej odmiany bez uiszczenia opłaty licencyjnej bądź też niezgodnie z zasadami korzystania z przywileju farmerskiego) może się liczyć z tym, że poniesie nie tylko odpowiedzialność cywilną za takie działania, ale także odpowiedzialność karną. Przystępstwo naruszenia prawa do odmiany może popełnić każda osoba, która prowadzi określone w ustawie działania, bez zgody posiadacza prawa do odmiany.

## Praktyczne aspekty prawnej ochrony odmian w Polsce

Rolnicy często zapominają, że zgodnie z prawem wyłączne prawo hodowcy oznacza, że jedynie hodowcy lub podmioty upoważnione mogą wytwarzać, rozmnażać, przygotowywać do rozmnażania, oferować do sprzedaży, eksportować, importować oraz bezpłatnie przekazywać materiał siewny. Ponieważ wielu rolników ciągle wysiewa nasiona z własnego rozmnożenia udział kwalifikowanego materiału siewnego w 2009 roku w Polsce wynosił tylko 10% dla zbóż i 4,5% dla ziemniaków<sup>10</sup>. Dla porównania w UE przeciętny udział kwalifikowanych nasion w zasiewach wynosi średnio 55% dla zbóż i 40% dla ziemniaków [17]. Dużym problemem dla rynku nasiennego jest stałe zmniejszanie się zużycia kwalifikatów w latach 1996–2009, co z kolei wpływa na bardzo długi okres wymiany nasion sięgający 10 lat dla zbóż i ponad 20 dla ziemniaków. Sytuacja ta ma miejsce, mimo że opłaty za wykorzystanie kwalifikowanego materiału w Polsce są niskie w porównaniu z opłatami w innych krajach UE. Polskie hodowle roślin rolniczych, chcąc zmienić tę sytuację, utworzyły w 2003 roku Agencję Nasienną Sp. z o.o., która reprezentuje je w sprawach dotyczących kontroli obrotu materiałem nasiennym.

<sup>10</sup> Dane IERiGŻ.

Dzięki wprowadzeniu dopłat do materiału siewnego sytuacja na rynku nasion kwalifikowanych nieznacznie się poprawiła, jednak udział krajowych odmian w powierzchni reprodukcyjnej stale spada. Spadek udziału krajowych odmian w rynku nasiennym w latach 2000–2008 był największy w przypadku jęczmienia ozimego z 74% do 18,1%, a przypadku pszenicy z 90% do 55,4% [9]. Rolnicy powinni być świadomi, że stosowanie materiału kwalifikowanego nie tylko stanowi ważne źródło finansowania hodowli, ale jest również elementem innowacyjności, czego efektem jest lepszy wynik finansowy dla rolnika (mniejsza norma wysiewu, większy plon, dopłata z Agencji Rynku Rolnego). Pieniądze te w gospodarce rynkowej, w jakiej funkcjonują dziś firmy hodowlane są podstawą do wytwarzania postępu biologicznego, dzięki któremu nowe, lepsze odmiany mogą być rejestrowane każdego roku. Ponadto nielegalny obrót nasionami jest nie tylko niezgodny z prawem, ale również szkodliwy dla firm nasiennych, które są odpowiedzialne za dostarczenie wysokiej jakości materiału siewnego.

Rolnicy zapominają również, że przywilej farmerski dotyczy w Polsce na ogół gospodarstw o powierzchni poniżej 10 ha, a w przypadku odmian chronionych unijnym prawem do odmiany, gospodarstw o powierzchni poniżej 30 ha<sup>11</sup>. oraz wybranych gatunków roślin (pszenicy zwyczajnej, żyta, jęczmienia, pszenżyta, owsa, kukurydzy, rzepaku ozimego oraz ziemniaka). Odstępstwo nie dotyczy odmian mieszańcowych i odmian syntetycznych, czyli powstałych ze swobodnego krzyżowania się linii gatunków obcocyplnych, takie nasiona wszyscy rolnicy muszą kupować jako kwalifikowane. Ponieważ odstępstwo rolne nie dotyczy również odmian chronionych innych gatunków niż wymienione wysiewanie nasion własnej produkcji takich gatunków jest niedozwolone. Jednym z zadań Agencji Nasienną Sp. z o.o. jest ograniczenie bezprawnego wykorzystania nasion poprzez licencjonowanie produkcji materiału siewnego, zbieranie danych dotyczących wykorzystaniu materiału ze zbiorów własnych oraz kontrolę korzystania z odstępowstwa rolnego. Agencja obecnie reprezentuje trzynaście firm hodowlanych. Opłaty za wykorzystanie materiału z własnych zbiorów są ustawowo określone dla każdej odmiany i wynoszą 50% opłaty licencyjnej (od kilku do kilkunastu groszy za kilogram odmian zbóż do 5 PLN za 1 kg nasion odmian rzepaku). Obowiązkiem każdego rolnika jest sprawdzenie czy dana odmiana jest chroniona oraz jakie są wysokości opłat. Informacje takie można uzyskać w Agencji. Firmy hodowlane mają prawo żądania od rolnika informacji na temat wykorzystania materiału ze zbioru<sup>12</sup>, dlatego rolnik jest zobowiązany do wypełnienia formularza wysyłanego przez Agencję, nawet jeśli nie wykorzystał do siewu nasion ze zbioru.

<sup>11</sup> Jest to powierzchnia przybliżona, podawana przez Agencję Nasienną na podstawie danych dotyczących średnich plonów pszenicy. Zgodnie z przepisami rozporządzenia 2001/94/WE to czy dany rolnik jest zwolniony z ponoszenia opłaty zależy od możliwości produkcyjnych gospodarstwa nie zaś wyłącznie od jego powierzchni.

<sup>12</sup> art. 23a Ustawy o ochronie odmian.

Udzielenie takiej informacji jest obowiązkiem, a uchylenie się od przekazania informacji stanowi wykroczenie. Agencja wysyła dwa formularze w zależności od tego czy wysiewa się odmianę chronioną w Polsce (Agnas-1), czy za pomocą wspólnotowego prawa do odmiany (Agnas-2). Wypełnienie formularzy Agnas-1 i Agnas-2 jest obowiązkiem każdego rolnika, nawet jeśli nie otrzyma ich w danym roku od Agencji. Potrzebne informacje oraz wnioski znajdują się na stronach internetowych «[www.agnas.pl](http://www.agnas.pl)».

## Podsumowanie

Systemy *sui generis* mające na celu ochronę odmian były wprowadzane w różnych krajach już od lat 40. XX wieku. Od wejścia w życie konwencji UPOV systemy tego rodzaju w wielu krajach są ze sobą w dużym stopniu zharmonizowane. Pomiedzy systemami obowiązującymi w różnych krajach występują jednak pewne istotne różnice mające przełożenie na faktyczny poziom ochrony praw hodowców, a co za tym idzie na ekonomiczne interesy zarówno hodowców jak i rolników.

Różnice te dotyczą zarówno zakresu jak i okresu ochrony. Zgodnie z konwencją UPOV, okres ochrony nie może być krótszy niż 20 lat lub 25 lat odnośnie do drzew i winorośli. Takie okresy ochrony zostały też wprowadzone w prawie amerykańskim. W prawie unijnym i prawie polskim okresy ochrony wydłużono do 25 i 30 lat (w przypadku odmian winorośli, drzew i ziemniaka).

Prawo unijne oraz polskie przewidują różne ograniczenia przywileju farmerskiego. Przywilej określony w przepisach amerykańskich nie zawiera ograniczeń uzależnionych od gatunku uprawianej rośliny czy powierzchni gospodarstwa. Z drugiej jednak strony, ponieważ w USA można dosyć łatwo chronić odmianę zarówno za pomocą systemu *sui generis* jak i prawa patentowego, który tam przywileju farmerskiego nie przewiduje, w odniesieniu do wielu odmian rolnik po prostu z tego przywileju nie może skorzystać.

Z kolei przepisy wspólnotowego rozporządzenia 2100/94/WE ograniczają dosyć mocno możliwość skorzystania z przywileju farmerskiego przez rolnika i nakładają na niego obowiązek ponoszenia opłat (niższych niż opłaty licencyjne), ale rolnik będzie mógł skorzystać z przywileju farmerskiego również wówczas, gdy uprawiane przez niego rośliny chronione będą patentem. Podobnie sytuacja wygląda w Polsce chociaż polskie przepisy zawierają inną listę gatunków objętych przywilejem farmerskim niż przepisy wspólnotowe.

Należy tu zwrócić uwagę na fakt, że prawo UE, w odróżnieniu od polskiego, nie pozwala na skorzystanie z przywileju rolnikom uprawiającym kukurydzę.

Istotną cechą polskiego prawodawstwa jest również uznanie wszelkich naruszeń prawa do odmiany za przestępstwo ścigane z oskarżenia publicznego.

Omówione wyżej uregulowania tworzą pewne ramy systemu ochrony praw hodowców. Osobną kwestią jest skuteczność owych uregulowań, a więc praktyczna możliwość wyegzekwowania praw przez hodowcę. Możliwości te uzależnione są od całego szeregu czynników takich jak sprawność funkcjonowania systemu i służb za to odpowiedzialnych, świadomość prawna hodowców i rolników itd. Należy jednak podkreślić, że opłaty wynikające z ochrony praw hodowców są ważnym źródłem finansowania hodowli i są konieczne do transferu postępu biologicznego do praktyki.

## Literatura

- [1] Felchner K., Jasińska K., Lampart M., Marek D. 2009. Ustawa o ochronie prawnej odmian roślin. Komentarz, K. Felchner (red.), Warszawa: 311 ss.
- [2] Gacek E.S. 2008. Ochrona prawna odmian roślin (cz. I). *Hasło Ogrodnicze* 8: 16–17.
- [3] Gacek E.S. 2001. Plant variety protection and its implementation in Poland. *Plant Breeding and Seed Science* 45, Supplement: 59–63.
- [4] Jackson J.A. 2005. Agricultural biotechnology and the privatization of genetic information. Implications for innovation and equity. *The Journal of World Intellectual Property* 3(6): 825–848.
- [5] Kevles D.J. 2002. A history of patenting life in the United States with comparative attention to Europe and Canada. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities: 34 ss.
- [6] Kiewiet B. 2005. Plant variety protection in the European community. *World Patent Information* 27: 319–327.
- [7] Konwencja na rzecz ochrony nowych odmian roślin (UPOV) [«http://www.upov.int/en/publications/conventions/»](http://www.upov.int/en/publications/conventions/).
- [8] Kowalski S.P., Eboru R.V., Kryder R.D., Potter R.H. 2002. Transgenic crops, biotechnology and ownership rights: what scientists need to know. *The Plant Journal*. 31(4): 417.
- [9] Marciniak K. 2008. Polska hodowla roślin w 2008. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* nr 4/2008: 14–19.
- [10] Porozumienie w sprawie Handlowych Aspektów Praw Własności Intelektualnej, załącznik do porozumienia w sprawie utworzenia Światowej Organizacji Handlu (WTO), 1994 r.
- [11] Rozporządzenie 2001/94/WE w sprawie wspólnotowego systemu ochrony odmian roślin, OJ L 1994.227.1.
- [12] Rozporządzenie 1238/95 w sprawie ustanowienia zasad wykonawczych stosowania rozporządzenia Rady (WE) nr 2100/94 w odniesieniu do opłat na rzecz Wspólnotowego Urzędu Odmian Roślin, OJ L 1995.121.31.
- [13] Rozporządzenie w sprawie opłat za złożenie wniosku o przyznanie prawa do ochrony wyhodowanej albo odkrytej i wyprowadzonej odmiany, a także zarobkowego korzystania z niej, badanie odrębności, wyrównania i trwałości, przyznanie i utrzymywanie wyłącznego prawa, Dz. U. 2004.60.567.
- [14] Rozporządzenie 1768/95 w sprawie ustanowienia przepisów wykonawczych w zakresie odstępstwa rolnego przewidzianego w art. 14 ust. 3 rozporządzenia Rady (WE) nr 2100/94 w sprawie wspólnotowego systemu ochrony odmian roślin, OJ L 1995.173.18.
- [15] Sechley K.A., Schroeder H. 2002. Intellectual property protection of plant biotechnology inventions. *Trends in Biotechnology* 20(11): 456–461.
- [16] Ustawa o ochronie prawnej odmian Dz. U. 2003.137.1300 z późn. zm.
- [17] Wicki L. 2010. Poziom wykorzystania nosników postępu biologicznego w rolnictwie polskim w latach 1996–2009 *Roczniki Naukowe SERiA* T. XII, z. 1: s. 251–256.
- [18] Żakowska-Henzler H. 2006. Wynalazek Biotechnologiczny. Przedmiot patentu. Wydawnictwo Naukowe Scholar, Warszawa: 396 ss.

## Legal protection of plant varieties in the European Union and the USA – *sui generis* system

**Keywords:** plant varieties, legal regulations, intellectual property, plant variety protection

### Summary

Generally, one can distinguish two major systems of innovations' protection in the field of plant breeding – the patent system and the so called *sui generis* system. The latter was introduced on an international scale by the UPOV convention. The convention allows breeders to obtain an exclusive right to their newly created variety, provided, it meets the criteria of novelty, distinctness, uniformity and stability. Using protected variety material in farming is usually connected with an obligation to pay royalties to the breeder. Despite a worldwide process of harmonization, the regulations existing in various countries still differ in some significant respects. This article describes the *sui generis* systems in the USA and EU, points out to differences and also provides general information on some practical aspects of plant variety protection in Poland.



## **Biotesty w badaniach toksykologicznych i ekotoksykologicznych\***

***Łukasz Sikorski, Barbara Adomas***

*Katedra Ochrony Powietrza i Toksykologii Środowiska,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
10-720 Olsztyn, R. Prawocheńskiego 17  
e-mail: badomas@uwm.edu.pl*

**Słowa kluczowe:** biotesty, organizmy wskaźnikowe, środowisko

### **Wstęp**

Obecnie wiele dziedzin nauk oceniających środowisko naturalne stawia sobie za cel określenie wpływu zanieczyszczeń na wszystkich poziomach organizacji żywej materii. Badania prowadzi się, poczynając od określenia przemian biochemicznych zachodzących w komórce po ocenę zmian na poziomie ekosystemów, w których odnotowuje się zależność efektu toksycznego od ilości substancji chemicznej [59]. Współczesna wiedza poparta wspólnymi działaniami specjalistów z wielu dziedzin nauki określa charakter i wpływ związków chemicznych obecnych w środowisku na organizmy żywe. Jednak nie jest w stanie scharakteryzować wszystkich, biorąc pod uwagę ich dużą liczbę, zróżnicowanie stężeń, wielkości cząsteczkowe [33], czy choćby wysoką reaktywność szeroko rozpowszechnionych substancji niskocząsteczkowych [29]. Kluczowe zadanie, jakie ma do spełnienia toksykologia i ekotoksykologia, wiąże się z bezpośrednią oceną ryzyka wynikającego ze skażenia środowiska i dotyczy m.in. tworzenia systemów klasyfikacji opartych na rosnących poziomach toksyczności [48]. Do niedawna jedynymi metodami obrazującymi stan poszczególnych elementów środowiska były metody fizykochemiczne. Mimo że badania te przyczyniają się do eliminacji niektórych substancji toksycznych [44, 63], nie charakteryzują w sposób kompletny ich wpływu wobec testowanych gatunków. Analizy te informują jedynie o poziomie zanieczyszczeń, ale nie określają współdziałania badanych zwią-

---

\* Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr N N305 270134 finansowanego przez MNiSZW.

ków i ich bioaktywności. Nie oceniają również związków nie objętych ramami prawnymi w danym kraju. Badania takie niekiedy powodują mylną ocenę realnego zagrożenia środowiska przyrodniczego [39, 48]. Do zagadnienia tego odnoszą się również Wolska i in. [63] analizując założenia do Europejskiej Dyrektywy Ramowej dotyczącej Wody (WFD – **W**ater **F**ramework **D**irective) [21]. Obserwacje prowadzone zgodnie ze schematem: pomiar ekspozycji – badanie procesów kumulacji i metabolizmu zanieczyszczeń przez żywe organizmy [44], stały się podwaliną rozwoju i opracowania metod badawczych, które nazwano biotestami.

Biotest to standardowa procedura wskazująca wpływ zanieczyszczeń, bądź ich mieszanin wobec systemu biologicznego, jakim może być: organizm (roślinny lub zwierzęcy), zespół organizmów czy wycinek ekosystemu (mezosystem, mikrosystem), z jednoczesnym określeniem składu substancji i ich możliwych interakcji [32, 33, 38, 48, 53, 60]. Biotesty są interdyscyplinarnym ujęciem odpowiedzi organizmów na obecność konkretnych substancji chemicznych, które w celu określenia ich wpływu wykorzystują dziedziny naukowe takie jak np. fizjologia czy biochemia. Uzyskany wynik jednoznacznie stwierdza toksyczność danej próby lub jej brak, w porównaniu z zachowaniem organizmu nie narażonego na działanie wszystkich substancji chemicznych obecnych w analizowanej próbce [52]. Stosowanie w toksykologii i ekotoksykologii badań, w których rejestruje się zmiany morfologiczne lub/i fizjologiczne na poziomie komórkowym czy osobniczym, a niekiedy w konsekwencji śmierć badanego organizmu, mają na celu ochronę środowiska, co w sposób pośredni przekłada się na ochronę życia i zdrowia populacji ludzkiej [30]. Ich terażniejsza forma oraz konstrukcja jest wypadkową ponad dwudziestoletnich badań nad biotestami i ich wykorzystaniem. Zaowocowało to standaryzacją warunków ich przeprowadzania, obniżeniem kosztów związanych z samym badaniem, powszechną dostępnością kultur testowych [31], ujednoczeniem pomiarów oraz ich porównywalnością.

## **Biotesty i ich zróżnicowany podział**

Interdyscyplinarne metody analityczne oparte na materiale żywym obrazują potencjalne obciążenie próby przez zanieczyszczenie lub ich mieszaniny w zróżnicowanych matrycach środowiskowych. Mnogość metod nastęrcza jednak wiele problemów z ich klasyfikacją [33, 48]. Pierwotne klasyfikacje dotyczyły uzyskania informacji o poziomie skażenia konkretnego elementu środowiska, względem miejsca przeprowadzenia analizy. Prowadzi się testy laboratoryjne oparte na wzorcowaniu prób w warunkach kontrolowanych, których wynik określa poziom toksyczności prób rzeczywistych. Ponadto badaniom poddaje się konkretne próbki z poszczególnych elementów środowiska (m.in. woda, gleba, odcieki) i konfrontuje się je wobec prób wzorcowych [33]. W porównawczych badaniach środowiska wodnego najlepiej jest wykorzystać różne metody i te same próby poddać testom z użyciem różnych organizmów w celu określenia poziomu wrażliwości testu i eliminacji błędów

wynikających z oparcia badań na jednym teście [32]. Kolejnym sposobem uwzględniającym miejsce przeprowadzania testu jest analiza *in situ*, wykorzystująca odpowiedzi organizmów żyjących w środowisku naturalnym [2, 33, 41]. Analiza tego rodzaju umożliwia stałą wymianę medium, głównie wody, gdy badania przeprowadza się z użyciem ryb czy roślin jako organizmu wskaźnikowego i klasyfikuje się je jako biotest dynamiczny [23, 50, 54]. W przypadku gdy wymiana następuje w określonych odstępach czasowych, biotest tego rodzaju definiowany jest jako półstatyczny [7, 11, 50]. Test statyczny zaś charakteryzuje się brakiem zastępowania medium. W trakcie badania toksyczności, testowany pollutant o określonym stężeniu zadaje się tylko raz na nośnik, którym może być woda, osad czy gleba [18, 33, 50].

Analizy oparte na ocenie wpływu substancji na zmiany morfologiczne i fizjologiczne organizmu wskaźnikowego, z powodu szerokiego spektrum zróżnicowania metod, są przyczyną trudności w zaklasyfikowaniu ich do konkretnej grupy badań toksykologicznych. Jednym z podstawowych kryteriów praktyk analitycznych w toksykologii i ekotoksykologii jest element aktywny testu – czyli organizm w nim wykorzystywany. Wyróżnia się tu organizmy należące do królestw: roślin, bakterii oraz zwierząt [33]. Biotesty oparte na analizie zmian w obrębie organizmu roślinnego zwane fitotestami dostarczają informacji o organizmach kluczowych dla danego ekosystemu, dzięki czemu określać można jego stan oraz zaburzenia w przepływie materii czy obiegu substancji. Baran i in. [3] definiują fitotoksyczność jako składową zaburzeń w pobieraniu i transporcie nieodzownych mikro- i makroelementów, co skutkuje opóźnionym kiełkowaniem nasion i wschodem roślin oraz deformacjami i niedorozwojem określonych ich części [25]. Dzięki fitotestom uzyskuje się konkretną wiedzę o wpływie badanego czynnika występującego w środowisku. Fitotesty stosowane są m.in. do oceny gleby [49] i wody [12, 13, 17] zanieczyszczonej m.in. środkami ochrony roślin. Pomocne są również w biomonitoringu [19], czy fitoremediacji [23]. W badaniach tych wykorzystuje się wiele rodzajów roślin, poczynając od glonów, wśród których najczęściej stosuje się do oceny prób wód słodkich glony należące do gromady *Chlorophyta*: *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *S. subspicatus* [33, 34, 50, 58, 63], do oceny zaś wód słonych i słonawych z gromady *Bacillariophyta*: *Phaeodactylum tricornerutum*, *Skeletonema costatum* [33, 45, 50, 58, 63]. Bardzo szeroko w pracach laboratoryjnych nad substancjami oraz ich akumulacją wykorzystuje się rzęsę wodną [50], której gatunki *Lemna minor* oraz *L. gibba* są najczęstszymi organizmami wskaźnikowymi biotestu (*Lemna Test*). Mimo niespójności w ocenie fitotoksyczności wody, czy ścieków za pomocą tego organizmu [14], jest on często wykorzystywany ze względu na szybką odpowiedź biologiczną, łatwość hodowli zgodną z Rozporządzeniem Komisji WE nr 761/2009 [51], szybki przyrost oraz możliwość oceny toksycznej związków hydrofobowych – unoszących się na powierzchni lustra wody [6, 9, 42]. Fitobioindykatorami są również wyższe rośliny naczyniowe wśród których, wyróżnić można: *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* czy *Sinapis alba*. Mają one bardzo małe nasiona, a testy prowadzi się

przez 3 dni [20, 22]. Z powodzeniem do oceny gleby zanieczyszczonej sulfametazyną zastosowano nasiona roślin motylkowatych (*Lupinus luteus*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Medicago sativa*) większe średnio o 20 razy od zalecanych przez producenta testu Phytotoxkit™ (MicroBio Test Inc., Belgium) [1, 22]. Obok oceny kiełkowania traw, kapustowatych, motylkowatych oraz zbóż w ocenie środowiska glebowego, pod uwagę bierze się także rośliny makrofityczne. Jednak skomplikowana hodowla roślin makrofitycznych, a także długi czas wzrostu oraz wymagania związane z zajmowaną przez nie powierzchnią, eliminują je z powszechnego stosowania w biotestach [33].

Dobór organizmów roślinnych winien charakteryzować dany ekosystem. Gatunki roślin dobiera się biorąc pod uwagę ich dostępność, sposób hodowli, łatwość prowadzenia badań oraz biologiczną wrażliwość na związek bądź grupę związków, potwierdzoną wielokrotnymi powtórzeniami [14, 33]. W tego typu badaniach niezmieranie istotna jest możliwość oceny toksyczności w cyklu wielopokoleniowym. Dlatego większość stosowanych fitotestów ma charakter chroniczny, czyli trwają dłużej aniżeli 1/3 okresu przedprodukcyjnego [30]. Obecnie, na skutek długoletnich prac z zakresu ocen środowiskowych, badacze skłaniają się do wykorzystywania w eksperymentach gotowych kultur roślinnych – możliwych do zastosowania w laboratorium. Prowadzą oni własną hodowlę glonów, roślin naczyniowych, lub wykorzystują gotowe wyselekcjonowane kultury w formie kryptobiotycznej, bądź liofilizatu, dołączane do mikrobiotestów, np. Algaltoxkit F™, Phytotoxkit™ [22, 33, 48, 63].

Podobnie dobór organizmów wygląda w badaniach ekotoksykologicznych opartych na wykorzystaniu bakterii jako części aktywnej biotestu, gdzie obok własnych hodowli kolonii mikroorganizmów, najczęściej testy te opiera się na bakteriach w formie uspionej dołączonych do odpowiedniego biotestu [33]. Gotowe kolonie bakterii po raz pierwszy dołączono do biotestu (Microtox®-SPT) w roku 1979, co dało możliwość wykorzystania go w dowolnym czasie oraz umożliwiło względną porównywalność wyników badań z ośrodkami naukowymi stosującymi ten sam rodzaj analizy [48, 63]. Obecnie w testach bakteryjnych (Microtox®-SPT, LUMISStox, ToxAlert®100) najczęściej badaniom poddaje się bakterie z rodzaju *Vibrio fischeri*, posiadające zdolności luminescencyjne. Wpływ zanieczyszczenia środowiska wyznacza się obserwując ograniczenia w emisji światła bakterii, w porównaniu z parametrami świetlnymi bakterii nie poddanych żadnym narażeniom. Ograniczenia w wielkości emisji bakterii świecących, powodowane mogą być zachwianiami w metabolizmie komórki, przerwaniem błony komórkowej czy wskutek działalności substancji niepożądanego [17, 33]. Biotesty oparte na pomiarze bioluminescencji bakterii z rodzaju *Vibrio fischeri* pomocne są w bioanalizach wody, ścieków, osadów czy gleby oraz często są uzupełnieniem biotestów typu Toxkit [17, 52, 63]. Do oceny toksyczności chronicznej, np. leków weterynaryjnych, stosuje się innowacyjny system MARA® (Microbial Assay for Risk Assessment). Test ten jako bioindykatory wykorzystuje dziesięć organizmów prokariotycznych – bakterii o różnej taksonomii

oraz jeden organizm eukariotyczny – drożdże [43]. Wraz z rozwojem prac badawczych nad testami bakteryjnymi w obrocie komercyjnym pojawiły się takie testy, które nie tylko wykorzystują organizmy bakteryjne w celach opiniodawczych z zakresu toksyczności, czy genotoksyczności, test Ames’a, SOS-ChromoTest, z wykorzystaniem szczepów *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* [26, 27], lecz umożliwiają ich wykrycie, np. bakterii z rodzaju *Legionella*, odpowiedzialnych za zakaźną legionelozę [5].

Kolejną grupę biotestów, które klasyfikuje się ze względu na użyty materiał badawczy, stanowią testy zwierzęce, wskazujące zmiany morfologiczne, fizjologiczne czy genetyczne odleglejszych ogniw łańcucha troficznego. Uzyskane w wyniku ich przeprowadzenia odpowiedzi, mogą bezpośrednio obrazować stan zanieczyszczenia środowiska naturalnego, procesy biomagnifikacji czy biotransformacji. Testy, w których bioindykatorami są zwierzęta stanowią około 10% ogółu stosowanych biotestów [33]. Są narzędziem wykorzystywanym w badaniach wskazujących jakość podstawowych elementów środowiska oraz ich przekształceń antropogenicznych [10]. Dodatkowo organizmy wyższe są szczególnie przydatne w ocenach farmakologicznych i kosmetycznych, umożliwiając badanie substancji czynnych zawartych w poszczególnych preparatach, lekach czy kosmetykach [46, 47, 56]. W biotestach na zwierzętach analizie poddaje się gatunki charakteryzujące zarówno środowisko lądowe jak i wodne. Do badań wykorzystuje się organizmy zróżnicowanych ogniw troficznych, począwszy od pierwotniaków, przez mięczaki, po strunowce. Do najliczniej użytkowanych zwierząt w środowisku wodnym należą rozwielitki – *Daphnia* sp. [50]; mięczaki, skorupiaki: *Artemia salina*, *Ceriodaphnia dubia* oraz wiele gatunków ryb, a wśród nich *Lepomis macrochirus*, czy *Ictalurus punctatus*. Stan pozostałych środowisk określany jest na podstawie odpowiedzi organizmów takich jak: dżdżownice – *Eisenia foetida*, ślimaki – *Helix aspersa*, skoczkonogi – *Folsomia candida*, bezkręgowce, owady – *Apis mellifera*, ptaki oraz gryzonie [20, 33, 40, 50]. Ze względu na komercyjną dostępność gotowych biotestów badaniom na zwierzętach najszerzej poddaje się: skorupiaki będące elementem testów Daphtoxkit F<sup>TM</sup>, Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>, Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>; wrotki – Rototoxkit F<sup>TM</sup>, pierwotniaki – Prototoxkit F<sup>TM</sup> [4, 22, 29, 33, 34, 39, 48]. Tak wyposażone testy noszą nazwę mikrobiotestów. Są to zestawy wyposażone w niezbędne akcesoria do wyznaczenia poziomu toksyczności prób. W skład każdego mikrobiotestu wchodzi element aktywny biotestu, jakim jest żywy organizm, gotowy do uruchomienia w każdej chwili. Ocena toksykologiczna z wykorzystaniem takich testów pozwala na interkontynentalne konfrontacje wyników. Ponadto dzięki dołączonym kulturom organizmów nie występuje potrzeba prowadzenia własnych hodowli. Oznaczenia przeprowadzone przy użyciu wymienionych testów charakteryzuje niższy koszt badawczy, aniżeli ich form konwencjonalnych, skraca się też czas odpowiedzi, a badania można prowadzić dla prób o niewielkiej objętości. Dodatkowo badacz uzyskuje możliwość pracy na kilku próbach jednocześnie [31, 33, 48, 63], co umożliwia zaplanowanie eksperymentu w formie baterii biotestów.

Baterią biotestów określa się badanie toksykologiczne lub ekotoksykologiczne obejmujące więcej, aniżeli tylko jeden gatunek organizmu wskaźnikowego. Stosuje się je w celu rozszerzenia badania określonej substancji chemicznej na większą część ekosystemu, z uwzględnieniem bytujących tam organizmów występujących w poszczególnych ogniwach łańcucha troficznego, w ciągu: producent – konsument – reducent [31, 33, 35]. Dzięki zastosowaniu baterii biotestów (Charatox, Thamnotokit F<sup>TM</sup>, Microtox<sup>®</sup>-SPT) Manusadžianas i in. [39] badając ścieki bytowo-gospodarcze dowiedli, że wynik uzyskany z pojedynczego biotestu, może być nieadekwatny do faktycznego poziomu toksyczności próby. Autorzy wykorzystali dodatkowo inny organizm wskaźnikowy, obrazujący stan próby zupełnie inaczej, dzięki czemu uzyskali możliwość weryfikacji wcześniejszych odpowiedzi oraz pełniejszą charakterystykę oddziaływań.

Analizy ekotoksykologiczne wraz z uzyskanymi dzięki nim rezultatami, odznaczają się swoistym zróżnicowaniem. Często ich celem jest określenie samej letalności, bądź wielkości efektów inhibicyjnych, wobec różnych bioindykatorów po określonym czasie ekspozycji. Wyznacza się stężenia (Lethal Concentration – LC) bądź dawki śmiertelne (Lethal Dose – LD), często z uwzględnieniem najniższych, bądź granicznych poziomów narażenia (Lowest Observed Effect Concentration – LOEC, No Observable Effect Concentration – NOEC). Standardowo wobec wrotków i skorupiaków wodnych ustala się wartości EC (Effect Concentration), czyli wyrażoną procentowo w danej grupie badawczej inhibicję określonej czynności fizjologicznej, bądź biochemicznej. W testach wzrostowych zaś bierze się pod uwagę hamowanie rozwoju zarówno roślin, grzybów i biomasy glonów. Rozwój biotechnologii spowodował, że obok tych parametrów, duże znaczenie w badaniach toksykologicznych mają testy enzymatyczne określające inhibicje aktywności jednego lub grupy enzymów katalizujących określoną reakcję biochemiczną [8, 52] oraz testy genotoksyczności [24, 34, 43, 64], określające zmiany genetyczne wywołane wpływem toksykanta. Niekiedy toksykolodzy analizują parametry związane z pobieraniem i gromadzeniem określonych substancji w tkankach i narządach, w zależności od czasu narażenia, które noszą miano testów bioakumulacji [28, 61].

## Problematyka i kierunki rozwoju biotestów

Dynamiczny postęp różnych gałęzi nauki zajmujących się oceną środowiska przy użyciu organizmów wskaźnikowych, sprawił, że biotesty stały się kluczowym narzędziem oceny wpływu substancji na organizm bądź cały ekosystem. Biotesty bowiem bezpośrednio opierają się na odpowiedzi osobniczej bądź grupy organizmów charakterystycznych dla danego wycinka przyrody. Mimo ich skonkretyzowanej formy oraz wypracowanych standaryzowanych metod, praca nad biotestami udowodniła, że obarczone są wieloma błędami natury porównawczej, powtarzalności, czy subiektywizmu w ocenie toksyczności. Wielu autorów [32, 62, 37] analizując uzyskane

wyniki, zauważyło szereg rozbieżności w ocenie tego samego elementu środowiska, za pomocą różnych testów. Jako przykład takich odchyłeń wskazać można badania porównujące próby pochodzące z oligotroficznego stawu, z próbami wód zanieczyszczonych dla potrzeb analizy [32]. Użycie kilku testów: bioluminescencji wraz z analizami enzymatycznymi dowodzi ich rozbieżności w ocenie poziomu zanieczyszczenia, a tym samym wskazuje na zasadność zastosowania w badaniach kilku testów. Badania oceniające stan wód powierzchniowych zlokalizowanych wokół zakładu przemysłowego z wykorzystaniem ryb jako bioindykatora [62] dowodzą, iż osobniki pochodzące z różnych hodowli mogą wykazywać różną wrażliwość, co w konfrontacji z wynikami innych badaczy może być przyczyną błędnej oceny.

Testy toksykologiczne i ekotoksykologiczne często skupiają się jedynie na krótkim okresie narażenia, w którym pod uwagę nie są brane czynniki takie jak: cała długość życia organizmu, kumulacyjna natura substancji chemicznych, dynamika populacji, zmiany sezonowe, narastanie toksyczności w czasie, estywacja, a szacuje się jedynie tempo wzrostu, płodność, czy śmiertelność [36, 45]. Przeprowadzone badania z zastosowaniem metody analizy obrazu [37] zwracają uwagę na problem związany z naoczną obserwacją uzyskanych wyników, gdzie ocena toksyczności może mieć cechy subiektywnej oceny eksperymentatora. Natomiast Eberius i in. [14], w ocenie rzęsy wodnej jako szeroko stosowanego bioindykatora, zwracają uwagę na jej nie związane z wpływem toksykanta tempo wzrostu. Odnotowują większą stagnację organizmu w pierwszych dniach eksperymentu, popartą analizami, polegającymi na różnym czasie startowym hodowli. Aby zapobiec wszelkim niespójnościom związanym z badaniami laboratoryjnymi Komitet Toksykologii i Oceny Czynników Środowiskowych US National Research (NRC) opublikował raport na zlecenie Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska [55], w którym wątpliwościom poddaje testy przeprowadzane na zwierzętach w odniesieniu do populacji ludzkiej. Ekstrapolowane wyniki tych doświadczeń, nie zawsze można odnosić do organizmu człowieka, co więcej dane te nie są w stanie wykazać wpływu różnorodnych mieszanin chemikaliów czy działania synergistycznego. Komitet podejmuje działania w kierunku opracowania szeregu nieinwazyjnych komputerowych metod analiz oraz testów *in vitro* opartych na biologii człowieka – tak aby zapobiegać ocenom reakcji opartych na homogenicznych grupach zwierząt, w odniesieniu do heterogenicznych populacji ludzkich. Raport dowodzi, że wiele obecnie stosowanych metod testowania środowiska to metody czasochłonne, wymagające wysokich nakładów finansowych. Promuje metody obrazujące bezpośrednie efekty toksyczne w dawkach adekwatnych, na które narażony jest organizm ludzki, tak by można było analizować zaburzenia na poziomie komórkowym i molekularnym. Postuluje wykorzystanie komórek uzyskanych z tkanek oraz zmierza do zmiany paradygmatu przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach w stronę testów *in vitro*.

## Podsumowanie

Testy toksyczności i ekotoksyczności stają się dopełnieniem konwencjonalnych metod analizy prób środowiskowych, opartych na badaniach fizykochemicznych wód, gleby czy ścieków. Metody chemiczne zawężają swe wyniki jedynie do informacji ilościowych i jakościowych rozmaitych form zanieczyszczeń, bez możliwości oszacowania bezpośredniego wpływu na żywy organizm. Zasadność prowadzenia badań dotyczących oceny środowiska przyrodniczego z użyciem nowoczesnych metod ocen toksyczności, doprowadziła do szeregu uaktualnień prawnych z zakresu ochrony środowiska wielu krajów [15, 16, 51, 57]. Dzięki temu wiele stężeń polutantów, dotychczas uważanych za bezpieczne, uzyskało charakter obciążający, a odpowiednie przepisy nakazują ich eliminację bądź obniżenie w środowisku. Biotesty w porównaniu z konwencjonalnymi metodami umożliwiają relatywnie szybką i taną metodę analizy. Natomiast połączenie tych dwóch metod umożliwia całościową i szeroką charakterystykę toksykologiczną. W konsekwencji ochrona środowiska naturalnego, w tym populacji ludzkiej, staje się coraz bardziej efektywna, a działania zapobiegawcze podejmowane są znacznie szybciej.

## Literatura

- [1] Adomas B., Piotrowicz-Cieslak A. 2008. Yellow lupin is a good bioindicator of soil contamination with sulfamethazine. Lupin for Health and Wealth. Proc. of the 12 th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 14–18 September 2008: 362–367.
- [2] Anderson B., Hunt J., Phillips B., Nicely P., Tjeerdema R., Martin M. 2004. A comparison of in situ and laboratory toxicity tests with the estuarine amphipod *Eohaustorius estuaries*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(1): 52–60.
- [3] Baran A., Jasiewicz C., Klimek A. 2008. Reakcja roślin na toksyczną zawartość cynku i kadmu w glebie. *Proc. of ECOpole 2(2)*: 417–422.
- [4] Belgis C., Persoone G., Blaise C. 2003. Cyst-based toxicity tests XVI—sensitivity comparison of the solid phase *Heterocypris incongruens* microbiotest with the *Hyalella azteca* and *Chironomus riparius* contact assays on freshwater sediments from Peninsula Harbour (Ontario, Canada). *Chemosphere* 52 (1): 95–101.
- [5] Benson R., Tang P., Fields B. 2000. Evaluation of the Binax urinary and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J. Clin. Microbiol.* 38(7): 2763–2765.
- [6] Bielińska M., Nałęcz-Jawecki G. 2009. Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego lekami. I: Ocena toksyczności trzech fluorochinolonów dla rzęsy drobnej *Lemna minor*. *Biul. Wydz. Farm. WUM* 4: 24–30.
- [7] Blanck H., Porsbring T., Scholze M. 2003. (MOP/74) Predictability of the toxicity of metal(oid) mixtures to marine periphyton communities. The Society of Environ. Toxicol. and Chem. EUROPE 2003.
- [8] Bundatsev A. 2005. A biotest based on an acetylcholinesterase tissue preparation immobilized on paper. *J. Anal. Chem.* 60(12): 1155–1158.
- [9] Cleuvers M., Ratte T. 2002. Phytotoxicity of coloured substances: is *Lemna* Duckweed an alternative to the algal growth inhibition test? *Chemosphere* 49: 9–15.
- [10] De la Torre F., Salibián A., Ferrari L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 46: 1582–1590.
- [11] De Liguoro M., Fioretto B., Poltronieri C., Gallina G. 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimetoprim. *Chemosphere* 75: 1519–1524.
- [12] Dorglroh M. 2005. Metamitron acute toxicity (96 hours) to rainbow trout in static test. Study Report BAYER AG, DOM 94031 (E 280 0882-8): 4–13.



- [13] Drzewicz P., Nałęcz-Jawecki G., Gryz M., Sawicki J., Bojanowska-Czajka A., Głuszewski W., Kulisa K., Wolkowicz S., Trojanowicz M. 2004. Monitoring of toxicity Turing degradation of selected pesticides using ionizing radiation. *Chemosphere* 57: 135–145.
- [14] Eberius M., Mennicken G., Reuter I., Vandenhirtz J. 2002. Sensitivity of different growth inhibition test-just a question of mathematical calculation. Theory and practice for algae and duckweed. *Ecotoxicology* 11: 293–297.
- [15] European Commission, Council Directive of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community (76/464/EEC). *Offic. J. Eur. Commun.* L129 (1976) 23.
- [16] European Commission, Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Offic. J. Eur. Commun.* L331 (2001) 1.
- [17] Fernández-Alba A.R., Hernando M.D., Piedra L., Chisti Y. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta* 456: 303–312.
- [18] Hoffmann J., Hoffmann K., Borowiec M., Huculak M, Drwiega J. 2009. Badania nad możliwościami wykorzystania w nawozach mineralno-organicznych odpadów z zakładu związków fosforowych. *Proc. of ECOpole* 3(2): 461–464.
- [19] Holgado R., Rowe J., Andersson S., Magnusson C. 2004. Electrophoresis biotest studies on some population of cereal cyst nematode, *Heterodera* spp. (*Tylenchida: Heteroidae*). *Nematology* 6(6): 857–865.
- [20] [http://www.cyf-kr.edu.pl/~uxlaskow/index\\_pl.html](http://www.cyf-kr.edu.pl/~uxlaskow/index_pl.html), (Ryszard Laskowski, Kurs Ekotoksykologia (WBNZ-690)).
- [21] [http://www.kzgw.gov.pl/files/file/Materialy\\_i\\_Informacje/Dyrektwy\\_Unijne/Wodna/Ramowa%20Dyrektywa%20Wodna%20EN.pdf](http://www.kzgw.gov.pl/files/file/Materialy_i_Informacje/Dyrektwy_Unijne/Wodna/Ramowa%20Dyrektywa%20Wodna%20EN.pdf) (in English).
- [22] <http://www.tigret.pl/>
- [23] Ignatowicz K. 2009. Badania rozpoznawcze możliwości zastosowania fitoremediacji do ochrony terenów wokół mogilników pestycydowych. *Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska* 11 (73): 1007–1016.
- [24] Jha A. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3): 207–221.
- [25] Jin C., Chen Q., Sun R., Zhou Q., Liu J. 2009. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. *Ecotoxicology* 18(7): 878–885.
- [26] Jolibois B., Guerbet M. 2005. Efficacy of two wastewater treatment plants in removing genotoxins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 289–295.
- [27] Jolibois B., Guerbet M. 2005. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutat. Res.* 565: 151–162.
- [28] Kahle J., Zauke G. 2002. Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquat. Toxicol.* 59(1–2): 115–135.
- [29] Kahru A., Dubourgier H-C., Blinowa I., Ivask A., Kasemets K. 2008. Biotests and Biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles. *Sensors* 8: 5153–5170.
- [30] Kaza M. 2006. Ocena toksyczności leków przy użyciu testów roślinnych. *Bioskop* 3: 20–22.
- [31] Kaza M., Mankiewicz-Boczek J., Izydorezyk K., Sawicki J. 2007. Toxicity assessment of water samples from rivers in central poland using a battery of microbiotests – a pilot study. *Polish J. of Environ. Stud.* 16(1): 81–89.
- [32] Kratasyuk V., Esimbekova E., Gladyshev M., Khromichek E., Kuznetsov A., Ivanova E. 2001. The use bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems. *Chemosphere* 42: 909–915.
- [33] Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J. 2003. Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. 2003. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. (red.) Wyd. CEEAM, Gdańsk: 667–698.
- [34] Küster E., Dorusch F., Meißner B., Weiss H., Schüürmann G., Altenburger R. 2003. Toxizitätsreduktion durch (Grundwasser-) Sanierung? Erfolgskontrolle von In-situ-Grundwasser-Sanierungsverfahren mithilfe von kontinuierlichen und diskontinuierlichen Biotest. *Grundwasser- Zeitschrift der Fachsektion Hydrogeologie* 1: 32–40.
- [35] Kursa-Mikołajczak M., Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J. 2005. Biotest – nowe narzędzie do kompleksowej oceny stanu środowiska. *Analityka* 2: 13–15.
- [36] Laskowski R. 1998. Why short-term bioassays are not meaningful- effects of persistent (Cd) vs. biodegradable (imidacloprid) chemicals on pea aphid (*Acyrtosiphon pisum* HARRIS). International Conference on Ecotoxicology and Environmental Saefity, SECOTOX'98, Antalya, Turkey, 19–21 Oct. 1998.
- [37] Lewicki P., Mazur R. 2008. Zastosowanie metod analizy obrazu w testach toksyczności ostrej na *Lymnea stagnalis* L. Krakowska Konferencja Młodych Uczonych 2008.

- [38] Mantis I., Voutsas D., Samara C. 2005. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62: 397–407.
- [39] Manusadžianas L., Balkelytė L., Sadauskas K., Blinova I., Pöllumaa L., Kahru A., 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63: 27–41.
- [40] Mazur R. 2008. Monitoring wybranych zanieczyszczeń wód przy zastosowaniu nowych kryteriów ekotoksykologicznych, Praca Doktorska AGH Kraków.
- [41] McWilliam R., Baird D. 2002. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6): 1198–1205.
- [42] Mkandawire M., Taubert B., Dudel G. 2006. Limitations of growth-parameters in *Lemma gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 118–128.
- [43] Nałęcz-Jawecki G., Piekarek A., Sawicki J. 2008. Zastosowanie testu bakteryjnego MARA do oceny ekotoksyczności leków. *Ekotoksykologia w ochronie środowiska* B. Kołwzan i K. Grabas (red.). Wyd. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Dolnośląski: 237–242.
- [44] Namieśnik J. 2003. Trendy w analityce i monitoringu środowiskowym. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. 2003. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. (red.). Wyd. CEEAM, Gdańsk: 1–32.
- [45] Nendza M. 2002. Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere* 48: 865–883.
- [46] Nigam P. 2009. Adverse reactions to cosmetics and methods of testing. *Ind. J. Derm., Vener. Lepr.* 75(1): 10–19.
- [47] Park S., Choi K. 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on an aquatic ecosystems. *Ecotoxicology* 17: 526–538.
- [48] Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadžianas L., Nałęcz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B. 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ. Toxicol.* 18(6): 395–402.
- [49] Piotrowicz-Cieślak A., Adomas B., Michalczyk D. 2010. Different glyphosate phytotoxicity to seeds and seedlings of selected plant species. *Polish J. of Environ. Stud.* 19(1): 123–129.
- [50] Polski Komitet Normalizacyjny. [On-line]. <http://www.pkn.pl>.
- [51] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 761/2009 z dnia 23 lipca 2009 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) Tekst mający znaczenie dla EOG. 2009. Dziennik Urzędowy L 200, 24/08/2009 P. 0001-0094. Załącznik VI.
- [52] Simeonov V., Wolska L., Kuczynska A., Gurwin J., Tsakovski S., Namiesnik J. 2007. Chemo-metric estimation of natural water samples using toxicity tests and physicochemical parameters. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 37(2): 81–90.
- [53] Sosak-Świdarska B. 2002. Mikrobiotesty w badaniach wody. *Bioskop* 2: 9–10.
- [54] Sundt R.C., Meier S., Jonsson G., Sanni S., Beyer J. 2009. Development of a laboratory exposure system using marine fish to carry out realistic effect studies with produced water discharged from offshore production. *Mari. Pollut. Bull.* 58(9): 1382–1388.
- [55] Toxicity Testing in the 21st century: A vision and a strategy. 2007. National Academies Press.
- [56] Tremblay L., Wratten S. 2002. Effects of ivermectin in dairy discharges on terrestrial and aquatic invertebrates. *DOC Science Internal Series* 67: 13.
- [57] Ustawa z dnia 11 stycznia 2001 r. o substancjach i preparatach chemicznych (Dz.U. Nr 11, poz. 84, z późn. zm.)
- [58] Wadhia K., Clive Thompson K. 2007. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using micro-biotest for potential implementation of the Water Framework Directive. *Trends Anal. Chem.* 26(4): 300–307.
- [59] Walker C.H., Hopkin S.P., Silby R.M., Pekali D.B. 2002. Podstawy ekotoksykologii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa: 117–149.
- [60] Wang C., Wang Y., Kiefer F., Yediler A., Wang Z., Kettrup A. 2003. Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56(2): 211–217.
- [61] Wojewódka D., Fit M. 2005. Ekotoksykologia – bezpieczeństwo dla środowiska. *Ekologia* 1–2005.

- [62] Wolska L., Mińkowski M., Kuczyńska A., Namieśnik J. 2003. Wykorzystanie testu toxalert do oceny stanu wód powierzchniowych wokół zakładu przemysłowego. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 10(6): 575–586.
- [63] Wolska L., Sagajdakow A., Kuczyńska A., Namieśnik J. 2007. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. *Trends Anal. Chem.* 26(4): 332–344.
- [64] Yamamoto Y., Rajbhandari N., Xiaohong L., Bergmann B., Nishimura Y., Stomp A-M. 2001. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37(3): 349–353.

## **Biotests in toxicological and ecotoxicological research**

**Key words:** biotest, bioindicator, environment

### **Summary**

The dynamic progress of science in the field of environment protection caused biotests to become a crucial bioanalytical tool. The review presents current knowledge on methods of ecotoxicological analyses based on exploiting them. It is an attempt to comprehensive portray their diversified classification and advancement tendencies. The article discusses possibilities of using biotests to evaluate the degree of environment pollution, as well as lists impediments and diagnostic inconsistencies. Modern analysis methods are compared to the conventional ones, and selected legal aspects are discussed.



## Spis treści

Profesor Jerzy Ważny (1927–2010) — <b>A. Grzywacz</b> . . . . .	3
<b>J. Siuta</b> — Optymalizacja użytkowania powierzchni ziemi łągodzi procesy degradacji środowiska . . . . .	9
<b>K. Rybka, G. Żurek</b> — Oszczędne gospodarowanie wodą kryterium koniecznym w hodowli roślin? . . . . .	19
<b>E. Matyjaszczyk, J. Sobczak</b> — Substancje aktywne stosowane w ochronie upraw ekologicznych i konwencjonalnych w świetle aktualnych przepisów	33
<b>J. Szumigaj-Tarnowska, C. Ślusarski</b> — Grzyb <i>Cladobotryum dendroides</i> i jego wpływ na uprawę pieczarki . . . . .	43
<b>E.U. Kozik, I. Ostrzyżek, W. Szczechura</b> — <i>Alternaria solani</i> – patogen pomidora i perspektywy hodowli odmian odpornych. . . . .	55
<b>E. Cieślik, A. Siembida</b> — Fruktany i ich występowanie w roślinach uprawnych . . . . .	67
<b>Z. Luberda-Bieńkowska, A. Majewska</b> — Wpływ selenu i niskocząstecz- kowych antyoksydantów na jakość nasienia zwierząt gospodarskich . . . .	81
<b>M. Ciechanowska, M. Łapot, T. Malewski, K. Mateusiak, T. Misztal, F. Przekop</b> — Ekspresja genu GnRH i genu receptora GnRH (GnRHR) w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych . . . . .	91
<b>T. Zimny, S. Sowa</b> — Prawna ochrona odmian roślin w Unii Europejskiej i USA – system <i>sui generis</i> . . . . .	105
<b>Ł. Sikorski, B. Adomas</b> — Biotesty w badaniach toksykologicznych i ekotoksykologicznych. . . . .	121

## Contents

Professor Jerzy Ważny (1927–2010) — <b>A. Grzywacz</b> . . . . .	3
<b>J. Siuta</b> — Land use optimization to mitigate processes of environmental degradation . . . . .	9
<b>K. Rybka, G. Żurek</b> — Effective use of water as an obligatory criterion in plant breeding? . . . . .	19
<b>E. Matyjaszczyk, J. Sobczak</b> — Active substances applied in protection of organic and conventional crops in the light of current regulations . . . . .	33
<b>J. Szumigaj-Tarnowska, C. Ślusarski</b> — Cladobotryum dendroides and its effect on cultivation of <i>Agaricus bisporus</i> mushrooms . . . . .	43
<b>E.U. Kozik, I. Ostrzyżek, W. Szczechura</b> — <i>Alternaria solani</i> – tomato pathogen and perspectives of breeding resistant cultivars . . . . .	55
<b>E. Cieślik, A. Siembida</b> — Fructans and their occurrence in cultivated plants . . . . .	67
<b>Z. Luberda-Bieńkowska, A. Majewska</b> — Effect of selenium and low-molecular weight antioxidants on the semen quality of farm animals . . . . .	81
<b>M. Ciechanowska, M. Łapot, T. Malewski, K. Mateusiak, T. Miształ, F. Przekop</b> — Expression of the GnRH and GnRH receptor (GnRHR) genes in hypothalamus-pituitary system of ewes during different physiological states . . . . .	91
<b>T. Zimny, S. Sowa</b> — Legal protection of plant varieties in the European Union and the USA – <i>sui generis</i> system . . . . .	105
<b>Ł. Sikorski, B. Adomas</b> — Biotests in toxicological and ecotoxicological research . . . . .	121