

- [34] Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press, London. UK.
- [35] Marschner P., Baumann K. 2003. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonization in split-root maize. *Plant and Soil* 251(2): 279–289.
- [36] Mayo K., Davis R., Motta J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78(3): 426–431.
- [37] Mercik S., Sas L. 1998. Ujemny wpływ nadmiernego zakwaszenia gleby na rośliny. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 456:29–39.
- [38] Minerdi D., Bianciotto V., Bonfante P. 2002. Endosymbiotic bacteria in mycorrhizal fungi: from their morphology to genome sequences. *Plant and Soil* 244(1/2): 211–219.
- [39] Mosse B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27: 509–520.
- [40] Nautiyal C.S. 1997. Selection of Chickpea-Rhizosphere-Competent *Pseudomonas fluorescent* NBRI1303 antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Rhizoctonia bataticola* and *Pythium* sp. *Current Microbiology* 35: 52–58.
- [41] Patkowska E. 2002. The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the infection of underground parts of spring wheat. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities: Horticulture* 5(2): <http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/horticulture/art-04.pdf>
- [42] Paulitz T.C., Linderman R.G. 1989. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 113(1): 37–45.
- [43] Pierson L.S., Pierson E.A., Morello J.E. 2002. Positive and negative cross-communication among *Rhizobacteria*. W: Leong S.A., Allen C., Triplett E.W. (red.), *Biology of Plant-microbe Interactions*. International Society for Molecular Plant-microbe Interactions, St Paul, MN, USA: 256–262.
- [44] Pięta D., Patkowska E. 2003. The role of antagonistic fungi and bacteria limiting the occurrence of some phytopathogenic inhabiting the soybean soil environment. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities: Horticulture* 6(2): <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue2/horticulture/art-04.pdf>
- [45] Rengel Z. 1999. Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications. Food Products Press. Binghamton, New York, USA.
- [46] Rodriguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Advances* 17(4–5): 319–339.
- [47] Sas L., Marschner H., Römheld V. 1995. Effect of different nitrogen fertilizers on chemical changes in the rhizosphere and growth of strawberry plants. *Materiały Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej – Nauka Praktyce Ogrodniczej*, Lublin 1995: 201–206.
- [48] Sas L., Mercik S., Borkowska B., Michalczyk L. 1995. Zakwaszenie gleb w sadach – rozważania przyczyn, skutków oraz możliwości przeciwdziałania. *Zesz. Nauk. Inst. Sadow. Kwiac.* 2: 34–42.
- [49] Sas L., Mercik S., Smolarz K. 1996. Procesy chemiczne zachodzące w ryzosferze i metody ich badania. *Post. Nauk. Rol.* 5: 79–89.
- [50] Sas L., Mercik S., Matysiak B. 1999. Rola ryzosfery w mineralnym odżywianiu się roślin. *Post. Nauk. Rol.* 6: 27–36.
- [51] Sas L., Tang C., Rengel Z. 2001. Suitability of hydroxyapatite and iron phosphate as P sources for *Lupinus albus* L. grown in nutrient solutions. *Plant & Soil* 235: 159–166.
- [52] Sas L., Marschner H., Römheld V., Mercik S. 2002. The influence of aluminium on rhizosphere and bulk soil pH and growth of strawberry plants. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 482: 467–474.
- [53] Sas L., Rengel Z., Tang C. 2002. The effect of nitrogen nutrition on cluster root formation and proton extrusion by *Lupinus albus*. *Ann. Bot.* 89: 435–442.
- [54] Sas L., Marschner H., Römheld V., Mercik S. 2002. The influence of aluminium on rhizosphere and bulk soil pH and growth of strawberry plants. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 482: 467–474.
- [55] Sas L., Mercik S. 2002. Wpływ pH, form azotu oraz rozpuszczalnych form glinu na skład chemiczny gleb oraz korzeni i liści podkładek jabłoni M9. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 482: 475–483.
- [56] Sas-Paszt L., Żurawicz E. 2005. Studies of the rhizosphere of strawberry plants at the Research Institute of Pomology and Floriculture in Skierniewice, Poland. *International Journal of Fruit Science* 5(1): 115–126.
- [57] Sen R. 2003. The root-microbe-soil interface: new tool for sustainable plant production. *New Phytol.* 157(3): 391–398.
- [58] Silva Gonzaga M.I., Santos J.A.G., Ma L.Q. 2006. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. *Environmental Pollution* 143: 254–260.

- [59] Sitarek M., Sas-Paszt L. 2005. Studies of the root system in sweet cherry trees grafted on rootstocks – preliminary results. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 25–37.
- [60] Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Weimken A., Sanders J.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396(6706): 69–72.
- [61] Van Elsas J.D., Turner S., Bailey M.J. 2003. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytol.* 157(3): 525–537.
- [62] Vosatka M., Gryndler M. 1999. Treatment with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhizae and response of potato and maize plants to inoculation. *App. Soil Ecol.* 11(2–3): 245–251.
- [63] Wachowska U. 2004. Środki ochrony roślin jako antropopresja na zbiorowiska grzybów ryzosfery pszenicy ozimej. *Annales UMCS, Sec. E*, 59(4): 1837–1846.
- [64] Weller D.M. 1988. Biological control of soil-born plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. W: Waisel Y., Eschel A., Kafkafi U. (red.), *Plant Roots: The Hidden Half*. Dekker, New York: 769–781.
- [65] Wells C.E., Eissenstat D.M. 2001. Marked differences in survivorship among apple roots of different diameters. *Ecology* 82(3): 882–892.
- [66] Wells C.E., Glenn D. M., Eissenstat D.M. 2002. Changes in the risk of fine-root mortality with age: a case study in peach, *Prunus persica* (Rosaceae). *Am. J. of Bot.* 89(1): 79–87.
- [67] Wenzel W. W., Wieshammer G., Fitz W., Puschenreiter M. 2001. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant Soil* 237: 37–45.
- [68] Wenzel W.W., Brandstetter A., Wutte H., Lombi E., Prohaska T., Stingeder G., Adriano D.C. 2002. Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165: 221–228.
- [69] Xavier I.J., Boyetchko S.M. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi as biostimulants and bioprotectants of crops. W: Khachatourians G.G., Arora D.K. (red.), *App. Mycol. and Biotechnol. Vol. 2: Agriculture and Food Production*. Elsevier, Amsterdam: 311–330.
- [70] Zeng G., Birchfield S.T., Wells C.E. 2006. Detecting and measuring fine roots in minirhizotron images using matched filtering and local entropy thresholding. *Machine Vision and Applications* 17: 265–278.

Modern methods in rhizosphere studies of fruit-bearing plants

Keywords: pro-ecological nutrient management strategies, rhizosphere, fruit-bearing plants, root growth and development

Summary

Studies of the rhizosphere of fruit-bearing plants are very useful in determining the effects of natural components of soil biosphere on the development and growth of roots, the processes taking place in root zone, plant nutritional status, size and quality of the fruit yield.

Studies bio-chemical processes taking place in the rhizosphere are very valuable for on fruit-growing theory and practice. An understanding of the plants ability to acquire and store the nutrients from soil, and of the factors which are likely to modify these processes, can contribute to the development of environmentally friendly methods of fertilization of economically important fruit plants cultivars, as well as to improvements in fruit quality. Determination of root growth parameters that directly

affect the uptake of minerals by plants can make it possible to predict acquisition of these nutrients under specific conditions. Rational fertilization of fruit-bearing plants means fertilization according to the needs of such plants, their nutritional status and soil fertility. Therefore, there is a great need for expanding this area of science.

Results of rhizosphere studies will contribute to improvements in the methods of fertilization and cultivation of fruit-bearing plants. Introduction of fertilization and cultivation methods into fruit production that favour the protection of the environment and lead to reduction in pesticide residues in fruits conforms to the expectations of modern societies and consumers. Application of eco-friendly fertilization methods in fruit-growing practice will increase the development and competitiveness of fruit-producing farms in Poland and other European countries.

Występowanie, biosynteza i akumulacja antocyjanów w roślinach*

Anna Grzesiuk¹, Henryk Dębski¹, Marcin Horbowicz¹, Marian Saniewski²

¹ *Katedra Fizjologii Roślin i Genetyki, Akademia Podlaska w Siedlcach
ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce
e-mail: grzesiuk@ap.siedlce.pl*

² *Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach
ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice*

Słowa kluczowe: antocyjany, występowanie, biosynteza, transport,
akumulacja

Wstęp

Kolory są jednym z najważniejszych atrybutów w świecie roślin. Zieleń jest nieodłączną cechą organizmów roślinnych ze względu na fotosyntetyczną funkcję chlorofilu. Obecność chlorofilu przysłania zwykle inne składniki wybarwienia tkanek roślinnych, takie jak karotenoidy i antocyjany. Antocyjany wspólnie z innymi flawonoidami i karotenoidami są odpowiedzialne za bogactwo odcieni barw kwiatów. Nazwa antocyjany pochodzi od greckich słów: anthos – co znaczy kwiat, i kyanos – niebieski, i powstała dla określenia zabarwienia płatków kwiatu chabra bławatka (*Centaurea cyanus* L.). W 1835 roku niemiecki botanik Ludwig Marquart łącząc oba wyrazy użył tego określenia do nazwania głównych składników barwy kwiatów.

Antocyjany są barwnikami powszechnie występującymi w roślinach. Nie tylko stanowią podstawowy składnik barwy kwiatów, biorą udział w wybarwieniu jesiennych liści, ale pojawiają się też w tkankach roślin będących w cieniu lub narażonych na suszę czy niedobór składników mineralnych. Pierwsze hipotezy dotyczące obecności antocyjanów w roślinach, datowane na początek XIX wieku, wskazywały, że powstawanie tych barwników jest efektem jesiennego rozkładu chlorofilu. Za najważniejszą przyczynę nagromadzenia antocyjanów przez rośliny uważano ich rolę w wabieniu owadów

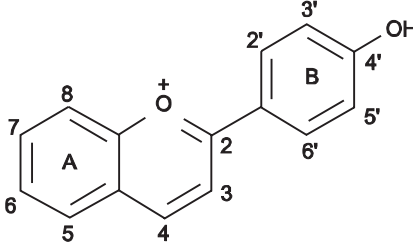
* Praca naukowa częściowo finansowana ze środków na naukę w latach 2006–2009 jako projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N310 040 31.

zapyłających kwiaty oraz podobny udział w rozprzestrzenianiu nasion przez ptaki. Poznanie w latach 1912–1916 przez niemieckiego chemika Richarda Willstättera struktur antocyjanów rozpoczęło szersze badania nad ich znaczeniem dla świata roślin. Ważny był także udział barwników antocyjanowych w zapoczątkowaniu w połowie XIX wieku nowej dziedziny biologii – genetyki. Epokowe badania Grzegorza Mendla dotyczyły, między innymi, dziedziczenia barwy kwiatów u grochu.

Występowanie i rola antocyjanów w roślinach

Antocyjany występują w wielu organach i tkankach roślinnych, takich jak owoce, płatki kwiatów, liście, łodygi, a nawet nasiona. Cząsteczka antocyjanu składa się zwykle z części aglikonowej (zwanej antocyjanidyną), od jednego do kilku podstawników cukrowych oraz jednej lub kilku grup acylowych. W świecie roślin odkryto dotychczas 22 różne struktury antocyjanidynowe, spośród których jedynie sześć występuje powszechnie (tab. 1). Różnią się one liczbą i położeniem grup hydroksylowych i metoksylowych w pierścieniu B. Owe sześć antocyjanidyn – pelargonidyna, cyjanidyna, peonidyna, delfinidyna, petunidyna i malwidyna – to podstawowe fragmenty molekularne przeszło 500 dotychczas odkrytych i opisanych w literaturze naukowej antocyjanów [3]. Antocyjany rzadko występują w naturze w postaci glikozydów antocyjanidyn. Spośród podstawników cukrowych występujących w antocyjanach najbardziej rozpowszechniona jest glukoza, a następnie galaktoza, ramnoza, arabinoza i ksyloza. Wymienione reszty cukrowe zwykle przyłączają się do grupy hydroksylowej przy węglu w pozycji 3. Spośród barwników antocyjanowych najpowszechniej w świecie roślin występuje cyjanidyna i jej glikozydy.

Tabela 1. Struktury głównych antocyjanidyn roślinnych



Rodzaj antocyjanidyny (skrót)	Miejsce podstawnika				
	3	5	7	3'	5'
Pelargonidyna (Pg)	OH	OH	OH	H	H
Cyjanidyna (Cy)	OH	OH	OH	OH	H
Peonidyna (Pn)	OH	OH	OH	OCH ₃	H
Delfinidyna (Dp)	OH	OH	OH	OH	OH
Petunidyna (Pt)	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
Malwidyna (Mv)OH	OH	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃

Występowanie antocyjanów w poszczególnych tkankach roślinnych jest efektem ekspresji specyficznych genów regulatorowych, które z kolei sterują genami strukturalnymi. Synteza antocyjanów jest autonomiczną funkcją poszczególnych komórek [35]. To powoduje lokalne nagromadzenie się tych barwników, na ogół związane z obecnością światła. Antocyjany przede wszystkim akumulują się w komórkach fotosyntetycznych tkanek wystawionych na ekspozycję światła (epiderma, miękisz palisadowy, miękisz mezofilowy) [5]. Charakterystycznym, często obserwowanym zjawiskiem jest biosynteza barwników antocyjanowych w młodych siewkach i liściach, w których jest niewielka zawartość chlorofilu. Niedostatecznie wykształcony w tych tkankach układ fotosyntetyczny powoduje, że są one w stanie zaabsorbować jedynie niewielką część padającego światła. Wzmoczona wówczas biosynteza i nagromadzenie antocyjanów wskazują na ich rolę w systemie ochronnym młodych tkanek przed warunkami środowiskowymi. Antocyjany absorbują światło w zakresie długości fali od 400 do 600 nm, dlatego też uważane są za rodzaj pewnego filtra przeciwsłonecznego, ochraniającego nie w pełni wykształcony aparat fotosyntetyczny. Jednak dotychczas nie dowiedziono ostatecznie czy hipoteza o filtrze przeciwsłonecznym z udziałem antocyjanów jest prawdziwa. Wśród innych funkcji tłumaczących obecność antocyjanów w liściach wymienia się ich udział w systemie obronnym przed szkodnikami [7], ochronie przed fotoinhibicją [13, 34] oraz w unieczynnianiu reaktywnych form tlenu [53].

Niektóre gatunki roślin, jak np. gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum* MOENCH.), nagromadzają szczególnie duże ilości antocyjanów w łodygach [48]. Nieobecność w tych tkankach chlorofilu prowadzi do konkluzji, że antocyjany spełniają tam inną rolę niż ochrona systemu fotosyntetycznego. I tak w przypadku *Kalanchoe blossfeldiana* – gatunku z rodziny gruboszowatych, nagromadzenie antocyjanów w łodydze jest silnie stymulowane przez jasmonian metylu, co sugeruje potencjalny udział tych barwników w systemie obronnym roślin przed atakiem patogena [42]. Roślinami podobnie reagującymi na traktowanie jasmonianem metylu są między innymi tulipany [43, 44] i *Crassula multicava* [41].

Antocyjany są szczególnie związane z barwą kwiatów. Stężenie ich w tkankach płatków kwiatów wynosi od 0,001 do 0,01 mola. Uważa się, że ich podstawową rolę w kwiatkach jest przywabianie zapylających je owadów. Okazało się, że niektóre barwniki antocyjanowe są atrakcyjne dla pszczoł, a inne dla trzmieli. Pszczoły preferują barwniki żółte, niebieskie i fioletowe, trzmiele zaś pomarańczowe oraz różne odcienie czerwieni. Gdy sztucznie zmieni się barwę kwiatów mogą one nie zostać zapylone [31].

Barwa kwiatów zależy od składników zawartych w komórkach, którymi są przede wszystkim antocyjany i inne flawonoidy oraz karotenoidy. Na odcień barwy mają wpływ również takie czynniki, jak obecność kationów metali mogących tworzyć kompleksy z antocyjanami oraz pH roztworu wakuoli, gdzie one występują. Dzięki temu barwniki te dają szeroką gamę kolorów. Na przykład glikozydy cyjanidyny nadają różny kolor czerwony, a zawierający je również chaber bławatek ma barwę

niebieską. Natomiast w zakresie pH od 4 do 6 antocyjany przyjmują postać bezbarwnych chalkonów, stąd też biała barwa kwiatów nie musi świadczyć o ich braku. Potraktowanie chalkonów kwaśnymi roztworami powoduje ujawnienie ich obecności w wyniku wytworzenia barwnych jonów flawyliowych. W Tabeli 2 zestawiono występowanie barwników antocyjanowych w kwiatach niektórych gatunków roślin [3].

Tabela 2. Występowanie antocyjanidyn w barwnikach antocyjanowych kwiatów wybranych gatunków [3]

Nazwa botaniczna	Główne antocyjanidyny
<i>Alstroemeria</i> spp.	cyjanidyna, delfinidyna
<i>Bellis perrenis</i>	cyjanidyna
<i>Campanula</i> spp.	delfinidyna, pelargonidyna
<i>Crocus</i> spp.	malwidyna, delfinidyna, petunidyna
<i>Dianthus caryophyllus</i>	cyjanidyna, pelargonidyna
<i>Hibiscus</i> spp.	cyjanidyna, delfinidyna, malwidyna, petunidyna
<i>Hyacinthus orientalis</i>	cyjanidyna, pelargonidyna, delfinidyna, petunidyna
<i>Iris ensata</i>	delfinidyna, malwidyna, petunidyna, peonidyna, cyjanidyna
<i>Malva sylvestris</i>	malwidyna, cyjanidyna, delfinidyna
<i>Nymphaea</i> spp.	peonidyna, cyjanidyna, pelargonidyna
<i>Peonia</i> spp.	malwidyna, petunidyna, peonidyna, cyjanidyna
<i>Petunia</i> spp.	pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna, malwidyna, petunidyna,
<i>Pelargonium</i> spp.	peonidyna
<i>Rosa</i> spp.	cyjanidyna, pelargonidyna, peonidyna
<i>Tulipa</i> spp.	pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna
<i>Verbena</i> spp.	pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna

Za pomocą metod inżynierii genetycznej próbuje się wpływać na kierunki biosyntezy antocyjanów tak, aby uzyskać nowe, ciekawe kompozycje barw kwiatów [14]. Przykładem jest otrzymanie niebiesko zabarwionych róż. Za niebieską barwę kwiatów odpowiada delfinidyna i jej glikozydy, które w różach nie są syntetyzowane ze względu na brak enzymu – hydroksylazy flawonoidowej F3'5'H. Od połowy XIX wieku hodowcy kwiatów usiłowali uzyskać niebieską barwę kwiatów róż, ale klasyczne metody hodowlane nie dawały rezultatu. Dopiero wprowadzenie do genomu róż genu wspomnianej hydroksylazy wraz z jednoczesnym wyciszeniem innego genu, odpowiedzialnego za syntezę reduktazy dihydroflawonolowej (DFR), która tworzy białe tło do barwy, a także uzupełnienie o gen DFR innego typu – pochodzący z irysa, spowodowało wytworzenie niebiesko zabarwionych kwiatów. Firma, która wyprodukowała takie róże poinformowała o tym osiągnięciu w 2005 roku [14]. W podobny sposób nieco wcześniej wytworzono fioletowo zabarwione goździki [11].

Innym organem roślinnym, w którym występują w dużych stężeniach barwniki antocyjanowe, jest owoc. Barwa owoców zależy od kompozycji antocyjanów, ich zawartości i pH tkanek. Przypuszcza się, że rolą fizjologiczną antocyjanów w owocach jest przywabianie ptaków, które spożywając je sprzyjają rozprzestrzenianiu

Tabela 3. Występowanie antocyjanidyn w barwnikach antocyjanowych wybranych gatunków owoców i warzyw [50]

Nazwa botaniczna	Owoce i warzywa	Główne antocyjanidyny
<i>Malus</i>	jabłka	cyjanidyna
<i>Musa</i>	banany	delfinidyna
<i>Vaccinium</i> spp.	czarne jagody, borówka, żurawiny	cyjanidyna, malwidyna, delfinidyna, petunidyna, peonidyna
<i>Ribes nigrum</i>	porzeczka czarna	cyjanidyna, delfinidyna
<i>Aronia melanocarpa</i>	aronia	cyjanidyna
<i>Sambucus nigra</i>	bez czarny	cyjanidyna
<i>Vitis vinifera</i>	winogrona czerwone	cyjanidyna, malwidyna, delfinidyna, pelargonidyna, peonidyna, petunidyna
<i>Prunus</i> spp.	śliwki	cyjanidyna
<i>Rubus</i> spp.	maliny	cyjanidyna
<i>Prunus cerasus</i>	wiśnie	cyjanidyna
<i>Prunus avium</i>	czereśnie	cyjanidyna
<i>Brassica campestris</i>	kapusta czerwona	cyjanidyna
<i>Solanum melongana</i>	oberżyna	delfinidyna
<i>Allium cepa</i>	cebula czerwona	cyjanidyna, delfinidyna, peonidyna
<i>Raphanus sativus</i>	rzodkiewka	pelargonidyna

zawartych w nich nasion. Obserwowano np., że ptaki chętniej spożywają czerwone porzeczki niż owoce odmian o lekko żółtym zabarwieniu. Spośród gatunków roślin, których owoce zawierają szczególnie duże ilości antocyjanów, należy wymienić czarne jagody leśne, bez czarny i aronię (tab. 3) [49]. Z owoców bogatych w antocyjany można wyodrębnić te związki na skalę przemysłową. Tak otrzymane ekstrakty mają zastosowanie jako dodatki do barwienia produktów żywnościowych takich jak słodczyce, napoje, jogurty, lody. Barwniki antocyjanowe występują również w warzywach, ale w znacznie mniejszych stężeniach (tab. 3). Spośród warzyw jedynie czerwona kapusta zawiera duże ilości antocyjanów, wśród których dominują pod względem ilościowym pochodne cyjanidyny.

Biosynteza antocyjanów

Antocyjany są końcowym produktem szlaku biosyntetycznego flawonoidów. Zarówno antocyjany, jak i flawonole są w roślinach nagromadzane w wakuoli, co doprowadziło do wysunięcia sugestii, że w biosyntezie obu typów flawonoidów może być wykorzystywany wspólny kompleks polienzymatyczny [47]. Poparciem tej hipotezy jest potwierdzony fakt występowania głównych enzymów syntezy flawonoidów w cytoplazmie [20]. Innym faktem potwierdzającym istnienie takiego kompleksu enzymatycznego jest odkrycie bezpośrednich związków między enzymami: syntazą chalkonową (CHS), izomerazą chalkonową (CHI), 3-hydroksylazą flawonoidową (F3H) i reduktazą dihydroflawonolową (DFR) w tkankach *Arabidopsis thaliana* [4].

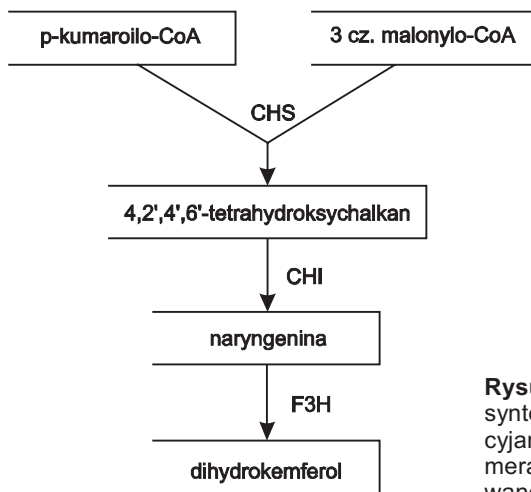
Wspólną lokalizację oraz bezpośrednio fizyczne interakcje stwierdzono także między innymi ważnymi enzymami szlaku flawonoidów – amoniakolizazą fenyloalaniny (PAL) i 4-hydroksylazą kwasu *trans*-cynamonowego (C4H) – u tytoniu [1]. Wyniki te potwierdzają możliwość istnienia i funkcjonowania wieloenzymatycznego kompleksu, w obrębie którego istnieje bezpośredni przepływ produktów pośrednich pomiędzy kolejnymi katalizatorami przemian [51]. Wydaje się, że taki system organizacji enzymatycznej, zwany też przedziałem metabolicznym lub metabolonem, jest korzystny ze względu na ułatwiony, szybki i bezpośredni przepływ produktów pośrednich między centrami aktywnymi kolejnych enzymów. Umożliwia to utrzymanie wysokiego lokalnego stężenia substratów, zwiększa konkurencyjność o substraty wspólne dla różnych ścieżek metabolicznych, jak również chroni komórkę przed szkodliwym działaniem produktów pośrednich, które często są wysoce reaktywne i potencjalnie toksyczne.

Biosynteza antocyjanów steruje przeszło 20 genów. Enzymy przeprowadzające ten proces powiązane są z błonami siateczki śródplazmatycznej [4, 20, 21, 45]. Połączenia z powierzchnią błon szorstkiego retikulum endoplazmatycznego są możliwe z białkami typu P450 [1, 21, 39]. Ostatnio jednak odkryto, że u rzodkiewnika co najmniej dwa enzymy uczestniczące w biosyntezie flawonoidów – syntaza chalkonowa (CHS) i izomeraza chalkonowa (CHI) – występują także w jądrze komórkowym [46].

Wstępne etapy biosyntezy wszystkich klas flawonoidów, w tym antocyjanów, polegają na tworzeniu trójpierścieniowego szkieletu węglowego flawonu (rys. 1). Pierścień fenylowy A jest syntetyzowany z reszt malonylowych otrzymanych w wyniku przemian metabolicznych kwasów tłuszczowych. Natomiast p-kumaroilo-CoA otrzymywany poprzez szlak kwasu szikimowego z fenyloalaniny jest przekształcany w flawonoidowy pierścień B [15]. W sumie podstawowy szkielet flawonowy powstaje z jednej cząsteczki p-kumaroilo-CoA i trzech cząsteczek malonylo-CoA. W wyniku kondensacji, w której bierze udział syntaza chalkonowa (CHS), powstaje 4,2',4',6'-tetrahydroksychalkon inaczej też nazywany chalkonem naryngeniny (rys. 1).

Natomiast w wyniku jednoczesnego działania syntazy chalkonowej (CHS) i reduktazy chalkonowej (CHR) na cząsteczki p-kumaroilo-CoA i malonylo-CoA, otrzymywany jest 4,4',6'-tri-hydroksychalkon. Związek ten po kilku etapach wykorzystujących różne enzymy, przekształcany jest w izoflawonoidy, ważne fizjologicznie związki roślin motylkowatych. Biorą one udział jako przekaźniki informacji wpływających na tworzenie się brodawek korzeniowych. Działanie innego enzymu na wymienione substraty malonylo-kumaroilowe – syntazy stilbenowej (STS), prowadzi do wytworzenia rezweratrolu, którego znaczne ilości stwierdzono w owocach winogron. Wymienione w tym akapicie przemiany wykorzystujące reszty p-kumaroilo-CoA i malonylo-CoA nie są bezpośrednio związane z biosyntezą antocyjanów, ale w pewnych warunkach i roślinach są ich alternatywą.

Powstający w wyniku działania syntazy chalkonowej (CHS) 4,2',4',6'-tetrahydroksychalkon ulega z kolei przekształceniu w wyniku działania izomerazy chalkonowej (CHI) w szerzej znany flawanon – naryngeninę (rys. 1). Naryngenina w do-

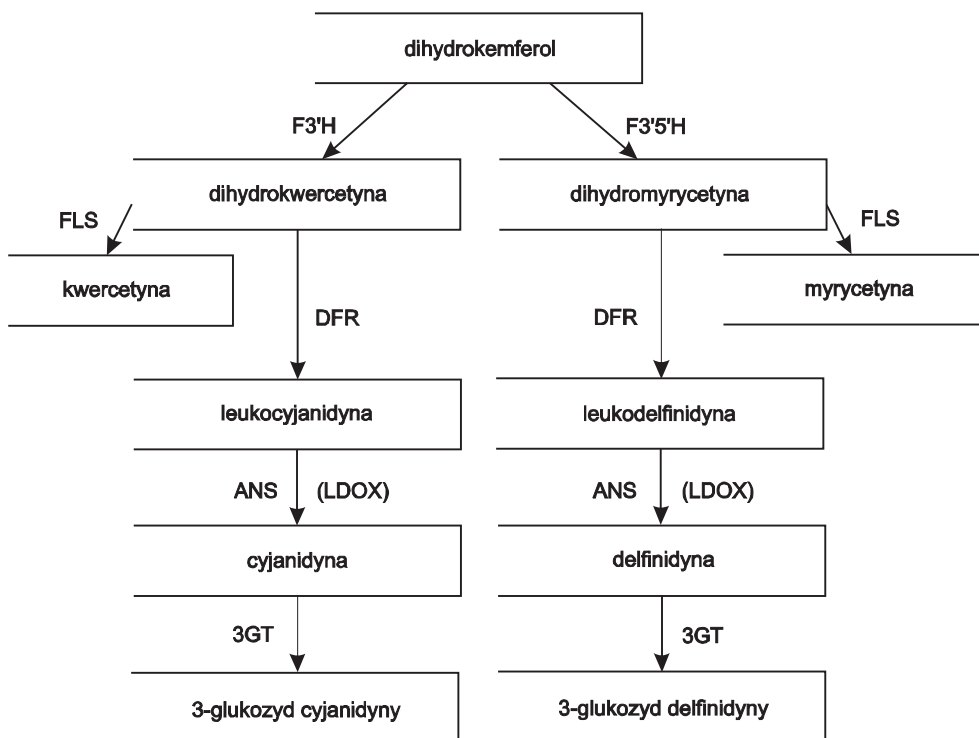


Rysunek 1. Schemat wstępnych etapów biosyntezy różnych typów flawonoidów (w tym antocyjanów) (CHS – syntaza chalkonowa; CHI – izomeraza chalkonowa; F3H – 3-hydroksylaza flawononowa)

syć dużych ilościach gromadzona jest w tkankach owoców cytrusowych wpływając znacząco na ich smak. O obecności naryngeniny świadczy specyficzny, gorzki smak grejpfrutów.

Kolejny etap biosyntezy antocyjanów polega na działaniu 3-hydroksylazy flawononowej (F3H) na naryngeninę, co w efekcie prowadzi do syntezy dihydrokemferolu (rys. 1). Związek ten jest wykorzystywany w kilku różnych reakcjach. Enzymy takie jak 3'-hydroksylaza i 3',5'-hydroksylaza flawonoidowa (F3'H, F3'5'H) poprzez wstawienie 1 lub 2 grup –OH w pozycje 3' lub 3' i 5' mogą go przekształcić w odpowiednie dihydroflawonole kwercetyny i/lub myricetyny (rys. 2). Wymienione dihydroflawonole mogą z kolei podlegać reakcji oderwania dwóch atomów wodoru z pierścienia C, co prowadzi do otrzymania kwercetyny lub myricetyny. Reakcje te katalizuje syntaza flawonolowa (FLS). Ten sam enzym może także przekształcić dihydrokemferol w kemferol [16]. Zarówno kwercetyna, jak i kemferol szeroko występują w fotosyntezujących tkankach roślinnych. Również organy podziemne niektórych roślin z rodzaju *Allium* nagromadzają kwercetynę i jej glikozydy w szczególnie dużych ilościach [18], natomiast wysokie stężenia glikozydów kemferolu stwierdzono w liściach chrzanu (*Armoracia rusticana*) [19].

Dihydrokemferol może być też przekształcany w wyniku działania reduktazy dihydroflawonolowej (DFR) w leukopelargonidynę, bezbarwny prekursor pelargonidyny i jej glikozydów. Ten sam enzym bierze udział w biosyntezie prekursorów innych antocyjanów – leukocyjanidyny, z której powstają glikozydy cyjanidyny oraz leukodelfinidyny tworzącej w kolejnych reakcjach glikozydy delfinidyny (rys. 2). Przekształcanie leukoantocyjanidyn w odpowiednie antocyjanidyny katalizuje syntaza antocyjanidynowa (ANS). Reakcja polega na oderwaniu trzech atomów wodoru z pierścienia C wraz z obecną tam grupą hydroksylową [16]. W nowszych badaniach enzym przekształcający leukoantocyjanidyny w odpowiednie antocyjanidyny określa się jako dioksygenazę leukoantocyjanidynową (LDOX) [50].



Rysunek 2. Schemat końcowych etapów biosyntezy wybranych flawonoli i antocyjanów (z dihydrokemferolu tworzy się po zbliżonych przemianach 3-glukozyd pelargonidyny): F3'H – 3'-hydroksylaza flawonoidowa; F3'5'-H – 3'5'-hydroksylaza flawonoidowa; FLS – syntaza flawonolowa; DFR – reduktaza dihydroflawonolowa; ANS (LDOX) – syntaza antocyjanidynowa (dioksygenaza leukoantocyjanidynowa); 3GT – 3-glukozylotransferaza

Ważnym etapem, który decyduje w dużej mierze o barwie syntezowanego antocyjanu, jest tworzenie glikozydów antocyjanidyn. Biorą w nim udział glikozylotransferazy, np. UDP-glukoza:flawonoid 3-O-glukozylotransferaza (3GT) lub UDP-ramnoza:flawonoid 3-O-ramnozylotransferaza (3RT). Działanie ich polega na katalitycznym podstawieniu wodoru w grupie hydroksylowej związanej z węglem 3 przez glukozę (3GT) lub ramnozę (3RT). Jest też możliwa dalsza modyfikacja takich glikozydów poprzez przyłączenie do cząsteczki glukozy pięciowęglowej ramnozy, co w efekcie prowadzi do powstania rutynozydu. Z kolei za podstawienie wodoru w grupie –OH przyłączonej do węgla 5 jest odpowiedzialny odmienny typ glikozylotransferazy oznaczany jako 5GT [16].

Inne z kolei enzymy biorą udział w powstawaniu acylowych pochodnych antocyjanidyn. Spośród sporadycznie występujących w antocyjanach alifatycznych podstawników acylowych warto wymienić reszty kwasów malonowego i octowego, natomiast wśród aromatycznych występują reszty kwasów fenolowych: p-kumarowego, kawowego, ferulowego i synapowego. Najpowszechniej spotykanym miejscem przyłączenia podstawnika acylowego w antocyjanach jest węgiel numer 6 [3, 16].

Transport i akumulacja antocyjanów

Flawonoidy (w tym antocyjany) po syntezie w obrębie cytoplazmy transportowane są do miejsca ich przechowywania w wakuoli. Proces biosyntezy antocyjanów został dość dobrze poznany, zlokalizowano i opisano większość genów kodujących poszczególne enzymy tego szlaku, oraz mechanizm ich regulacji [16, 24, 50]. Jednakże wciąż niewiele wiadomo na temat molekularnego mechanizmu końcowego etapu tego procesu – transportu barwników antocyjanowych do wakuoli.

Transport antocyjanów do wakuoli wymaga obecności w cytozolu białek zaliczanych do grupy transferaz glutationowych (GST, EC 2.5.1.18) oraz występowania w tonoplaście pompy glutationowej należącej do specyficznej rodziny transporterów. Transferazy glutationowe katalizują reakcje przyłączania cząsteczki glutationu (GSH) do organicznych anionów heterocyklicznych, w tym glikozydów antocyjanidyn [10]. Tworzenie sprzężeń z glutationem nie tylko zwiększa hydrofilowość koniugatów, ale również jest wstępem do ich przeniesienia przez błonę tonoplastu za pomocą specyficznych białek transportujących typu MRP (ang. multidrug resistance protein) [22].

Transferaza glutationowa typu III jest niezbędna do akumulacji antocyjanów w wakuoli kukurydzy [28]. U mutantów kukurydzy, które jej nie mają transport barwników zostaje zahamowany i są one akumulowane w cytoplazmie, gdzie ulegają utlenieniu, nadając komórkom charakterystyczne brązowe zabarwienie. Funkcjonalnie zbliżone transferazy glutationowe zostały odkryte także u petunii [2], goździka [25] i rzodkiewnika [23]. Transferaza glutationowa obecna w petunii zaliczana jest do typu I i pod względem sekwencji aminokwasowej znacznie różni się od typu III (homologia jedynie w 12%). Pomimo że obie transferazy należą do innych typów, ich działanie w tkankach różnych gatunków roślin może się uzupełniać [2, 25], co wskazuje, że pełnią one podobne funkcje, a powstawały niezależnie w procesie ewolucji.

Mimo doniesień o związku transferaz glutationowych z transportem antocyjanów jak dotąd nie udało się *in vivo* stwierdzić występowania połączeń tych barwników z glutationem [33], podczas gdy potwierdzono obecność innych koniugatów glutationu, np. z niektórymi herbicydami [6]. Mueller i in. [33] sugerują, że w przypadku petunii GST pełnią funkcje cytoplazmatycznych białek „eskortujących” dostarczających antocyjany bezpośrednio do odpowiedniego transportera w błonie wakuoli. Podobną funkcję u zwierząt pełni grupa transferaz glutationowych zwanych ligandynami, które oddziałują *in vivo* z różnymi związkami: kwasami tłuszczowymi, bilirubiną, niektórymi lekami, ale nie tworzą z nimi trwałych połączeń i nie katalizują żadnych enzymatycznych przemian. Obecność ich jest jednak niezbędna do transportu tych związków przez błony [10].

Transferazy glutationowe same nie są zdolne do przeniesienia cząsteczek barwników przez błonę wakuoli. Ponieważ do przeniesienia przez błony związków sprzężonych z glutationem w komórkach roślinnych i zwierzęcych wymagane są transportery typu MRP, sugerowano również ich analogiczny udział w transporcie antocyjanów [2,

28]. Białka MRP należą do dużej rodziny transporterów typu ABC (ang. ATP-Binding Cassette) wykorzystujących do przeprowadzenia procesu przeniesienia różnych związków przez błony energię z hydrolizy kompleksu Mg-ATP [40]. Ze względu na ich duże powinowactwo do koniugatów glutationowych nazywane są one często pompami glutationowymi. Istnieją doniesienia wskazujące bezpośrednio na udział transporterów MRP w transporcie antocyjanów. I tak: pompa glutationowa wyizolowana z rzodkiewnika uczestniczy w transporcie do wakuoli 3-glukozydu cyjanidyny [26, 27]. W przypadku kukurydzy nagromadzanie antocyjanów w wakuoli wymaga obecności w tonoplaście białka ZmMRP3 (*Zea mays*), należącego do transporterów typu MRP. Interesujące jest to, że ekspresja genu *ZmMRP3* jest kontrolowana przez regulatory biosyntezy antocyjanów [12].

Inne prace dowodzą, że akumulacja antocyjanów w wakuoli może zachodzić w wyniku transportu zależnego od gradientu protonowego. W wakuolach komórek mutanta *Attt12* rzodkiewnika stwierdzono silne zahamowanie nagromadzania proantocyjanidyn [9]. Gen *AtTt12* koduje białko zbliżone do wtórnych transporterów z rodziny MATE (ang. multidrug and toxic compound extrusion), które do przeniesienia przez błony wykorzystują mechanizm antyportu jonów Na^+ [32]. Mechanizm ten także może służyć do transportu proantocyjanidyn i antocyjanów przez tonoplast do wnętrza wakuoli. Zbliżone do MATE białko zostało odkryte u pomidora, a jego ekspresja jest częściowo regulowana wraz z genami biosyntezy antocyjanów [30]. Hipotezy te wymagają jednak szerszego potwierdzenia eksperymentalnego.

W badaniach *in vitro* do wakuol izolowanych z komórek marchwi (*Daucus carota*) przenoszone były tylko antocyjany acylowane, a transport ten nie wymagał obecności zarówno glutationu, jak też transferazy glutationowej [17]. W badaniach tych wykazano także, że acylowane pochodne antocyjanów wyodrębnione z marchwi nie były transportowane do wakuol pobranych z komórek innych gatunków roślin. Na tej podstawie autorzy wymienionej pracy sugerują, że transport analizowanych związków może odbywać się przy udziale zlokalizowanych w tonoplaście specyficznych przenośników. Według nich wydaje się możliwe, że poszczególne gatunki roślin wykształciły różne mechanizmy transportu antocyjanów do wnętrza wakuoli.

W większości roślin barwniki antocyjanowe rozproszone są w wakuolach komórek, ale czasami występują tam w postaci intensywnie wybarwionych, kulistych globul o różnych rozmiarach i różnej liczebności. Kuliste i barwne twory, zwane antocyjanoplastami lub wakuolarnymi inkluzjami antocyjanowymi (AVI), zostały opisane u ponad 70 gatunków roślin [8, 29, 37, 38]. Nie występują one we wszystkich komórkach magazynujących antocyjany, ale ich obecność ma istotny wpływ zarówno na intensywność, jak i odcień barwy kwiatów. Przykładem są kwiaty goździków, w których nagromadzenie dużych ilości antocyjanoplastów w wakuolach powoduje, że ich barwa jest niebieskoszara, pomimo że zawierają one różowo zabarwione pochodne pelargonidyny [29].

Obserwacje w mikroskopie elektronowym ukazały, że antocyjanoplasty nie mają żadnej błony ani wewnętrznej struktury [29, 36]. Analizy biochemiczne z kolei

dowodzą, że zawarte w nich antocyjany związane są niekowalencyjnie z białkowym nośnikiem (matriks) [29]. Główne białko wyizolowane z AVI ma masę cząsteczkową 24 kDa, i określane jest jako wakuolarnie białko 24 (VP24). Wykazano, że ekspresja genu *VP24* jest ściśle skorelowana z akumulacją antocyjanów, co może dowodzić o istotnej roli białka VP24 w mechanizmie wiązania tych barwników [36, 37, 52]. Stwierdzono, że AVI zawierają szczególne typy antocyjanów, różne od występujących w pozostałej części wakuoli. Na przykład u *Eustoma grandiflorum* antocyjanoplasty zawierają tylko 3,5-diglikozydy antocyjanidyn [29], natomiast u *Vitis vinifera* selektywnie gromadzone są glikozydy acylowane [8]. Kumulacja w AVI tylko niektórych typów antocyjanów zapewne prowadzi do zwiększenia ich trwałości poprzez separację od enzymów zawartych w wakuolach [29].

Podsumowanie

Wieloetapowy proces biosyntezy antocyjanów został dość dobrze poznany. Zlokalizowano i opisano większość genów kodujących niezbędne białka związane z tym szlakiem wraz z mechanizmami regulacyjnymi. Scharakteryzowano też większość enzymów biorących udział w tych przemianach. Jednakże wciąż niewiele wiadomo na temat molekularnego mechanizmu końcowych etapów tego procesu: transportu barwników antocyjanowych do wakuoli, ich wykorzystania oraz degradacji. Brak też ostatecznych dowodów o rzeczywistej roli fizjologicznej antocyjanów w wielu organach roślinnych, takich jak pędy lub korzenie. Szybko rozwijające się metody badawcze z dziedzin biochemii i genetyki molekularnej pozwalają mieć nadzieję na rychłe rozwiązanie tych problemów.

Literatura

- [1] Achnine L., Blancaflor E.B., Rasmussen S., Nixon A. 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16: 3098–3109.
- [2] Alfenito M.R., Souer E., Goodman C.D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V. 1998. Functional complementation of anthocyanins sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10: 1135–1149.
- [3] Andersen O. 2002. Anthocyanins. W: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, <http://www.els.net>: 597–605.
- [4] Burbulis I.E., Winkel-Shirley B. 1999. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12929–12934.
- [5] Chalker-Scott L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70: 1–9.
- [6] Coleman J.O.D., Randall R., Blake-Kalff M.M.A. 1997. Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell Environ.* 20: 449–460.
- [7] Coley P.D., Kusar T.A. 1996. Anti-herbivore defences of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoffs. W: Mulkey S.S., Chazdon R.L., Smith A.P. (red.), Tropical Forest Plant Ecophysiology. New York: Chapman and Hall: 305–335.

- [8] Conn S., Zhang W., Franco C. 2003. Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture. *Biotechnol. Letters* 25: 835–839.
- [9] Debeaujon I., Peeters A.J.M., Leon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. 2001. The transparent testa 12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* 13: 853–871.
- [10] Edwards R., Dixon D.P. 2000. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. W: Cobb A.H., Kirkwood A.C. (red.), *Herbicides and their Mechanisms of Action*. Sheffield. Sheffield Academic Press: 33–71.
- [11] Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Iwashita T., Nomoto K. 2003. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry* 63: 15–23.
- [12] Goodman C.D., Casati P., Walbot V. 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812–1826.
- [13] Gould K.S., Kuhn D.N., Lee D.W., Oberbauer S.F. 1995. Why leaves are sometimes red. *Nature* 378: 241–242.
- [14] Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of flora pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761–780.
- [15] Harborne J.B. 1988. The flavonoids: recent advances. W: Goodwin T.W. (red.) *Plant Pigments*. London, England: Academic Press: 299–343.
- [16] Holton T.A., Cornish E.C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071–1073.
- [17] Hopp W., Seitz H.U. 1987. The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta* 170: 74–85.
- [18] Horbowicz M. 2000. Biosynteza, występowanie i właściwości biologiczne flawonoli. *Post. Nauk Rol.* 2: 3–18.
- [19] Horbowicz M., Rogowska M., Szejda J. 2004. Relation between flavonols and isothiocyanates content in horseradish leaves and population of its main pests: flea beetles (*Phyllotreta* spp.), diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and turnip sawfly (*Athalia rosae* L.). *Pol. J. Entomology* 73: 273–282.
- [20] Hrazdina G., Wagner G.J. 1985. Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 88–100.
- [21] Hrazdina G., Jensen R.A. 1992. Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 241–267.
- [22] Ishikawa T., Li Z.S., Lu Y.P., Rea P.A. 1997. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci. Rep.* 17: 189–207.
- [23] Kitamura S., Shikazono N., Tanaka A. 2004. Transparent testa 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37: 104–114.
- [24] Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* 10: 236–242.
- [25] Larsen E.S., Alfenito M.R., Briggs W.R., Walbot V. 2003. A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize *Bz2* and petunia *An9*. *Plant Cell Rep.* 21: 900–904.
- [26] Lu Y.P., Li Z.-S., Rea P.A. 1997. AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8243–8248.
- [27] Lu Y.-P., Li Z.-S., Drozdowicz Y.M., Hortensteiner S., Martinoia E., Rea P.A. 1998. AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10: 267–282.
- [28] Marrs K.A., Alfenito M.R., Lloyd A.M., Walbot V. 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375: 397–400.
- [29] Markham K.R., Gould K.S., Winefield C.S., Mitchell K.A., Bloor S.J., Boase M.R. 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* 55: 327–336.
- [30] Matthews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J., Wagner D.R. 2003. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15: 1689–1703.
- [31] Meer van der I.M., Stam M.E., van Tunen A.J., Mol J.N.M., Stuitje A.R. 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4: 253–262.
- [32] Morita Y., Kataoka A., Shiota S., Mizushima T., Tsuchiya T. 2000. Norm of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* 182: 6694–6697.
- [33] Mueller L.A., Goodman C.D., Silady R.A., Walbot V. 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid binding protein. *Plant Physiol.* 123: 1561–1570.

- [34] Neill S.O., Gould K.S. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants. *Functional Plant Biol.* 30: 865–873.
- [35] Nick P., Ehmann B., Furuya M., Schäfer E. 1993. Cell communication, stochastic cell response and anthocyanin pattern in mustard cotyledons. *Plant Cell* 5: 541–552.
- [36] Nozue M., Kubo H., Nishimura M., Katou A., Hattori C., Usuda N., Nagata T., Yasuda H. 1993. Characterization of intravacuolar pigmented structures in anthocyanin-containing cells of sweet potato suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 34: 803–808.
- [37] Nozue M., Yamada K., Nakamura T., Kubo H., Kondo M., Nishimura M. 1997. Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol.* 115: 1065–1072.
- [38] Peckert R.C., Small C.J. 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry* 19: 2571–2576.
- [39] Rasmussen S., Dixon R.A. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11: 1537–1551.
- [40] Rea P.A., Li Z-S., Lu Y-P., Drozdowicz Y.M., Martinoia E. 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 727–760.
- [41] Saniewski M., Horbowicz M., Puchalski J. 2006. Induction of anthocyanins accumulation by methyl jasmonate in shoot of *Crassula multicava* LAM. *Acta Agrobot.* 59: 43–50.
- [42] Saniewski M., Horbowicz M., Puchalski J., Ueda J. 2003. Methyl jasmonate stimulates the formation and accumulation of anthocyanins in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Acta Physiol. Plant.* 25: 143–149.
- [43] Saniewski M., Miszczak A., Kawa-Miszczak L., Węgrzynowicz-Lesiak E., Miyamoto K., Ueda J. 1998. Effect of methyl jasmonate on anthocyanin accumulation, ethylene production, and CO₂ evolution in uncooled and cooled tulip bulbs. *J. Plant Growth Regul.* 17: 33–37.
- [44] Saniewski M., Miyamoto K., Ueda J. 1998. Methyl jasmonate induces gums and stimulates anthocyanin formation in peach shoots. *J. Plant Growth Regul.* 17: 121–124.
- [45] Saslowsky D., Winkel-Shirley, B. 2001. Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 27: 37–48.
- [46] Saslowsky D.E., Warek U., Winkel-Shirley B. 2005. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 280: 23735–23740.
- [47] Stafford H.A. 1974. Possible multi-enzyme complexes regulating the formation C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 8: 53–79.
- [48] Troyer J. 1964. Anthocyanin formation in excised segments of buckwheat-seedling hypocotyls. *Plant Physiol.* 39: 907–912.
- [49] USDA 2006. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 2. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
- [50] Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485–493.
- [51] Winkel-Shirley B. 2004. Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 85–107.
- [52] Xu W., Shiori H., Kojima M., Nozue M. 2001. Primary structure and expression of a 24-kD vacuolar protein (VP24) precursor in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol.* 125: 447–455.
- [53] Yamasaki H. 1997. A function of colour. *Trends Plant Sci.* 2: 7–8.

Occurrence, biosynthesis and accumulation of anthocyanins in plants

Key words: anthocyanins, occurrence, biosynthesis, accumulation

Summary

The occurrence, biosynthesis pathways, as well as transport mechanisms and accumulation of anthocyanins in plants were reviewed. Anthocyanins are a large group of plant pigments belonging to flavonoids. They occur in plant tissues mainly as glycosidic derivatives, and are the main components of flower colours and skin of many fruits. The first steps of anthocyanins biosynthesis are the same like in case of other flavonoids, and lead to naringenin. Then the naringenin can be converted into dihydrokaempferol, which is a substrate for biosynthesis of dihydromyricetin, and/or dihydroquercetin. Dihydrokaempferol, dihydromyricetin and dihydroquercetin can be used for biosynthesis of pelargonidin, delphinidin, and cyanidin respectively, which are next converted in numbers of glucosids. Anthocyanins are accumulated in cell vacuoles, mainly in the flower tissues and in fruits skin.

Tradycyjne i nowoczesne metody oceny wigoru nasion

Paweł Grzywacz, Aleksandra Orzeszko-Rywka

*Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159, 02 787 Warszawa
e-mail: aleksandra_orzeszko_rywka@sggw.pl*

Słowa kluczowe: wigor nasion, testy wigorowe, jakość nasion

Wstęp

Zdolność kiełkowania, definiowana jako procent siewek normalnych wyrosłych z nasion w optymalnych warunkach środowiska, jest przyjętym i akceptowanym na świecie kryterium oceny żywotności nasion [5, 15]. Celem tego testu jest określenie potencjalnych możliwości kiełkowania nasion danego gatunku, dlatego też jest on przeprowadzany w optymalnych warunkach. Jednak wysoka wartość zdolności kiełkowania nie zawsze znajduje odzwierciedlenie w zadowalających wschodach polowych [19]. Partie nasion równe pod względem wyżej wspomnianego parametru, wysiane w tym samym czasie i miejscu, mogą różnić się wschodami polowymi. Ponadto, takie partie nasion mogą różnie reagować na warunki przechowania i transportu [5, 15]. Za przyczynę takiego stanu rzeczy uznaje się różnice w wigorze nasion. Wiadomo, że spadek wigoru nasion następuje wcześniej niż spadek zdolności kiełkowania czy żywotności nasion. Celem oceny wigoru nasion jest więc uzyskanie szerszych informacji o wartości siewnej i jakości nasion niż na podstawie oceny zdolności kiełkowania [15]. W nowoczesnej produkcji roślinnej wysoki wigor nasion coraz bardziej zyskuje na znaczeniu jako czynnik wpływający na jakość i wielkość plonów.

Oficjalna definicja wigoru nasion, przyjęta w 1977 roku przez Międzynarodowy Związek Oceny Nasion (ISTA), głosi, że „wigor nasion jest sumą tych właściwości nasion, które określają poziom aktywności i zachowanie się nasienia lub partii nasion w czasie kiełkowania i wschodów siewek” [5, 15, 19]. Już w 1876 roku, niemiecki uczony Fredrich Nobbe, wprowadził termin „Triebkraft” (z niem. *Trieb* – instynkt, *potęda* i *Kraft* – siła, moc), będący swoistym pierwowzorem pojęcia wigoru [15, 19]. Z kolei Stowarzyszenie Urzędowych Analityków Nasion (AOSA) – ustalające zasady oceny nasion w Ameryce Północnej, definiuje wigor nasion jako „zbiór tych właści-

wości nasion, które określają zdolność nasion do szybkich, jednolitych wschodów i wzrostu normalnych siewek w szerokim zakresie warunków polowych” [4, 6, 9]. Wigor nasion nie jest cechą pojedynczą, mierzalną, lecz pojęciem opisującym szereg cech związanych z zachowaniem się nasion w polu i podczas przechowywania [5, 15]. Z kolei czynnikami mającymi wpływ na kształtowanie się poziomu wigoru nasion są: 1) uwarunkowania genetyczne; 2) warunki wzrostu, rozwoju i dojrzewania roślin matecznych; 3) stan dojrzałości nasion w czasie zbioru; 4) cechy morfologiczne nasion; 5) uszkodzenia nasion; 6) wiek fizjologiczny nasion; 7) patogeny [5, 15]. W sprzyjających warunkach środowiska, zbliżonych do optymalnych, gdy wschody polowe odpowiadają w przybliżeniu laboratoryjnej zdolności kiełkowania, wartość wigoru nasion traci na znaczeniu [5, 10]. Takie optymalne warunki kiełkowania są jednak w praktyce dość rzadkie. Udowodniono, że w stresowych warunkach wysokowigorowe nasiona dają wyższe i bardziej równomierne wschody niż nasiona o porównywalnej zdolności kiełkowania, ale o niskim wigorze [5, 15, 19]. Wigor nasion ma niewątpliwie duży wpływ również na plon roślin, gdyż wpływając na szybkość i równomierność wschodów, a potem wzrostu siewek, decyduje o wyrównaniu morfologicznym roślin, a tym samym o wielkości ponoszonych strat podczas mechanicznego zbioru [19].

Testy wigorowe

Test wigorowy powinien spełniać następujące wymagania: 1) wysoka korelacja ze wschodami polowymi (wyższa niż w przypadku laboratoryjnej zdolności kiełkowania), 2) powtarzalność, 3) obiektywność, 4) szybkość, 5) prostota, 6) niski koszt [7, 10]. Od roku 1950 do oceny wigoru nasion zaproponowano ponad 60 różnych testów, jednak Komitet Oceny Wigoru ISTA skoncentrował się głównie na standaryzacji dziewięciu z nich [16]. Są to testy: elektroprzewodnictwa, przyspieszonego starzenia, kontrolowanego starzenia, tetrazolinowy, cold-test, cool-test, test Hiltnera, test wigorowy stresu kompleksowego i testy wzrostowe.

Testy wigorowe nie przewidują bezpośrednio wartości wschodów polowych, dostarczają jedynie wartości względnych opisujących jakość nasion [10]. Ocena wigoru jest dokonywana poprzez porównanie kilku jednocześnie badanych próbek z próbką kontrolną o znanym wigorze [10]. Z powyższych względów, dla wielu gatunków niezwykle trudne jest wyznaczenie ostrych granic między zadowalającym poziomem wigoru nasion a poziomem wigoru, który jest nie do przyjęcia [10]. Dąbrowska i in. [5] oraz Oakley i in. [18] wyróżniają następujące kategorie testów wigorowych:

Testy oparte na kiełkowaniu. Są najbardziej znane, najszerzej używane, łatwe w stosowaniu i na ogół powtarzalne. Badają tempo, szybkość kiełkowania, wczesny wzrost siewki lub też liczbę skiełkowanych normalnych siewek po wcześniejszej ekspozycji badanej partii nasion na warunki stresowe. Zalicza się do nich: wigorowe testy wzrostowe (test wzrostu siewki, test szybkości wzrostu siewki i test oceny

siewek), unowocześnioną formę testów wzrostowych, za jaką można uznać komputerową analizę cyfrowych obrazów kiełkujących siewek; cold-test, cool-test, test Hiltnera, testy AA, SSAA i CD [5, 18]. Badania ISTA wskazują jednak na niezadawalającą powtarzalność wyników tych testów między laboratoriami i niską korelację uzyskanych wartości ze wschodami połowymi [5]. Inne wady to czasochłonność i konieczność precyzyjnej kontroli warunków przeprowadzania testów, aby mogły być powtarzalne między laboratoriami [23].

Testy fizjologiczne i biochemiczne. Są znacznie mniej czasochłonne w stosunku do opisanych wyżej i uznawane za przyszościowe. Obejmują pomiary aktywności metabolicznej nasion; parametrów związanych z oddychaniem, naprawą błon komórkowych, czy produkcją substancji lotnych [18]. Zalicza się do nich: test elektroprzewodnictwa, test tetrazolinowy, wszelkie metody pomiaru aktywności enzymów: oksydazy ACC (kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego), sumarycznej aktywności dehydrogenaz; pomiary zawartości ATP [5]. Metody oparte na analizie produkcji etylenu przez nasiona oraz na ocenie wigoru nasion z wykorzystaniem cytometrii przepływowej należy również zaliczyć do tej grupy testów. Z grupy tej tylko test elektroprzewodnictwa zyskał większe uznanie i jest szeroko stosowany [18]. Jednak z powodu skomplikowanych procedur i często niespójnych korelacji ze wschodami połowymi, ta kategoria testów nie jest rutynowo stosowana [23].

Testy złożone. Oparte są na założeniu, że wigor nasion stanowi złożoną odpowiedź na zmienne warunki środowiska [18]. Polegają one na ocenie więcej niż jednej cechy badanych nasion. Zaliczyć do nich można wigorowy test stresu kompleksowego (CSVST). Ta grupa testów wymaga jeszcze dalszych badań do szerszego stosowania [5].

Charakterystyka testów wigorowych

Testy wzrostowe

W teście wzrostu siewki nasiona poddawane są kiełkowaniu w optymalnych warunkach temperatury i wilgotności, a poziom wigoru jest oceniany na podstawie pomiaru długości plumuli (pączka pędowego) [5]. Wiedząc, że długość siewki jest pochodną szybkości jej wzrostu, a tym samym jej wigoru; można uszeregować próbki nasion pod względem ich jakości. Do zalet tego testu można zaliczyć prostotę i dokładność, do wad natomiast: pracochłonność, ograniczenie do gatunków wytwarzających pojedynczy pączek pędowy (np. trawy), niemożność porównywania wyników różnych serii badań, gdyż warunki prowadzenia testu istotnie wpływają na jego wyniki, oraz brak możliwości porównań między odmianami, z powodu różnic we wzroście siewek [5]. Za unowocześnioną formę tego testu można uznać metodę badania wigoru nasion opartą na komputerowej analizie cyfrowych obrazów kiełkujących siewek.

Test szybkości wzrostu siewki różni się od opisanego wcześniej tym, że wigor nasion ocenia się tu na podstawie suchej masy normalnych siewek [5]. Szybkość wzrostu siewki można również mierzyć metodą komputerowej analizy cyfrowych obrazów kiełkujących siewek. Test oceny siewek stanowi rozszerzenie oceny zdolności kiełkowania o dodatkową klasyfikację siewek normalnych na: „silne” – o wysokim wigorze i „słabe” [5]. Siewki słabe charakteryzują się opóźnionym rozwojem czy też nieznacznymi uszkodzeniami, które nie kwalifikują ich jeszcze jako siewek nienormalnych, ale odróżniają je od siewek silnych. Taka ocena może jednak być subiektywna, w wypadku niewystarczającego doświadczenia laboranta.

Cold-test i Cool-test

Cold-test jest najpowszechniej stosowany, ze wszystkich testów wigorowych. Za pomocą tego testu bada się kiełkowanie nasion w obecności takich czynników stresowych, jak wysoka wilgotność gleby, niska temperatura (chłód) i występowanie patogenów grzybowych w glebie [5]. Jest on najczęściej stosowany w ocenie nasion kukurydzy (*Zea mays* L.) i soi (*Glycine max* (L.) MERR.) [5, 10, 19]. Wadą tego testu jest jednak jego słaba powtarzalność, szczególnie między laboratoriami, wynikająca z trudności w standaryzacji niesterylnej gleby używanej podczas testu, czego konsekwencją jest jego ograniczenie do wewnętrznego użytku w obrębie laboratorium [5, 10, 19]. Stwierdzono, że warunki przewidziane w Cold-teście są dla niektórych roślin ciepłolubnych zbyt ostre [5]. **Cool-test** jest jego wariantem o łagodniejszych warunkach (wyższa temperatura gleby), stosowanym m.in. dla nasion fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) i bawełny zwyczajnej (*Gossypium hirsutum* L.).

Test wigorowy stresu kompleksowego (complex stressing vigour test – CSVT)

W teście tym nasiona poddawane są stresom: niskiej temperatury i niedoboru tlenu, stosując ich moczenie w wodzie: najpierw w temperaturze 20–25°C, a następnie w temperaturze 2–5°C [5]. Po tej procedurze przeprowadza się standardową próbę kiełkowania w optymalnych warunkach i ocenę wigoru nasion w podobny sposób, jak w teście wzrostu siewki [5, 19]. Test ten opracowano dla kukurydzy (*Zea mays* L.) i pszenicy (*Triticum aestivum* L.) [5].

Test Hiltnera (brick grit test)

Przepisy ISTA podają zastosowanie tego testu dla takich gatunków roślin uprawnych, jak kukurydza (*Zea mays* L.), pszenica (*Triticum aestivum* L.), jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), owies (*Avena sativa* L.) i ryż (*Oryza sativa* L.) [28]. W teście Hiltnera nasiona są poddawane działaniu stresu fizycznego, jakim jest przykrywająca je warstwa gruzu ceglanego, przez który kiełkujące siewki muszą się przebić [5, 19, 28]. Wskaźnikiem wigoru jest tu procent siewek normalnych, które przebiły się przez gruz [5]. Stwierdzono, że test ten daje lepsze wyniki dla roślin jednoliściennych niż dwuliściennych [19]. Wśród wad tego testu wymienia się: kosztowność, czasochłonność, trudności związane ze zdobyciem, sterylizacją, suszeniem czy płukaniem gruzu [5].

Test przyspieszonego starzenia (accelerated ageing – AA)

Test ten jest jednym z dwóch testów wigorowych zatwierdzonych przez ISTA i włączonych do międzynarodowych zasad oceny nasion jako standardowa metoda oceny nasion soi (*Glycine max* (L.) MERR.) [15]. W teście tym nasiona poddawane są działaniu dwóch czynników stresowych: wysokiej temperaturze (40–45°C) i wysokiej wilgotności powietrza (wynoszącej prawie 100%) [5, 15]. Test przyspieszonego starzenia stosowano początkowo do określenia możliwej długości okresu przechowywania nasion soi (*Glycine max* (L.) MERR.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) [5, 20]. Badania wykazały, że test ten nie może być stosowany dla nasion kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), kalafiora (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) i sałaty (*Lactuca sativa* L.) [4, 7, 16, 19].

Test przyspieszonego starzenia w nasyconym roztworze soli (SSAA)

Ten test wigorowy wprowadzono w 1996 r. dla badania jakości małych nasion, jako alternatywa dla testów AA i kontrolowanego starzenia (CD), które okazały się w ich przypadku mało precyzyjne [7, 16, 20]. Metoda ta jest modyfikacją testu AA. Różnica polega na tym, że do uzyskania wysokiej wilgotności w komorze zamiast wody destylowanej stosuje się nasycony roztwór chlorku sodu, dzięki czemu wilgotność w komorze sięga tylko około 76%, zmniejszając tym samym tempo pobierania wody przez nasiona [16, 21]. Zapewnia to łagodniejsze warunki starzenia i zmniejsza tempo deterioracji nasion. Dowiedziono skuteczności tej metody w ocenie wigoru nasion takich gatunków, jak niecierpek Waleriana (*Impatiens walleriana* Hook), sałata (*Lactuca sativa* L.), pszenica (*Triticum aestivum* L.), cebula (*Allium cepa* L.) i fiołek trójbarwny (*Viola tricolor* L.) [4, 18, 20, 21].

Test kontrolowanego starzenia (controlled deterioration – CD)

Nasiona są w tym przypadku, podobnie jak w teście AA, poddawane działaniu takich czynników, jak wysoka temperatura i wysoka wilgotność (uwodnienie) nasion przez okres 24–48 godzin [5, 19]. Test ten był początkowo przeznaczony do oceny niskiej wartości siewnej i/lub przechowalniczej małych nasion takich gatunków warzyw, jak marchew (*Daucus carota* L.), cebula (*Allium cepa* L.), sałata (*Lactuca sativa* L.) czy warzywa kapustne (*Brassicaceae*) [5, 16].

Test elektroprzewodnictwa

Test ten jest jednym z dwóch testów wigorowych zatwierdzonych przez ISTA i włączonych do międzynarodowych zasad oceny nasion jako standardowa metoda oceny nasion grochu ogrodowego (*Pisum sativum* L.) [15, 27]. Wigor nasion jest w tym przypadku oceniany pośrednio, poprzez konduktometryczny pomiar przewodnictwa elektrycznego (konduktancji) roztworu powstałego przez 24-godzinne moczenie nasion w wodzie destylowanej [5, 15, 19]. Bezpośrednio mierzony jest tu stopień szczelności i ogólny stan błon komórkowych, który wpływa na ilość elektrolitów

wyciekających z nasienia do wody. Im niższe przewodnictwo roztworu, tym lepszy stan błon komórkowych i tym wyższy wigor nasion [5, 19]. Dowiedziono skuteczności tej metody w ocenie wigoru nasion takich gatunków, jak np. papryka roczna (*Capsicum annuum* L.) [16], soja (*Glycine max* (L.) MERR.) [26], komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus* L.) [1], wyka (*Vicia benghalensis* L.) i lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) [27]. Metoda ta okazała się jednak nieprzydatna w ocenie wigoru nasion traw – sorga japońskiego (*Sorghum japonicum* (HACK.) ROSHEV) i wydmuchrzy syberyjskiej (*Elymus sibiricus* L.) [27].

Test wycieku potasu (potassium leakage test)

Marcos-Filho (1998) przedstawił test wycieku potasu jako wskaźnik wigoru nasion i badał jego użyteczność w ocenie jakości nasion soi (*Glycine max* (L.) MERR.) [16]. Test ten opiera się na tych samych zasadach, co test przewodnictwa i może być używany jako wskaźnik szczelności błon komórkowych, zabiera przy tym znacznie mniej czasu [3]. Ilość potasu, który wyciekł z nasion zmierzono za pomocą spektrofotometru płomieniowego [16]. Badania pokazały, że metoda ta uszeregowwała badane partie nasion podobnie jak inne wykonane testy [16]. Potwierdzono również skuteczność tej metody w ocenie wigoru nasion kukurydzy (*Zea mays* L.) [3].

Wigorowy test tetrazolinowy (tetrazolium test)

Tę metodę biochemiczną wykorzystuje się zarówno do oceny wigoru, jak i do oceny żywotności nasion [5]. Polega ona na traktowaniu nasion lub tylko ich zarodków bezbarwnym roztworem chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliny i obserwacji barwnej reakcji zachodzącej w tkankach nasienia, redukowaniu soli tetrazolinowej do trifenyloformazanu – nierozpuszczalnego w wodzie, nieulegającego rozkładowi związku o czerwonej barwie [5, 19]. Dzieje się to tylko w żywych komórkach, gdzie zachodzą procesy redukcyjne i gdzie aktywne są dehydrogenazy, od których barwnik przyjmuje wodór [5, 19]. Martwe tkanki pozostają niezabarwione. Na podstawie widocznego po barwieniu rozmieszczenia nekroz i ich wielkości dokonywana jest ocena wigoru [19]. Niedogodnością tego testu jest to, że wymaga on doświadczenia i wprawy w wykonywaniu procedury oraz w interpretacji wyników testu [5]. Wiadomo też, że barwna reakcja zależy, poza aktywnością dehydrogenaz, także od innych czynników, jak np. stopień zesterzenia tkanek – starsze żywe tkanki są słabiej zabarwione; tkanki uszkodzone przy preparowaniu mają kolor ciemnoczerwony – na skutek przyspieszonego oddychania [5].

Metoda fluorescencji chlorofilu (chlorophyll fluorescence – CF)

Do oceny dojrzałości i jakości nasion zaproponowano metodę opartą na pomiarach wartości fluorescencji chlorofilu nienaruszonych nasion [8, 12, 13, 19]. Zaletami tej metody są: jej wysoka czułość, całkowita niedestrukcyjność metody i duża szybkość pomiaru [13, 19]. Dla większości gatunków roślin, zawartość chlorofilu w okrywie nasiennej spada wraz z dojrzewaniem nasion [12, 13, 19]. Wraz ze spadkiem

wspomnianej wyżej wartości, ich zdolność kiełkowania wzrasta. Utrata zielonego barwnika w nasionach może służyć ograniczeniu możliwości emitowania przez chlorofil wolnych elektronów, mogących powodować uszkodzenia oksydacyjne, a spadek jakości nasion podczas ich przechowywania jest często przypisywany wyżej wymienionym uszkodzeniom [13]. Badania na nasionach kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) dowiodły, że metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu może być używana do poprawy jakości partii nasion tego gatunku przez identyfikację i odrzucanie mniej dojrzałych nasion [13].

Test etanolowy dla rzepaku (Canola seed vigour ethanol test)

Jak podają Buckley i in. [2], rzepak dwuzerowy (*Brassica napus* L.) jest jednym z gatunków uprawnych, dla którego nie ma na razie wiarygodnego testu wigorowego [2]. Stwierdzono, że nasiona podczas pęcznienia przechodzą fazę metabolizmu beztlenowego, kiedy to produkowane są etanol i aldehyd octowy [2]. Po tym okresie, nasiona przechodzą z powrotem na metabolizm tlenowy i produkcja tych związków spada i ustaje [2]. Jednak w nasionach gorszej jakości powyższy proces postępuje wolniej. Zauważono wzrost produkcji tychże związków towarzyszący procesowi naturalnego lub sztucznego starzenia w wilgotnych nasionach soi (*Glycine max* (L.) MERR.), grochu (*Pisum sativum* L.), czy melona (*Cucumis melo* L.) [2]. Autorzy badali produkcję etanolu przez wilgotne nasiona rzepaku i zauważyli wysoką korelację między wigorem tych nasion a poziomem powstałego etanolu. Wyniki eksperymentu dowiodły, że poziom emisji etanolu przez wilgotne nasiona rzepaku jest dobrym wskaźnikiem wigoru nasion tego gatunku. Stwierdzono również znaczące korelacje między wynikami polowych wskaźników wigoru a emisją etanolu [2].

Q2 Test

Jest to szybka, precyzyjna i nieinwazyjna metoda oceny jakości pęczniących nasion [8, 11]. Urządzenie pomiarowe mierzy, w regularnych odstępach czasu, stężenia tlenu w zamkniętych płytkach składających się z 24, 48 lub 96 otworów [11]. W każdym otworze umieszczone jest jedno nasienie. W ten sposób dokonywany jest całkowicie automatyczny pomiar aktywności oddechowej poszczególnych nasion [8]. Ocena jakości nasion możliwa jest już po 10–48 godzinach od rozpoczęcia pęcznienia. Niestety, nie ma jednak danych o korelacji wyników uzyskanych tą metodą z wynikami wschodów polowych lub innymi testami wigorowymi.

Testy oparte na pomiarze aktywności enzymów

Sumaryczna aktywność **dehydrogenaz** w nasionach jest uważana za dobry wskaźnik jakości nasion [8, 14]. Metoda ta opiera się na barwnej reakcji z użyciem soli tetrazolinowej, podobnie jak w wigorowym teście tetrazolinowym. Powstały w wyniku reakcji trifenyloformazan jest ekstrahowany z nasion za pomocą acetonu, po czym mierzy się absorbancję tak otrzymanego roztworu przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 488 nm [8].

Przekształcenie ACC w etylen zachodzi przy udziale **oksydazy ACC (ACCO)** [8]. Produkcja etylenu zależna od ACC, jego bezpośredniego prekursora, jest uznawana za dobry wskaźnik wigoru nasion u wielu gatunków roślin. Aktywność oksydazy ACC in vivo zależy od stopnia szczelności błon komórkowych, tak więc zdolność nasion do przekształcenia ACC w etylen jest pośrednim wskaźnikiem stanu tych błon, a tym samym wigoru nasion [8]. Kępczyńska i in. [14], badając wpływ matrikondycjonowania na jakość nasion cebuli (*Allium cepa* L.), zaobserwowali, że zabieg ten spowodował wzrost aktywności oksydazy ACC [14]. Stwierdzono ponadto spadek aktywności tego enzymu podczas starzenia się nasion, co w połączeniu z wynikami innych pomiarów jakości nasion, potwierdza tezę o związku aktywności omawianego enzymu z wigorem nasion [14].

Komputerowa analiza cyfrowych obrazów kiełkujących siewek

Testy wigorowe dla roślin uprawnych o mniejszych nasionach oparte są głównie na pomiarach wzrostu siewek [7]. Dowiedziono skuteczności takich pomiarów w ocenie wigoru nasion marchwi (*Daucus carota* L.), sałaty (*Lactuca sativa* L.), rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.), buraka cukrowego (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), kalafiora (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), cebuli (*Allium cepa* L.) czy pora (*Allium porrum* L.) [7]. Jednak z powodu małych rozmiarów nasion, pomiary wczesnego wzrostu siewek mogą być trudne, czasochłonne i subiektywne [7, 18]. Zastosowanie komputerowo wspomaganą analizy wielkości siewki rozwiązuje te problemy, pozwala na szybki, dokładny i obiektywny pomiar. Jak podaje Hoffmaster i in. [9], czas pomiaru komputerowej oceny wigoru próbki nasion soi trwa poniżej 20 sekund, podczas gdy pomiary ręczne wymagają dłuższego czasu, około 30 minut [9]. Istnieją komercyjne systemy, które za pomocą komputerowej analizy cyfrowych obrazów oceniają wzrost siewek, a na tej podstawie – wigor nasion [7, 18]. Obrazy te są uzyskiwane za pomocą kamery wideo sprzężonej z procesorem CCD lub też przy użyciu skanera. Stworzono również oprogramowanie umożliwiające taką ocenę. Contreras i Barros [4], Peñaloza i in. [20] oraz Sako i in. [22] wykorzystali analizę komputerową w badaniu wigoru nasion sałaty (*Lactuca sativa* L.) [4, 20, 22]. Wyniki wszystkich eksperymentów pokazały dużą precyzję oceny wigoru nasion. Do jej zalet zaliczono obiektywizm, niski koszt, prostotę i powtarzalność [22]. Hoffmaster i in. [9] opracowali również system komputerowej analizy obrazów siewek do oceny wigoru nasion soi (*Glycine max* (L.) MERR.) [9].

Analiza produkcji etylenu

Stwierdzono, że podczas wzrostu korzenia zarodkowego w pęczniejących nasionach zachodzi wytwarzanie etylenu [19]. Etylen jest produkowany podczas pęcznienia nasion niebędących w spoczynku, z wyraźnym wzrostem produkcji towarzyszącemu procesowi kiełkowania nasion [6, 23]. Występuje silny związek między wigorem nasion, czasem potrzebnym do rozpoczęcia kiełkowania a zdolnością nasion

do wytwarzania etylenu. Kępczyńska i in. [14] stwierdzili, że poziom produkcji etylenu spadał wraz z postępowaniem procesu starzenia się nasion. Jak podaje Dutt i in. [6], produkcja etylenu jest skorelowana z wigorem nasion wielu gatunków, takich jak kukurydza (*Zea mays* L.), pomidor (*Lycopersicon esculentum* MILL.), por (*Allium porrum* L.), sałata (*Lactuca sativa* L.), fasola (*Phaseolus vulgaris* L.), rzodkiewka (*Raphanus sativus* L.) czy groch (*Pisum sativum* L.) oraz że pęczniejące nasiona o niskim wigorze zaczynały produkować wyżej wymieniony związek w późniejszym czasie i w mniejszych ilościach niż nasiona wysokowigorowe [6].

Ocena aktywności cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej

Metodę cytometrii przepływowej można zaadaptować do oceny jakości nasion [24, 25]. Śliwińska i Pedersen [25] badali za jej pomocą stadia replikacyjne jąder komórkowych nasion buraka cukrowego (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) o porównywalnej zdolności kiełkowania, ale różnym wigorze [25]. Stwierdzono, że stosunek faz jądrowych G2/G1 wykazuje wysoką, dodatnią korelację z wigorem nasion. Zaobserwowano także, że ilość komórek w fazie G2 była wyższa u nasion dojrzałych, niż u nasion niedojrzałych [24]. Stosunek liczby komórek w fazie G2 do liczby komórek w fazie G1 (G2/G1) w nasionach niekiełkujących był wyższy u nasion o wyższym wigorze [25] i wzrastał on podczas kiełkowania u wszystkich badanych nasion [24, 25]. Powyższe badania dowiodły, że cytometria przepływowa może być używana do oceny wigoru nasion. Zdaniem autorów tych badań, analiza nasion kiełkujących nie dostarcza więcej informacji o ich jakości niż analiza nasion niekiełkujących, która jest metodą szybszą i tańszą niż metody klasyczne [25].

Podsumowanie

Obecnie testy wigorowe różnią się stopniem wiarygodności i możliwościami ich zastosowania dla poszczególnych gatunków roślin. Jak zauważa McDonald, nie ma bowiem uniwersalnego testu wigorowego, idealnego dla nasion wszystkich gatunków roślin, a w związku z tym, nie istnieje jedna standardowa procedura, na tle której można ocenić wartość danego testu [17]. Obecnie większość dostępnych testów wigorowych jest opracowanych i polecanych dla konkretnych gatunków roślin. Można również zauważyć, że większość obecnie stosowanych testów wigorowych określa pewien aspekt lub komponent jakości nasion. Jak twierdzi McDonald, szerszą informację o jakości nasion można uzyskać tylko przeprowadzając serię kilku testów wigorowych [17]. Takie podejście wydaje się uzasadnione, ale są również pewne wątpliwości utrudniające wprowadzenie go do powszechnej praktyki. Po pierwsze, nie wiadomo jaka część składowa ostatecznego wskaźnika wigoru miałaby przypadać każdemu testowi [17]. Druga wątpliwość, to większy koszt i dłuższy czas pozyskania takich informacji [17].

Literatura

- [1] Artola A., Carrillo-Castaneda G. 2005. The bulk conductivity test for birdsfoot trefoil seed. *Seed Science and Technology* 33(1): 231–236.
- [2] Buckley W.T., Irvine R.B., Buckley K.E., Elliott R.H. 2003. Canola Seed Vigour Ethanol Test (http://www.umanitoba.ca/afs/agronomists_conf/2003/pdf).
- [3] Carvalho M.V., Marcos-Filho J. 2002. Potassium leakage and maize seed physiological potential. *Scientia Agricola* 59(2): 315–319.
- [4] Contreras S., Barros M. 2005. Vigor tests on lettuce seeds and their correlation with emergence. *Ciencia Investigacion Agraria* (in English) 32(1): 3–10.
- [5] Dąbrowska B., Pokojńska H., Suchorska-Tropiło K. 2000. Metody laboratoryjnej oceny materiału siewnego. Wyd. SGGW, Warszawa.
- [6] Dutt M., Kester S., Geneve R. 2004. Elevated level of ethylene during germination reduces the time to radicle emergence in impatiens. *Acta Horticulturae* 631: 43–47.
- [7] Geneve R.L., Kester S.T. 2001. Evaluation of seedling size following germination using computer-aided analysis of digital images from a flat-bed scanner. *HortScience* 36(6): 1117–1120.
- [8] Grzesik M. 2005. Markers of seed quality. International Research Network: physiological and practical aspects of the yield and seed quality improvement by ecological methods. Research Institute of Pomology and Floriculture; Skierniewice.
- [9] Hoffmaster A.L., Fujimura K., McDonald M.B., Bennett M.A. 2004. An automated system for vigor testing in three-day-old soybean seedlings. *International Society of Seed Technologists Reports* 3(4): 6–15.
- [10] <http://www.ag.ohio-state.edu/~seedsci/svvt01.html> (Department of Horticulture and Crop Science The Ohio State University: Seed Vigor and Vigor Tests).
- [11] <http://www.astecglobal.net/> (strona firmy Astec Global Seed Technology).
- [12] Jalink H., Frandas A., van der Schoor R., Bino J.B. 1998. Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. *Scientia Agricola*, Piracicaba 55 (Número Especial): 88–93.
- [13] Jalink H., Frandas A., van der Schoor R., van Pijen J.G., Bino R.J. 1998. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Science Research* 8: 437–443.
- [14] Kępczyńska E., Piękna-Grochala J., Kępczyński J. 2003. Effects of matricconditioning on onion seed germination, seedling emergence and associated physical and metabolic events. *Plant Growth Regulation* 41: 269–278.
- [15] Kolasieńska K. 2003. Co to jest wigor nasion? Różnice i podobieństwa pomiędzy wigorem, a zdolnością kiełkowania nasion. Materiały szkoleniowe IHiAR ZNiN.
- [16] Marcos-Filho J. 1998. New approaches to seed vigor testing. *Scientia Agricola*, Piracicaba 55 (Número Especial): 27–33.
- [17] McDonald M.B. Standardization of seed vigor tests (http://www.fauf.puc.cl/biblioteca/articulos_seminario_semillas/articulo21.pdf).
- [18] Oakley K., Kester S.T., Geneve R.L. 2004. Computer-aided digital image analysis of seedling size and growth rate for assessing seed vigour in impatiens. *Seed Science and Technology* 32: 907–915.
- [19] Orzeszko-Rywka A., Rochalska M. 2004. Przewodnik do ćwiczeń z nasiennictwa. Wyd. SGGW, Warszawa.
- [20] Peñaloza P., Ramirez-Rosales G., McDonald M.B., Bennet M.A. 2005. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(3): 299–307. (<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/4/index.html>)
- [21] Rodo A.B., Marcos-Filho J. 2003. Accelerated aging and controlled deterioration for the determination of the physiological potential of onion seeds. *Scientia Agricola* 60(3): 465–469.
- [22] Sako Y., McDonald M.B., Fujimura K., Evans A.F., Bennett M.A. 2001. A system for automated seed vigour assessment. *Seed Science and Technology* 29(3): 625–636.
- [23] Siriwitayawan G., Downie A.B., Geneve R.L. 2003. Ethylene evolution is positively correlated with seed vigor in sweet corn and tomato seed lots with differing vigor levels but similar germination capacity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128(4): 608–614.
- [24] Śliwińska E., Jing H.C., Job C., Job D., Bergervoet J.H.W., Bino R.J., Groot S.P.C. 1999. Effect of harvest time and soaking treatment on cell cycle activity in sugar-beet seeds. *Seed Science Research* 9: 91–99.

- [25] Śliwińska E., Pedersen H.C. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear replication stages during germination of sugar-beet seeds different in vigour. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy* 2(1). (<http://www.ejpau.media.pl/series/volume2/issue1/agronomy/art-01.html>)
- [26] Vieira R.D., Scappa Neto A., Bittencourt S.R.M., Panobianco M. 2004. Electrical conductivity of the seed soaking solution and soybean seedling emergence. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.) 61(2): 164–168.
- [27] Wang Y.R., Yu L., Nan Z.B., Liu Y. L. 2004. Vigor tests used to rank seed lot quality and predict field emergence in four forage species. *Crop Science* 44: 535–541.
- [28] Webb M. 2005. The Hiltner Test/ Brick Grit Test. *Germination* 9(3): 26.

Traditional and modern methods of seed vigour testing

Keywords: seed vigour, seed vigour tests, seed quality

Summary

Germination capacity is a generally accepted and widely used criterion of seed quality estimation. Yet seed vigour testing provides broader and more accurate information on its quality. Presented paper concentrates on a description of vigour tests; both these, which have already reached an acceptance and those, which have not been widely used yet. In the first group there are tests listed by ISTA, described further in this paper. The other group includes the following methods: saturated salt accelerated ageing test (SSAA), potassium leakage test, chlorophyll fluorescence, ethanol test, Q2 test, enzyme activity measurements, digital image analysis, ethylene evolution assessment and methods using flow cytometry.

Koncentrat białka ziemniaczanego w żywieniu zwierząt monogastrycznych*

Barbara Pastuszewska, Marcin Taciak, Anna Tuśnio
*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego,
ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna
e-mail: a.tusnio@ifzz.pan.pl*

Słowa kluczowe: białko, aminokwasy, inhibitory proteaz, glikoalkaloidy,
świnie, kurczęta

Wstęp

Wycofanie z żywienia zwierząt gospodarskich mączek pochodzenia zwierzęcego spowodowało znaczny wzrost zapotrzebowania na roślinne pasze białkowe. Najważniejszą taką paszą jest śruta sojowa, a w Polsce i w innych krajach uprawiających rzepak dodatkowo, choć w mniejszym stopniu, poekstrakcyjna śruta rzepakowa. Mimo wysokiej wartości odżywczej białka obu tych pasz, ich zastosowanie w żywieniu niektórych zwierząt jest ograniczone ze względu na działania uboczne, takie jak działanie alergizujące soi u cieląt i prosiąt, lub własności goitrogenne śruty rzepakowej. Nic więc dziwnego, że przemysł paszowy jest zainteresowany wykorzystaniem wszystkich roślinnych produktów ubocznych przemysłu spożywczego i rolnego, charakteryzujących się dużą koncentracją i wysoką wartością odżywczą białka. Do takich produktów zalicza się koncentrat białka ziemniaczanego.

Produkcja białka ziemniaczanego nie jest duża i koncentruje się w krajach uprawiających ziemniaki na cele przemysłowe – w Europie głównie w Holandii, Niemczech, Polsce i Czechach, natomiast informacje o wartości odżywczej tego białka są rozproszone i niekompletne. Celem artykułu jest omówienie badań nad jego składem, wartością odżywczą i związkami, wywierającymi różne działania na organizm zwierzęcy.

* Opracowanie wykonano w ramach grantu Nr 2 P06Z 018 30.

Wielkość produkcji i technologia pozyskiwania koncentratu białka ziemniaczanego

Koncentrat białka ziemniaczanego jest pozyskiwany z wody sokowej stanowiącej produkt odpadowy przy produkcji skrobi. Produkcja koncentratu nie jest ujęta w statystykach Instytutu Ekonomiki Rolnej, a jej potencjalną wielkość można oszacować na podstawie przerobu ziemniaków skrobiowych. Rynek skrobi w Unii Europejskiej jest rynkiem regulowanym. Roczny limit produkcji skrobi dla Polski wynosi 145 tys. ton i nie w każdym roku jest osiągnięty. Do wyprodukowania takiej ilości skrobi zużywa się 650 do 800 tys. ton ziemniaków skrobiowych [9]. Przy założeniu, że cała ilość wody sokowej powstającej przy produkcji skrobi jest poddana częściowemu odbiałczeniu oraz, że przy obecnej technologii odzyskiwane białko stanowi 1% masy przerabianych ziemniaków [3] daje to potencjalną ilość 6,5 do 8 tys. ton białka, co odpowiada 8–10 tys. ton koncentratu o zawartości 80% białka ogólnego. Jest to wprawdzie pozycja niewielka, ale stanowiąca około połowy ilości produkowanej w Polsce mączki rybnej i mięsnej, która według danych Instytutu Ekonomiki Rolnej wynosiła w 2006 r. 18 tys. ton przy wyraźnie niższej zawartości białka.

Z prognoz dotyczących rozwoju przetwórstwa ziemniaczanego można sądzić, że w najbliższych latach ilość wytwarzanego białka będzie się zwiększała. Wynika to z jednej strony z poprawy rentowności przemysłu skrobiowego i zwiększenia jego możliwości inwestycyjnych, jak też z zaostrzających się wymogów dotyczących ochrony środowiska. Wody sokowe powstające przy produkcji skrobi zawierają do 2,5% białka [42] i ich wylewanie na glebę stanowi zagrożenie dla środowiska naturalnego ze względu na duże zapotrzebowanie tlenu. Usunięcie nawet części białka z wody sokowej powoduje znaczne zmniejszenie uciążliwości przemysłu krochmalniczego dla środowiska [29]. Dlatego inwestycje w przemyśle ziemniaczanym mają być skierowane m.in. na unowocześnienie zagospodarowania odpadów i ścieków [18], co w konsekwencji powinno spowodować zwiększenie liczby krochmalni produkujących koncentrat. W obrocie znajduje się także koncentrat importowany.

Wydzielanie białek z wody sokowej pozostałej po produkcji skrobi można prowadzić metodami polegającymi na ich koagulacji termicznej lub kwasowej, tworzeniu kompleksów z karboksymetylocelulozą lub bentonitem, bądź ultrafiltracji; możliwe jest także rozdzielanie suchych frakcji ziemniaka [31]. Na skalę przemysłową stosowana jest metoda koagulacji termicznej białka, w dużych zakładach poprzedzona wstępną koncentracją poprzez odwróconą osmozę [42]. W przemyśle skrobiowym w Polsce stosuje się metodę termicznej koagulacji białka po obniżeniu pH, a następnie dekantację i suszenie koncentratu.

W procesie tym do koncentratu przechodzą nie tylko białka i niewielkie ilości innych składników odżywczych, ale również składniki niepożądane, jak glikoalkaloidy, które w trakcie przerobu ulegają zagęszczeniu i adsorpcji przez białko.

Metody wydzielania i koncentracji białka, a zwłaszcza stopień zakwaszenia, czas i temperatura ogrzewania, siła jonowa i potencjał oksydoredukcyjny środowiska

reakcji, mają wpływ na właściwości i wartość odżywczą białka. Szczególnie dużo badań poświęcono wpływowi sposobu pozyskiwania i dalszego postępowania z koncentratem na jego właściwości funkcjonalne, jak wodochłonność, rozpuszczalność, olejochłonność, emulsyjność i pienistość, istotne w przemyśle spożywczym [29, 31]. Według większości autorów, termiczna metoda wytrącania białka prowadzi do jego denaturacji i zmniejszenia rozpuszczalności, a w konsekwencji do pogorszenia właściwości funkcjonalnych.

Wpływ technologii na wartość odżywczą białka ziemniaczanego i zawartość substancji antyodżywczych uwzględniano jedynie w nielicznych pracach. W badaniach Wojnowskiej i in. [40] sposób wydzielania białka w warunkach laboratoryjnych (ultrafiltracja, koagulacja za pomocą elektrolitów i koncentracja przez wymrażanie) nie wpłynęła na zawartość glikoalkaloidów natomiast różnicował koncentrację inhibitorów proteaz, która była 2,5-krotnie mniejsza w preparacie uzyskanym metodą ultrafiltracji niż w dwóch pozostałych. Ogrzewanie wszystkich trzech preparatów w temp. 100°C przez 15 min spowodowało znaczne zmniejszenie zawartości aminokwasów niezbędnych (w przeliczeniu na 16 g N) oraz zmniejszenie aktywności inhibitorów proteaz o ponad 40%, glikoalkaloidów zaś aż o ponad 80% zawartości początkowej (przed ogrzewaniem). Autorzy ci podkreślają potencjalnie wysoką wartość odżywczą białka ziemniaczanego jako źródła aminokwasów i zwracają uwagę na znaczenie ogrzewania jako procesu zmniejszającego wprawdzie zawartość związków niekorzystnych dla organizmu, lecz jednocześnie obniżającego wartość odżywczą białka w wyniku zmniejszenia zawartości aminokwasów, nie omawiają jednak ewentualnych przyczyn znacznego – i trudnego do interpretacji – ubytku aminokwasów w białku koncentratów ogrzewanych w porównaniu z nieogrzewanymi. Natomiast Kralova i in. [20] nie stwierdzili wpływu procesów technologicznych (koagulacja termiczna w niskim pH, suszenie metodą rozpyłową lub bębnową) na skład aminokwasowy, strawność i wartość biologiczną białka oraz na aktywność inhibitora trypsyny.

Do znaczących osiągnięć w zakresie technologii produkcji koncentratu należy niemal całkowite usunięcie glikoalkaloidów solanidyny dzięki wprowadzeniu dodatkowego etapu oczyszczania (acid-refining step). Wyprodukowany w ten sposób koncentrat Protastar AVEBE zawiera śladowe ilości tych związków dzięki czemu jest on lepiej wykorzystywany w żywieniu prosiąt [17] i ryb [32] niż koncentrat o normalnej zawartości tych związków.

Charakterystyka i wartość odżywcza białka ziemniaków i koncentratu

Białko ziemniaka składa się z wielu frakcji różniących się pod względem ciężaru molekularnego i właściwości strukturalnych, fizykochemicznych i biologicznych. Postęp w dziedzinie elektroforezy i chromatografii pozwolił na poszerzenie wiedzy o ich strukturze, funkcjach i właściwościach oraz na ich sklasyfikowanie [29]. Ze względu na zakres niniejszego opracowania ograniczymy się do ich ogólnego omówienia.

Okolo 75–80% białek ziemniaka stanowią rozpuszczalne białka globularne. Głównym rozpuszczalnym białkiem ziemniaka jest tuberyna, zwana obecnie patatyną. Jest to białko charakterystyczne tylko dla ziemniaka, o masie cząsteczkowej okolo 44 000, występujące często w formie dimerów i stanowiące rodzinę (grupę) białek o charakterze glikoprotein. Patatyna jest głównie białkiem zapasowym, ale w stanie natywnym (niezdenaturowanym) wykazuje właściwości funkcjonalne i aktywność enzymatyczną, a mianowicie aktywność acylohydrolazy i esterazy w stosunku do różnych związków lipidowych, a także aktywność beta-1,3-glukanazy. Dzięki tej aktywności białko to jest uważane za element mechanizmu obronnego rośliny przed patogenami. Patatyna ma także działanie alergizujące, które maleje pod wpływem ogrzewania [34].

Drugą grupę białek ziemniaka stanowią białka o masie cząsteczkowej od 5 000 do 25 000. W jej skład wchodzi inhibitory enzymów proteolitycznych. Dzięki różnicom występującym w budowie i właściwościach białka inhibitorów, są one stosowane jako podstawa identyfikacji i klasyfikacji nowych odmian ziemniaka.

W pracy Pęksy [29] została wyróżniona także grupa białek oraz agregaty o znacznie większym ciężarze molekularnym.

Oprócz białek wchodzących w skład tzw. białka właściwego, w ziemniakach występują związki azotowe niebiałkowe, jak wolne aminokwasy, azotany i azotyny, metabolity. W bulwach azot tych związków może stanowić nawet 50% ogólnej zawartości azotu [23], a ich ilość zależy w dużym stopniu od czynników zewnętrznych, przede wszystkim od nawożenia azotowego. Nie wiadomo czy i w jakim stopniu związki te ulegają wytrąceniu i przechodzą do koncentratu białkowego. W koncentracie ocenianym przez Taciaka [37] azot aminokwasów stanowił 87,5% azotu ogólnego koncentratu, co oznacza, że 12,5% pochodziło ze związków niebiałkowych.

Zawartość białka ogólnego (N x 6,25) w koncentracie wynosi okolo 80% s.m. Oprócz białka koncentrat zawiera 2,5–3% popiołu, śladowe ilości włókna surowego i ekstraktu eterowego. Związki bezazotowe wyciągowe stanowią do 15% s.m., z czego okolo połowę (7–8% s.m.) stanowi skrobia.

Głównymi czynnikami decydującymi o wartości odżywczej białka, zarówno dla ludzi jak i zwierząt monogastrycznych, jest jego skład aminokwasowy, a zwłaszcza zawartość i proporcje aminokwasów niezbędnych, a także przyswajalność białka i aminokwasów. Skład aminokwasowy białka koncentratu, wyrażony w g na 16 g N czyli na 100 g białka ogólnego, różni się od składu białka ziemniaków. W tabeli 1 porównano skład białka soku surowych ziemniaków użytego w badaniach przez Wojnowską i in. [40], całych ziemniaków selekcionowanych w kierunku wyższej zawartości białka (dwie serie obejmujące po 6 rodów, różniących się zawartością białka ogólnego, wg Pastuszewskiej i in. [28]), oraz koncentratów białka ziemniaczanego według różnych autorów. Na podkreślenie zasługuje niewielkie, lecz wyraźne zwiększenie koncentracji poszczególnych aminokwasów niezbędnych i ich sumy w białku ziemniaków o wyższej zawartości białka ogólnego w suchej masie, co

Tabela 1. Zawartość aminokwasów niezbędnych w białku ziemniaków i białku koncentratu [$\text{g} \cdot 16 \text{ g}^{-1} \text{ N}$] (według różnych autorów)

Aminokwas	Ziemniaki			Koncentrat		
	sok ziemn. ¹	rody LP ²	rody HP ³	A ⁴	B ⁵	Degussa 2001 ⁶
Lizyna	5,28	5,52	5,85	7,39	7,51	7,64
Treonina	3,84	3,72	4,10	5,77	5,70	5,60
Tryptofan	nd	1,38	1,52	1,45	nd	1,40
Metionina	1,71	1,63	1,60	2,24	2,18	2,20
Cystyna	1,29	1,63	1,78	1,45	1,57	1,46
Fenylalanina	3,96	3,98	4,73	6,79	6,40	6,44
Tyrozyna	4,44	2,83	2,15	6,03	5,62	5,62
Walina	6,59	4,12	4,92	6,97	6,57	6,57
Izoleucyna	5,89	3,38	3,83	5,82	5,70	5,60
Leucyna	5,50	6,32	7,22	10,45	9,79	10,07
Histydyna	1,76	1,70	1,77	2,09	2,19	2,28
ΣEAA^7	40,26 ⁸	36,21	39,47	56,45	53,23 ⁸	54,88
N x 6,25, %s.m.		8,03	9,87	83,20	87,00	

¹ Według Wojnowskiej i in. [40], ² i ³ rody o niższej (LP, n = 6) i wyższej (HP, n = 6) zawartości białka ogólnego (Pastuszevska i in. [28]), ⁴ przemysłowy koncentrat produkcji polskiej (Taciak, [37]), ⁵ koncentrat ProTastar, AVEBE (Refstie i Tiekstra [32]), ⁶ tabele składu aminokwasowego pasz (Degussa [8]), ⁷ suma aminokwasów niezbędnych, ⁸ suma aminokwasów niezbędnych z wyjątkiem tryptofanu.

wskazuje na różnice związane z genotypem ziemniaków. Zawartość poszczególnych aminokwasów w soku ziemniaczanym i w białku ziemniaków jest bardzo zbliżona z wyjątkiem nieco wyższej zawartości tyrozyny, waliny i izoleucyny w soku; podobna jest także całkowita zawartość (suma) aminokwasów niezbędnych w białku obu produktów. Natomiast białko ogólne koncentratu zawiera znacznie więcej aminokwasów niezbędnych niż białko ziemniaka ponieważ suma tych aminokwasów wynosi około 55 g, podczas gdy w ziemniakach zaledwie 36 i 39 $\text{g} \cdot 16 \text{ g}^{-1} \text{ N}$. Według Nestares i in. [27] białko koncentratu zawierające około 50 g aminokwasów niezbędnych charakteryzuje się umiarkowanie dobrą wartością odżywczą.

Jak wynika z tabeli 1, wzrost zawartości poszczególnych aminokwasów w białku koncentratu w porównaniu z białkiem bulw nie jest równomierny i waha od zera w przypadku cystyny i tryptofanu do około 30–60% dla większości pozostałych aminokwasów i aż do przeszło 100% w przypadku tyrozyny. Można stąd wyciągnąć wniosek, że pod względem składu aminokwasowego białko koncentratu nie jest białkiem ziemniaka „zagęszczonym” jedynie w wyniku usunięcia rozpuszczalnych związków niebiałkowych, lecz różni się od niego jakościowo. Różnice w składzie aminokwasowym obu białek świadczą o tym, że w warunkach stosowanych przy produkcji koncentratu wytrąceniu z soku ulegają frakcje białek o składzie aminokwasowym różnym i korzystniejszym pod względem żywieniowym, niż białko całych ziemniaków. Może to także oznaczać, że dalsze zwiększanie stopnia odbiałczania wody sokowej i poprawa wydajności produkcji koncentratu spowoduje pogorszenie jakości jego białka.

Z powyższych danych można wyciągnąć wniosek, że pod względem zawartości aminokwasów niezbędnych, a zwłaszcza aminokwasów najczęściej ograniczających wartość odżywczą białek roślinnych tj. lizyny, treoniny i metioniny, białko koncentratu ma wyższą wartość niż białko ziemniaka, wobec czego wyniki badań prowadzonych nad wartością białka bulw nie mogą być uogólniane na wartość białka koncentratu. Białko ziemniaków uważane jest za wysoko wartościowe. Według Markakisa [23] wartość jego wynosi teoretycznie około 70% wartości odżywczej białka jaja i jest ograniczone przez niedobór aminokwasów siarkowych.

Oprócz składu aminokwasowego, o wykorzystaniu białka i aminokwasów przez zwierzęta monogastryczne decyduje podatność białka na trawienie enzymatyczne w jelicie cienkim, czyli tzw. strawność jelitowa (ileal digestibility). Strawność jelitowa jest obecnie podstawą wartościowania białka pasz i bilansowania aminokwasów w żywieniu świń; bywa także stosowana w żywieniu drobiu.

Na stopień enzymatycznego trawienia białka ma wpływ jego struktura drugo- i trzeciorzędowa, powiązania z innymi składnikami paszy, głównie z węglowodanami strukturalnymi, a także obecność związków działających hamująco na aktywność enzymów proteolitycznych (inhibitory proteaz, taniny). Warunki procesów technologicznych, jakim poddawane są pasze białkowe, a zwłaszcza temperatura i czas ogrzewania, ciśnienie oraz pH, mogą w pewnym zakresie zwiększać, ale także w znaczącym stopniu zmniejszać przyswajalność białka i poszczególnych aminokwasów. Zagadnienia te były przedmiotem szerokich badań w odniesieniu do śrut poekstrakcyjnych oraz nasion roślin strączkowych, brak jest natomiast informacji o wpływie kolejnych etapów (zakwaszanie, wytrącanie termiczne, suszenie) i warunków procesu produkcji koncentratu białka ziemniaczanego na przyswajalność białka i aminokwasów.

Z nielicznych danych przedstawionych w tabeli 2 wynika, że strawność tego białka w całym przewodzie pokarmowym jest niższa niż kazeiny; badania Taciaka [37] na szczurach wskazują, że także jego strawność w jelicie cienkim jest znacznie niższa nie tylko od strawności kazeiny, lecz także białka śruty sojowej. W badaniach prowadzonych przez Moritę i in. [26] białko koncentratu ziemniaczanego było stosowane jako model białka opornego (tzw. resistant), tj. źle trawionego w jelicie cienkim. Natomiast wartości podane przez Rademacher i in. [30] i oznaczone przez Tuśnio (dane niepublikowane) dla świń różnią się wprawdzie znacznie między sobą, lecz nie wskazują na niższą strawność jelitową białka koncentratu niż innych pasz białkowych pochodzenia roślinnego. Wydaje się, że przyczyną rozbieżności w ocenie stopnia podatności białka koncentratu na trawienie enzymatyczne mogą być różnice w stopniu denaturacji białka lub inaktywacji inhibitorów proteaz, będące konsekwencją różnic w technologii produkcji koncentratu.

Nieliczne badania nad oceną białka koncentratów ziemniaczanych na zwierzętach potwierdzają jego wysoką wartość odżywczą wynikającą ze składu aminokwasowego [20, 27, 37]. Oznaczona przez Taciaka [37] wartość biologiczna białka, tj.

Tabela 2. Strawność w jelicie cienkim i całym przewodzie pokarmowym oraz wartość biologiczna (BV) białka koncentratu ziemniaczanego (PPC) i kazeiny (KAZ) według różnych autorów

Źródło	Strawność					
	w jelicie cienkim (pozorna)		w całym przewodzie (rzeczywista)		BV	
	PPC	KAZ	PPC	KAZ	PPC	KAZ
Szczury						
Nestares i in. [27]	—	—	93,3	97,0	79,5	84,1 ¹
Taciak [37]	71,3	83,3	92,3	96,9	82,2	82,3
Morita i in. [25]	—	—	92,0	96,0	—	—
Urbańczyk i in. [38]	—	—	94,5	—	58,1	—
Świnie						
Rademacher i in. [31]	89,0	—	—	—	—	—
Tuśnio (2007 dane niepublikowane)	77,0	88,2	84,5 ²	86,4 ²	—	—
Urbańczyk i in. [38]	—	—	—	88,0	—	—

¹ Kazeina uzupełniona DL-metioniną, ² strawność białka diety zbożowej uzupełnionej PPC i KAZ.

wykorzystanie białka strawionego (w całym przewodzie pokarmowym) koncentratu produkcji polskiej jest równa wartości białka kazeiny (tab. 2) i wynosi około 80% wartości białka jaja. Wartość biologiczna białka koncentratu produkcji francuskiej [27] jest nieco niższa niż koncentratu ocenianego przez Taciaka [37], co może wynikać z jego mniejszej zawartości aminokwasów niezbędnych (tab. 1). Także wartość odżywcza białka koncentratu oznaczona przez Kralovą i in. [20] była wysoka i porównywalna z wartością białka koncentratu sojowego, natomiast wartość biologiczna białka oznaczona również na szczurach przez Urbańczyka i in. [38] wynosiła zaledwie 58,1, a więc była zdecydowanie niska.

Białko ziemniaczane jest nie tylko źródłem aminokwasów, lecz wpływa także na metabolizm innych składników pokarmowych. W porównaniu z dietą kazeinową dieta zawierająca PPC powodowała u szczurów obniżenie poziomu lipidów i cholesterolu w wątrobie i cholesterolu w surowicy krwi, a także wzrost wydalania kwasów żółciowych, cholesterolu i koprostanolu w kale i to nie tylko w porównaniu ze zwierzętami otrzymującymi kazeinę, ale także białko sojowe, które ma znany efekt hypocholesterolemiczny [24]. Autorzy uważają, że mechanizm działania tych białek roślinnych jest podobny.

Czynniki antyodżywcze w koncentracie białka ziemniaczanego

Do czynników powodujących obniżenie wartości odżywczej koncentratu zalicza się przede wszystkim obecne w ziemniakach glikoalkaloidy oraz – w znacznie mniejszym stopniu – inhibitory proteaz. Ziemniaki zawierają także lektyny, mające właściwości wiązania chityny i cukrów [1]. Lektyny obecne w nasionach roślin strączkowych

są powszechnie uważane za związki antyodżywcze, brak jest jednak informacji o niekorzystnym działaniu lektyn zawartych w świeżych ziemniakach lub w koncentracie.

Inhibitory proteaz są to specyficzne białka ziemniaka, zaliczane do siedmiu rodzin [21], różniące się pod względem ciężaru cząsteczkowego, składu aminokwasowego, ruchliwości elektroforetycznej, punktu izoelektrycznego oraz termostabilności i aktywności. Różnice w budowie białek inhibitorów proteaz są wykorzystywane w hodowli ziemniaków do identyfikacji i klasyfikacji odmian [6, 29].

Inhibitory sklasyfikowane na podstawie specyficzności działania dzielą się na inhibitory trypsyny, trypsyny i chymotrypsyny oraz inhibitory o bardzo szerokim zakresie aktywności, hamujące także proteazy mikroorganizmów [6]. Związki te mają także zdolność inhibicji katepsyny D i karbopeptydazy A i B, dzięki czemu dodane np. do świeżego mięsa ryb hamują proces autolizy, rozwój mikroorganizmów i tworzenie amin biogennych [2]. Analiza sekwencji polipeptydów inhibitorów proteaz z ziemniaków poddanych stresowi wodnemu wykazała obecność dwóch inhibitorów typu Kunitza, należących do rodziny sojowych inhibitorów trypsyny [21].

Według Friedmana [14] zawartość inhibitorów proteaz w suszonych ziemniakach (odm. 'White Rose'), wynosząca w 1g 1020 jedn. trypsyny, 370 jedn. chymotrypsyny i 112 jedn. karbopeptydazy A, odpowiada około 25% aktywności inhibicyjnej soi. W koncentracie białkowym inhibitory ulegają zagęszczeniu, a na ich zawartość może w dużym stopniu wpływać technologia produkcji. Badania Wojnowskiej i in. [40] wykazały, że aktywność antytrypsynowa preparatów białkowych zależała od sposobu ich pozyskiwania w warunkach laboratoryjnych i była znacznie niższa w białkach zagęszczanych metodą ultrafiltracji niż przez wymrażanie lub wytrącanie przez elektrolity. Inhibitory ziemniaka charakteryzują się stosunkowo dużą termostabilnością [6], na co wskazują m.in. badania Wojnowskiej i in. [40], którzy stwierdzili, że ogrzewanie preparatów przez 15 min w temp. 100°C powodowało obniżenie aktywności antytrypsynowej jedynie o 43–48%.

Aktywność antytrypsynowa przemysłowego koncentratu białka ziemniaczanego produkcji polskiej, stosowanego przez Taciaka [37] w badaniach na szczurach, była niska (2,62 TIA mg · g⁻¹) i zbliżona do TIA poekstrakcyjnej śruty sojowej, jednak jego działanie w kierunku hipertrofii trzustki było silniejsze niż śruty. Lee i in. [22] stosując diety zawierające koncentrat białka ziemniaczanego i surową soję w ilościach równoważnych pod względem zawartości inhibitorów, stwierdzili, że inhibitory trypsyny i chymotrypsyny koncentratu mają podobne działanie jak inhibitory sojowe, a mianowicie powodują obniżenie tempa wzrostu zwierząt, zmniejszenie strawności białka, powiększenie masy trzustki i zmniejszenie aktywności enzymów trzustkowych w jej tkance. Oznacza to, że związki te mogą stanowić potencjalnie ważny czynnik ograniczający wartość odżywczą białka koncentratu. Brakuje jednak danych o zmienności aktywności inhibitorów w zależności od przemysłowej technologii produkcji koncentratu, a zwłaszcza od temperatury i czasu ogrzewania, o mechanizmie ich działania na zwierzęta i o dopuszczalnej zawartości w koncentracie.

Glikoalkaloidy (GA) ziemniaków są to substancje o gorzkim smaku, toksyczne w stosunku do owadów i organizmów wyższych. Ich rola fizjologiczna polega na ochronie roślin przed patogenami. Koncentracja GA w ziemniakach jest zróżnicowana i np. w łupinie jest 3 do 10 razy większa niż w miąższu bulwy, a w kielkach 50 do 100 razy większa niż w całych ziemniakach [11]. Na zawartość glikoalkaloidów w ziemniakach wpływają czynniki genetyczne i pogodowe. Podczas wegetacji podwyższenie poziomu GA może powodować zła pogoda opóźniająca dojrzewanie bulw, natomiast po zbiorze synteza ich zwiększa się pod wpływem podwyższenia temperatury i natężenia światła, a także wydłużenia czasu przechowywania [15, 33]. Na wzrost zawartości GA w łupinach wskazuje ich zielonienie w wyniku syntezy chlorofilu. Procesy te zachodzą wprawdzie niezależnie, lecz oba są aktywowane przez światło [7].

Uprawiane obecnie odmiany ziemniaków zawierają na ogół niewielkie ilości GA. Stężenie GA w świeżych ziemniakach wysokoskrobiowych uprawianych w Polsce w latach siedemdziesiątych wahało się od 17 do 119 mg · kg⁻¹ [36], w ziemniakach uprawianych obecnie u większości odmian mieści się w granicach 30–70 mg · kg⁻¹, jednak w pojedynczych odmianach bywa wyższa (dane niepublikowane). Zawartość GA w odmianach włoskich waha się od 10 do 50 mg · kg⁻¹ [10]; spotykane są także znacznie większe różnice międzyodmianowe [41]. Na przykład w koncentracie białkowym z łętów ziemniaczanych zawartość solaniny u odmiany ‘Uran’ była śladowa, u odmian ‘Merkur’ i ‘Nysa’ zaś wynosiła odpowiednio 280 i 1015 mg · kg⁻¹ [16]. Jako dopuszczalną bezpieczną zawartość glikoalkaloidów solanidynowych przyjmuje się 200 mg GA w kg świeżych nieobranych ziemniaków spożywczych, jednak obecnie uważa się, że poziom ten należy obniżyć do 60–70 mg · kg⁻¹ [35].

Jak podają Refstie i Tiekstra [32] standardowe koncentraty białka ziemniaczanego zawierają 1500–2500 mg GA · kg⁻¹, co w znacznym stopniu ogranicza ilość koncentratu, jaką można podawać zwierzętom. Podobna jest także maksymalna deklarowana zawartość solaniny w koncentracie produkcji niemieckiej, wynosząca 2000 mg · kg⁻¹. Zawartość GA w koncentracie zależy przede wszystkim od ich zawartości w bulwach po zbiorze, jednak może zwiększać się, jeżeli ziemniaki są przechowywane w niewłaściwych warunkach, powodujących ich zazielenienie lub kiełkowanie. Ewentualne obniżenie zawartości GA w koncentracie może spowodować ich niecałkowita ekstrakcja lub warunki koagulacji i wydzielania białka. Wyniki badań dotyczących termostabilności glikoalkaloidów nie są jednoznaczne. Wojnowska i in. [40] wykazali wprawdzie, że ogrzewanie preparatów białkowych przez 15 min. w temp. 100°C powoduje obniżenie zawartości GA aż o ponad 80%, jednak Bushway i Ponnampalam [5] nie stwierdzili wpływu obniżenia poziomu glikoalkaloidów pod wpływem gotowania ziemniaków, a jedynie pod wpływem ich głębokiego smażenia w temp. 170°C. Na ogół uważa się, że GA są odporne na działanie wysokiej temperatury.

Ogólna zawartość GA oznaczona metodą Bergersa [4] w trzech próbach przemysłowego koncentratu białka ziemniaczanego produkcji polskiej była znacznie niższa

niż podawana przez Refstie i Tiekstrę [32] i wynosiła 119, 221 i 677 mg · kg⁻¹ (Tuśnio, dane niepublikowane). Również w koncentracji produkcji francuskiej ocenianym przez Nestares i in. [27] zawartość solaniny była niższa i wynosiła 400 mg · kg⁻¹. Przytoczone wartości świadczą o dużej zmienności tej cechy.

Znaczne obniżenie zawartości GA w koncentracji uzyskano dzięki wprowadzeniu do procesu technologicznego dodatkowego oczyszczania (acid refining step). Wyprodukowany w ten sposób koncentrat Protastar AVEBE zawiera poniżej 100 mg GA · kg⁻¹ [32].

Pod względem chemicznym GA składają się z cukrów i aglikonów o budowie sterydowej. 95% GA ziemniaków stanowi alfa solanina i alfa chakonina, będące pochodnymi aglikonu solanidyny, a różniące się częścią węglowodanową, którą w solaninie tworzy galaktoza, glukoza i ramnoza, a w chakoninie glukoza i dwie cząsteczki ramnozy [14]. Biologiczne działanie GA zależy w dużym stopniu od węglowodanowej części związku i różni się między chakoniną i solaniną, a ponadto alkaloidy te działają synergistycznie [35]. Również sama solanidyna, która powstaje w wyniku hydrolizy GA w organizmie, wykazuje różnorodne działania toksyczne [13]. Proporcje solaniny i chakoniny w różnych odmianach, a także częściach rośliny i produktach ziemniaczanych, wahają się w pewnych granicach, w związku z czym istotne znaczenie ma określanie nie tylko łącznej zawartości GA lub jedynie zawartości solaniny, lecz oddzielnie obu alkaloidów.

Informacje o działaniu GA na organizm ludzki i zwierzęcy pochodzą przeważnie z badań nad ziemniakami. Wyczerpujący przegląd literatury dotyczącej m.in. absorpcji, przemian i toksyczności solaniny i chakoniny dla człowieka i zwierząt różnych gatunków przedstawiono w Toxicological reports on alkaloids opracowanych przez Kuipera-Goodmana i Nawrot, Zeigera i Davis (Potato Page). Na podstawie 2000 przypadków zatruc ludzi po spożyciu zielonych lub uszkodzonych ziemniaków (w tym 30 przypadków śmiertelnych), opisanych w literaturze sięgającej XIX w., ustalono, że typowymi objawami lżejszych zatruc solaniną są zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego, jak bóle, wymioty i biegunka, natomiast cięższymi zatruciom towarzyszą objawy neurologiczne, jak senność, apatia, zaburzenia wzroku i utrata przytomności, a także gorączka, szybkie lub słabe tętno, niskie ciśnienie i szybki oddech. Jako najwyższą bezpieczną dawkę dla ludzi przyjmuje się 1 mg GA · kg⁻¹ masy ciała, natomiast dawka toksyczna, wynosząca około 1,75 mg GA jest tylko niewiele niższa od dawki uznanej za potencjalnie śmiertelną, tj. 3–6 mg · kg⁻¹ masy ciała [13]. Oznaczone wartości LD₅₀ dla gryzoni są 300 do 500 razy wyższe.

W badaniach na myszach, szczurach i chomikach wykazano, że glikoalkaloidy są wchłaniane w przewodzie pokarmowym powoli, a znaczna część dawki jest wydalana w kale i moczu, częściowo w formie aglikonu solanidyny. U zwierząt, którym podawano solaninę, stwierdzano wzrost koncentracji transaminazy glutaminianowo-szczawiooctowej (SGOT) i glutaminianowo-pirogronowej (SGPT).

Według Smitha i in. [35] można wyróżnić dwa odrębne mechanizmy działania alkaloidów. Pierwszy polega na inhibicji enzymu cholinesterazy, który bierze udział w hydrolizie neuroprzekaźnika acetylocholinę, a więc w kluczowym procesie przewodzenia impulsów nerwowych przez synapsy cholinergiczne. Zaburzenie tego procesu jest prawdopodobnie przyczyną objawów ze strony układu nerwowego. Aktywność inhibicyjna obu alkaloidów jest podobna chociaż są także wzmianki o silniejszym działaniu chakoniny.

Drugi mechanizm działania GA polega na dezintegracji błon komórkowych zawierających sterole. Tym tłumaczy się uszkodzenia komórek przewodu pokarmowego, a po absorpcji GA także komórek krwi i wątroby. Pod tym względem chakonina jest bardziej aktywna niż solanina. Szybkie występowanie objawów zatrucia świadczy o pierwotnym charakterze aktywności GA w przewodzie pokarmowym.

Oprócz wywoływania ostrego zatrucia GA mogą działać w sposób podostry i chroniczny, jednak mało jest informacji o konsekwencjach ekspozycji na stężenia nie powodujące zatruc ostrych. W dostępnej literaturze brak jest także oceny wrażliwości drobiu i świń, a zwłaszcza prosiąt, na glikoalkaloidy.

Do najczęściej opisywanych niekorzystnych działań GA należy obniżenie spożycia paszy powodowane ich gorzkim smakiem. Obserwacje takie dotyczą m.in. myszy [12 za 17], prosiąt [17] i ryb [32]. Również w badaniach Taciaka (dane niepublikowane) szczury żywione dietami z udziałem koncentratu o wyższej łącznej zawartości alkaloidów ($677 \text{ mg GA} \cdot \text{kg}^{-1}$) obniżyły spożycie paszy i przyrosty masy ciała w większym stopniu niż zwierzęta otrzymujące koncentrat zawierający $119 \text{ mg GA} \cdot \text{kg}^{-1}$. U zwierząt tych obserwowano ponadto zmiany masy i morfometrii jelita cienkiego. Zmiany struktury jelita czczego obserwowano także u prosiąt (Tuśnio, dane niepublikowane).

Silne działanie toksyczne nieogrzewanych preparatów białka ziemniaczanego zawierającego ponad 3600 mg GA w kg stwierdziła Wojnowska i in. [40] w badaniach na szczurach. Podawanie diet zawierających 10% białka tych preparatów powodowało śmierć zwierząt po 8–10 dniach doświadczenia, natomiast skarmianie diet zawierających preparaty ogrzewane o zawartości GA obniżonej do około $500\text{--}600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, nie powodowało upadków. Ponieważ ogrzewanie preparatów białkowych obniżało także ich aktywność antytrypsynową, nie jest możliwe jednoznaczne stwierdzenie, że przyczyną upadków były glikoalkaloidy, mało jest jednak prawdopodobne, żeby inhibicja proteaz doprowadzała do śmierci szczurów.

Hanczakowski i Skraba [16] oznaczając wartość odżywczą białka koncentratów białkowych z łętów ziemniaczanych o zawartości solaniny zróżnicowanej od ilości śladowych do $1015 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, nie stwierdzili wpływu alkaloidu na wartość biologiczną i strawność białka. Wskaźniki te były jednak bardzo niskie mimo zbilansowanego składu aminokwasowego białka.

Przedstawione badania świadczą o dużym znaczeniu glikoalkaloidów jako czynnika obniżającego zakres stosowania koncentratu białka ziemniaczanego w żywieniu zwierząt oraz wskazują na możliwość zmniejszania zawartości tych związków przez

stosowanie odpowiednich zabiegów technologicznych. Brak jest kompleksowego opracowania obejmującego zarówno tolerancję zwierząt gospodarskich na GA w zależności od gatunku, wieku i stanu fizjologicznego, jak też wpływ technologii pozyskiwania koncentratu na zawartość tych związków. Przy interpretacji danych z literatury źródłem nieporozumień może być stosowanie przez różnych autorów określenia „solanina” jako synonimu glikoalkaloidów. Nie jest wówczas jasne, czy podane zawartości dotyczą tylko tego jednego, czy też obu alkaloidów.

Zastosowanie w żywieniu zwierząt

Badania przeprowadzone w Holandii w latach dziewięćdziesiątych nad zastosowaniem koncentratu białka ziemniaczanego w żywieniu świń wykazały, że koncentrat dodany do paszy w ilości 3–5% poprawiał wyniki użytkowości zwierząt, natomiast zwiększenie jego udziału powyżej 5% powodowało obniżenie spożycia i przyrostów. W cyklu doświadczeń na wcześnie odsadzonych prosiętach Kerr i in. [17] zastępowali część lub całość suszonej plazmy krwi, lub mączkę rybną jednym z dwóch koncentratów: konwencjonalnym o zawartości ponad 3000 mg GA w kg, w ilości 2 do 4% diety lub z koncentracją obniżoną do 156 mg · kg⁻¹, w ilości 2 do 8% diety. Z otrzymanych wyników autorzy wyciągają wniosek o możliwości zastąpienia części pasz białkowych pochodzenia zwierzęcego koncentratem o niskiej zawartości alkaloidów, nie precyzując jednak jego dopuszczalnego poziomu.

W doświadczeniu przeprowadzonym przez Urbańczyka i in. [38] na tucznikach, zastąpienie części lub całości śruty sojowej koncentratem ziemniaczanym w ilości 2, 4 i 8% w pierwszej oraz 1, 2 i 4% w drugiej fazie tuczu, nie spowodowało zmniejszenia przyrostów ani pogorszenia wykorzystania paszy i jakości tuszy świń. Autorzy wyciągają wniosek o możliwości zastąpienia koncentratem całej ilości śruty sojowej w paszy dla tuczników, jednak ze względu na ogólnie niskie przyrosty zwierząt w tym doświadczeniu, wniosek ten może nie być prawidłowy w odniesieniu do zwierząt o wysokiej użytkowości. Doświadczenie przeprowadzone przez Tuśnio (dane niepublikowane) na świnich o początkowej masie ciała 15 kg wykazało brak ujemnego wpływu uzupełnienia zboża koncentratem białka ziemniaczanego (w porównaniu z kazeiną) na przyrosty zwierząt żywionych w sposób ograniczony.

Uogólnienie wyników badań nad zastosowaniem koncentratu w żywieniu świń jest trudne ze względu na częsty brak informacji lub różnice w składzie koncentratów, różnice w składzie diet, wieku zwierząt i okresie trwania doświadczeń. Wydaje się, że produkowane obecnie koncentraty stanowią wartościowe uzupełnienie dawek dla świń rosnących i tuczników, jednak ich udział w dawkach nie powinien przekraczać 4–5%.

Koncentrat białka ziemniaczanego jest stosowany również w żywieniu drobiu, zwłaszcza młodych indyków, które do intensywnego wzrostu potrzebują pasz o wysokiej koncentracji białka (Smulikowska, inf. ustna). Doświadczenia przeprowadzone na brojlerach przez Koreleskiego i in. [19] wykazały, że zastąpienie koncen-

tratem białka ziemniaczanego 10, 25 i 50% śruty sojowej spowodowało niewielkie obniżenie przyrostów w okresie 8-tygodniowego tuczu, lecz efekt ten nie miał charakteru liniowego. Natomiast zastąpienie koncentratem całej ilości mączki rybnej spowodowało znaczne zmniejszenie przyrostów. W badaniach Wilkie i in. [39] nad czynnikami wpływającymi na zainfekowanie kurcząt *Clostridium perfringens*, białko ziemniaczane było stosowane w dietach dla kurcząt i było jedynym białkiem pochodzenia roślinnego, które oprócz białek zwierzęcych powodowało zwiększenie liczby tych bakterii w jelitach. Wyniki doświadczenia przeprowadzonego w skali laboratoryjnej na kurczętach wskazują na możliwość zwiększenia udziału koncentratu do 10% diety, natomiast udział 15% – wpływał niekorzystnie (Tuśnio, dane niepublikowane).

Ocena koncentratu białka ziemniaczanego jako składnika pasz dla ryb również wykazała znaczenie GA. Koncentrat o nieobniżonej zawartości GA okazał się paszą nieodpowiednią, ponieważ nawet w małej ilości powodował spadek pobrania paszy przez ryby, natomiast koncentrat niskoalkaloidowy (poniżej $100 \text{ mg GA} \cdot \text{kg}^{-1}$) uznany został za paszę wartościową, która włączona do diety w ilości nawet do 21% nie obniża spożycia paszy i wzrostu łososi [32].

Podsumowanie

Koncentrat białka ziemniaczanego jest produktem ubocznym przemysłu skrobiowego. Ze względu na dużą koncentrację białka (około 80%) i jego skład aminokwasowy zbliżony do białek mleka, jest cenną paszą białkową dla zwierząt rosnących o dużym zapotrzebowaniu na białko. Zastosowanie koncentratu ogranicza obecność związków antyodżywczych, jak inhibitory proteaz i glikoalkaloidy (GA) solanidynowe: solanina i chakonina. GA powodują zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego i układu nerwowego, a mechanizm ich działania polega na dezintegracji błon komórkowych oraz na inhibicji cholinesterazy i procesów przewodzenia bodźców nerwowych. Na zawartość GA w koncentracie wpływa odmiana ziemniaków, warunki wzrostu i przechowywania bulw po zbiorze, oraz technologia produkcji. Opracowano technologię produkcji koncentratu o niskiej (poniżej $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) zawartości GA. Obserwacje prowadzone na różnych gatunkach zwierząt wskazują na ujemny wpływ zwiększania ilości koncentratu na spożycie paszy i na przyrosty zwierząt. Nieliczne informacje świadczą o znacznej zmienności zawartości GA w koncentracie produkowanym w Polsce. Brak jest badań nad wpływem toksyczności chronicznej lub podostrej GA oraz nad tolerancją zwierząt domowych w zależności od gatunku i stanu fizjologicznego. W badaniach własnych, u szczurów i prosiąt żywionych koncentratem białka ziemniaczanego obserwowano zmiany w morfometrii jelita cienkiego.

Literatura

- [1] Allen A., Bolwell G., Brown D., Sidebottom C., Slabas A. 1996. Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline – containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 1285–1291.
- [2] Asknes A. 1989. Effect of proteinase inhibitors from potato on the quality of stored herring. *J. Sci. Food Agric.* 49: 225–234.
- [3] Balcerk W. 2002. Kierunki wykorzystania skrobi oraz kierunki zmian w technologiach produkcji skrobi ziemniaczanej. W: Chotkowski J. (red.) *Ekonomika i technologia produkcji ziemniaków skrobiowych*. Wyd. Wieś Jutra, Warszawa: 153–162.
- [4] Bergers W. 1980. A rapid quantitative assay for solanidine glycoalkaloids in potatoes and industrial potato protein. *Potato Res.* 23: 105–110.
- [5] Bushway R., Ponnampalam R. 1981. Alfa-chaconine and alfa-solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. *J. Agric. Food Chem.* 29: 814–817.
- [6] Chrzanowska J., Leszczyński W. 1977. Inhibitory enzymów proteolitycznych zawarte w bulwach ziemniaka w świetle literatury. *Post. Nauk Rol.* 166: 39–44.
- [7] Davis U. 1996. *Perishable Handling Newsletter* 87: 26.
- [8] Degussa: Tabele składu aminokwasowego pasz. 2001. 5 edycja.
- [9] Dzwonkowski W., Szczepaniak I., Rosiak E., Bochińska E. 2006. Popyt na ziemniaki. *Rynek ziemniaka* 30: 12–20.
- [10] Finotti E., Bertone A., Vivanti V. 2006. Balance between nutrients and anti-nutrients in nine Italian potato cultivars. *Food Chem.* 99: 698–701.
- [11] Friedman L., Dao L. 1992. Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *J. Agric. Food Chem.* 40: 419–423.
- [12] Friedman M., Lewin C. 1992. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids and hydrolysis products on acidic columns. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2157–2163.
- [13] Friedman M., Henika P., Mackey B. 2003. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food and Chem. Toxicol.* 41: 61–71.
- [14] Friedman M. 2004. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J. Chromat. A.* 1054: 143–155.
- [15] Haddadin M., Humeid M., Qaroot F., Robinson R. 2001. Effect of exposure to light on the solanine content of two varieties of potato (*Solanum tuberosum*) popular in Jordan. *Food Chem.* 73: 205–208.
- [16] Hanczakowski P., Skraba B. 1989. The effect of toxic substances present in some leaf protein concentrates on their nutritive value. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 24: 151–157.
- [17] Kerr C., Goodband R., Smith J., Musser R., Bergstrom J., Nessmish W., Tokach M., Nelssen J. 1998. Evaluation of potato proteins on the growth performance of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 3024–3033.
- [18] Kierończyk A., Smólski Z. 2002. Potencjał wytwórczy sektora skrobiowego w Polsce. W: *Ekonomika i technologia produkcji ziemniaków skrobiowych*. Red. J. Chotkowski, wyd. Wieś Jutra: 7–15.
- [19] Koreleski J., Ryś R., Krasnodębska I., Kubicz M., Ombach A. 1983. Wartość paszowa preparatu białka ziemniaczanego i jego zastosowanie jako zamiennika pasz wysoko-białkowych w żywieniu kurcząt brojlerów. *Rocz. Nauk. Zoot.* 10: 217–228.
- [20] Králová B., Šiamová J., Heger J., Frydrych Z., Veselý Z. 1982. Changes in nutritional value of potato proteins during the preparation of potato protein concentrate from tuber sap. *Food/Nahrung* 26: 789–795.
- [21] Ledoigt G., Griffaut B., Debiton E., Vian C., Mustel A., Evray G., Maurizis J.-C., Madelmont J. 2006. Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Int. J. Biol. Macromolecules* 38:268–271.
- [22] Lee S., Liener I., Desborough S. 1985. Comparative effects of feeding a protease inhibitor enriched potato protein concentrate and soy flour to rats. *Plant Food for Human Nutr.* 35: 9–19.
- [23] Markakis P. 1975. The nutritive value of potato protein. W: *Protein nutritional quality of foods and feeds*. Wyd. Friedman M., p.2: 471–487.
- [24] Morita T., Oh-hashii A., Takei T., Ikai M., Kasaoka S., Kiriyaama S. 1997. Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *J. Nutr.* 127: 470–477.
- [25] Morita T., Kasaoka S., Oh-hashii A., Ikai M., Numasaki Y., Kiriyaama S. 1998. Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylase cornstarch. *J. Nutr.* 128: 1156–1164.

- [26] Morita T., Kasaoka S., Kiriya S. 2004. Physiological functions of resistant proteins: proteins and peptides regulating large bowel fermentation of indigestible polysaccharide. *J. AOAC Int.* 87: 792–796.
- [27] Nestares T., Lopez-Jurado M., Sanz A., Lopez-Frias M. 1993. Nutritional assessment of two vegetable protein concentrates in growing rats. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1282–1286.
- [28] Pastuszewska B., Makuch M., Smulikowska S., Buraczewski S. 1978. Skład i wartość odżywcza białka bulw ziemniaków rodów selekcyjowanych w kierunku wyższej zawartości białka. *Rocz. Nauk. Rol. ser. B.* 99: 7–17.
- [29] Pęksa A. 2003. Białko ziemniaczane – charakterystyka i właściwości. *Post. Nauk Rol.* 305: 79–94.
- [30] Rademacher M., Sauer W., Jansman A. 1999. Standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. Wyd. Degussa–Hüls. The New System.
- [31] Ralet M.-C., Gueguen J. 2000. Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 33: 380–387.
- [32] Refstie S., Tiekstra H. 2003. Potato protein concentrate with low content of solanidine glycoalkaloids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 216: 283–298.
- [33] Sengul M., Keles F., Keles M. 2004. The effect of storage conditions (temperature, light, time) and variety on the glycoalkaloid content of potato tubers and sprouts. *Food Control.* 15: 281–286.
- [34] Shewry P. 2003. Tuber storage proteins. *Annals of Botany* 91: 755–769.
- [35] Smith D., Roddick J., Jones J. 1996. Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. *Trends in Food Sci. & Techn.* 7: 126–131.
- [36] Sujkowski L., Skrzeczkowski L. 1977. Zagadnienie glikoalkaloidów w hodowli ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 191: 151–155.
- [37] Taciak M. 2006. Wartość odżywcza białek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz ich wpływ na wybrane funkcje przewodu pokarmowego szczurów. Rozprawa doktorska. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt, PAN. Jabłonna
- [38] Urbańczyk J., Ryś R., Skrzyński S., Maciejewicz-Ryś J. 1983. Wartość pokarmowa koncentratu białkowego z ziemniaków dla tuczników. *Rocz. Nauk. Zoot.* 10: 161–168.
- [39] Wilkie D., Van Kessel A., White L., Laarveld B., Drew M. 2005. Dietary amino acids affect intestinal *Clostridium perfringens* populations in broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 85: 185–193.
- [40] Wojnowska I., Poznanski S., Bednarski W. 1981. Processing of potato protein concentrates and their properties. *J. Food. Sci.* 47: 167–172.
- [41] Zeiger E. 1998. Review of toxicological literature. Potato Page
- [42] Zwijneberg H., Kemperman A., Boerrigter M., Lotz M., Dijksterhuis J., Poulsen P., Koops G.-H. 2002. Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144: 331–334.

Potato protein concentrate as protein feed for monogastrics – production, nutritional value, antinutrients

Key words: potato protein, amino acids, digestibility, protease inhibitors, glycoalkaloids, pigs, chickens

Summary

Potato protein concentrate (PPC) – a by-product of starch industry, is used in small amounts in feeds for young pigs and poultry. Its production in Poland is expected to increase mainly for ecological reasons. PPC contains more essential amino acids (per 16 g N) than potato tuber protein and its amino acid composition is more favorable than that of soybean meal. Ileal protein digestibility in pigs is high but in experiments with

rats PPC was poorly digested and is regarded as a protein resistant to enzymatic digestion. Dietary level of PPC is limited by the presence of antinutrients: protease inhibitors and glycoalkaloids. The information on the content and role of protease inhibitors in PPC are scarce. Factors affecting content of glycoalkaloids – solanine and chaconine – and their toxicological, physiological and nutritional effects, are discussed.

Wpływ glinu w zakwaszonych wodach na rozród i wczesne stadia rozwojowe ryb siejowatych

Zofia Luberda-Bieńkowska

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt UWM,
ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn-Kortowo
e-mail: luberda@uwm.edu.pl*

Słowa kluczowe: ryby, zakwaszone wody, glin, rozród, wczesne stadia rozwojowe

Wstęp

Zakłócenia wodnego środowiska ekologicznego zarówno w postaci zmian jego odczynu, jak i składu hydrochemicznego nie pozostają bez wpływu na rozwój ryb. Toksyczny wpływ zakwaszenia wód na organizm ryb dodatkowo może być wzmocniony przez niektóre metale, w tym głównie glin. Pierwiastek ten jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za toksyczny wpływ kwaśnych wód na organizmy ryb słodkowodnych [24], bowiem wraz ze spadkiem wartości pH gwałtownie wzrasta rozpuszczalność glinu i stężenie jego toksycznych form w akwenach wodnych.

Glin w ekosystemach wodnych może pochodzić z różnych źródeł. Jednym z ważniejszych są odpady przemysłowe. Niektóre zjawiska pogodowe, takie jak topnienie śniegu czy duże opady deszczu, mogą również w znacznym stopniu wpływać na wzrost stężenia glinu w wodach. Pierwiastek ten w akwenach wodnych może być mobilizowany z przyległych do nich kwaśnych gleb, wilgotnych terenów, torfowisk czy bagien [10].

Toksyczność glinu jest zależna od rodzaju jego związku, pH, obecności kompleksujących ligandów, siły jonowej i temperatury [28].

Rozpuszczalne w wodzie formy glinu obejmują m.in. wolny glin (Al^{3+}), uwodniony jon $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, nieorganiczne, monomeryczne kompleksy z OH^- i F^- , delikatny koloidalny minerał Al i glin związany z rozpuszczalnymi substancjami organicznymi [32]. Do najbardziej toksycznych form glinu zalicza się wolny jon Al^{3+} oraz kationy $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ i $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. Toksyczność wymienionych kationów znacznie obniża się na skutek wiązania ich w kompleksy glinu ze związkami organicznymi (Al-Org.)

i fluorkami (Al-F) [1]. Spośród innych związków, nietoksyczne kompleksy glinu z krzemem w postaci hydroksyglinokrzemianów wpływają w znacznym stopniu na obniżenie poziomu rozpuszczalnych form tego pierwiastka. Nierozpuszczalne glinokrzemiany odgrywają ważną rolę w kontroli uwalniania glinu z gleb do środowiska wodnego [3, 8].

Problem toksyczności glinu w kwaśnych wodach stał się szczególnie aktualny w ostatnich latach w związku z rekultywacją terenów po likwidacji odkrywkowych kopalni węgla brunatnego na obszarach wschodniej Europy. W miejscach tych utworzono sztuczne jeziora z planami ich zarybienia, m.in. siejowatymi. Zbiorniki te na skutek warunków pogodowych i mobilizacji geochemicznej charakteryzują się odczynem kwaśnym i wysoką zawartością żelaza, jonów siarczanowych (SO_4^{2-}) oraz wapnia, glinu i manganu [9]. W związku z tymi faktami w ostatnim okresie prowadzono liczne badania nad wpływem zakwaszenia i składu hydrochemicznego wód na rozwój ryb. Część badań dotyczyła siejowatych, żyjących w wodach północnej Europy [5, 6, 17]. W prezentowanej pracy przedstawiono przegląd szczególnie interesujących badań z ostatnich lat, dotyczących wpływu niskiego pH wód, zsynchronizowanego z oddziaływaniem glinu i innych metali na rozród i rozwój larwalny ryb siejowatych.

Zapłodnienie

U ryb siejowatych proces zapłodnienia jest najefektywniejszy w pH obojętnym i wraz ze wzrostem kwasowości wód jest stopniowo osłabiany. Zapłodnienie ikry większości gatunków ryb kończy się niepowodzeniem w pH poniżej 4,0 [22]. Proces ten wiąże się m.in. ze zmianami destrukcyjnymi plemników. Mlecz sielawy ulega kompletnej denaturacji w pH 3,5 [29]. Keinänen i in. [17] uzyskali 100% zapłodnionych jaj siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) w pH 6,5, podczas gdy w pH 5,0 i 4,5 wartości te były niższe odpowiednio o 24% i 54%, natomiast w pH 4,0 tylko pojedyncze jaja zostały zapłodnione. Cytowani wyżej autorzy wykazali również, że w obecności glinu ($250 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$) następuje znaczne obniżenie zapłodnienia w zakresie pH 4,5–6,5. W pH 6,5 w obecności Al wartość ta maleje o połowę. Zakłócenia procesu zapłodnienia przez glin prawdopodobnie wywołane są przez wpływ tego pierwiastka na ruchliwość plemników czy aktywację jaj, bądź obu procesów jednocześnie [17].

Glin w wyższych stężeniach zakłóca reakcję korową, niezależnie od wartości pH otaczających wód. W kwaśnym środowisku pęcznienie jaj siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) po zapłodnieniu ulega znacznemu obniżeniu. Zjawisko to ulega nasileniu w obecności glinu, który obniża pobieranie wody przez jaja ryb i w ten sposób zmniejsza przestrzeń okołozółtkową oraz wpływa na ilość i skład płynu okołozółtkowego [17].

W wodzie z dużą zawartością glinu, magnezu i żelaza pobieranie wody przez jaja sielawy (*Coregonus albula*) jest znacznie niższe w $\text{pH} \leq 5,0$, niż w $\text{pH} 5,5; 7,0$ i $7,4$; przy czym przy wyższych wartościach pH zachowana jest tendencja zmniejszania się średnicy jaj wraz ze wzrostem kwasowości [5]. Mechanizm obniżenia pęcznienia zapłodnionych jaj w niskim pH i obecności Al nie jest do końca wyjaśniony. Sugeruje się [30], że wysokie stężenie jonów wodorowych i niektórych metali może interferować z egzocytozą pęcherzyków korowych i częściowo denaturować białkowe koloidy, obniżając ich osmotyczną aktywność. Ponadto uważa się również, że proces wchłaniania wody jest bardziej zależny od trójwartościowych jonów glinu (Al^{3+}), niż jednowartościowych kationów wodorowych (H^+). Zaobserwowano bowiem [7], że pęcznienie jaj łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) po zapłodnieniu jest znacznie skuteczniej hamowane w roztworze o $\text{pH} 4,6$ z wysoką zawartością jonów glinu, niż w roztworach o $\text{pH} 3,5$ bez tego pierwiastka. Jak wykazały powyższe badania stopień hamowania pęcznienia jaj jest uzależniony nie tylko od stężenia, ale także od zdolności hydratacyjnej jonu. Jony glinu charakteryzują się wysokimi właściwościami hydratacyjnymi i mogą silnie hamować procesy koloidalne, takie jak m.in. przyciąganie wody przez zjonizowane grupy makromolekuł w celu stania się rozpuszczalnymi [7].

Obserwuje się również zróżnicowanie gatunkowe dotyczące wrażliwości komórek rozrodczych na stopień zakwaszenia wód. Dla przykładu, szybkość zapłodnienia jaj siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) sukcesywnie maleje w zakresie $\text{pH} 6,5-4,0$ [17], natomiast szybkość zapłodnienia jaj łososia atlantyckiego (*Salmo salar* L.) utrzymuje się na stałym poziomie, aż do $\text{pH} 5,0$ [4]. W $\text{pH} 4,5$ u obu gatunków ryb zapłodnieniu ulega około 50% jaj [4, 17].

Rozwój zarodkowy i proces wykluca

Wysokie stężenie jonów wodorowych i glinu może wywierać wieloraki wpływ na rozwój zarodkowy ryb siejowatych. Jak wspomniano wcześniej niekompletna reakcja korowa może prowadzić do znacznego zmniejszenia średnicy komórek jajowych i w konsekwencji zmniejszenia przestrzeni okołozółtkowej [5]. Należy tu podkreślić, że glin oddziałuje niekorzystnie na formowanie przestrzeni okołozółtkowej w szerokim zakresie pH . Pełny sukces embrionalnego rozwoju ryb siejowatych jest mechanicznie niemożliwy w $\text{pH} 4,5$ ze względu na zbyt wąską przestrzeń okołozółtkową, która jest jeszcze wyraźnie zredukowana w $\text{pH} 5,0$. W $\text{pH} 5,0$ przestrzeń okołozółtkowa sielawy (*Coregonus lavaretus lavaretus*) jest tak wąska, że ruchy zarodka są utrudnione, a w $\text{pH} 4,5$ wręcz niemożliwe. Wartość $\text{pH} 5,5$ również nie jest bezpieczna dla rozwoju zarodkowego tych ryb w wodzie z niską siłą jonową zawierającą ilość wapnia, podobną do arealów wód kwaśnowrażliwych [17]. Mała przestrzeń okołozółtkowa zakłóca wzrost zarodka, w wyniku czego dochodzi do różnych deformacji tułowia [5, 17].

Konsekwencją zakłóceń reakcji korowej są również niekorzystne zmiany w składzie płynu okołożółtkowego. Kwaśne pH we wczesnym stadium embrionalnym może indukować zwiększoną przepuszczalność błony żółtkowej i w konsekwencji ubytek koloidów płynu okołożółtkowego, które pełnią funkcję buforującą i jonoregulacyjną [26]. Zakłócenia w wymianie jonowej i osmoregulacji nie pozostają bez wpływu na przeżywalność zarodków.

Skład płynu okołożółtkowego może mieć istotne znaczenie, szczególnie podczas późniejszych stadiów embrionalnych w wymianie tlenu i produktów metabolicznych poprzez płyn okołożółtkowy i chorion. Szczególnie niekorzystne dla rozwoju zarodkowego jest gromadzenie produktów wydzielniczych w płynie okołożółtkowym. Zakłócenia w ekstrakcji produktów wydzielniczych metabolizmu mogą prowadzić do osadzania się ich w płynie okołożółtkowym w postaci widocznych precypitatów. Precypitaty w płynie okołożółtkowym jaj siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) są widoczne w roztworach kwaśnych włączając pH 5,5, a w roztworach zawierających glin aż do pH 6,5. Precypitaty w zapłodnionych jajach siei skorelowane z zakłóceniami w cyrkulacji krwi, nienormalną krzywizną tułowia, spadkiem ruchliwości i wzrostem śmiertelności zarodków najintensywniej są notowane w pH 5,0 [17]. Dodatkowo niska siła jonowa wody może wzmacniać szkodliwy wpływ kwaśnego pH na regulację jonową i wydzielanie produktów metabolicznych [25].

Niskie pH wywołuje również istotne zmiany w strukturze chorionu, m.in. wakuolizację jego warstwy zewnętrznej. W wyniku tych zmian następuje zakłócenie funkcji fizjologicznych osłony jajowej, co może doprowadzić do zakłóceń chorialnej półprzepuszczalności i w konsekwencji zmian składu i funkcji płynu okołożółtkowego [18].

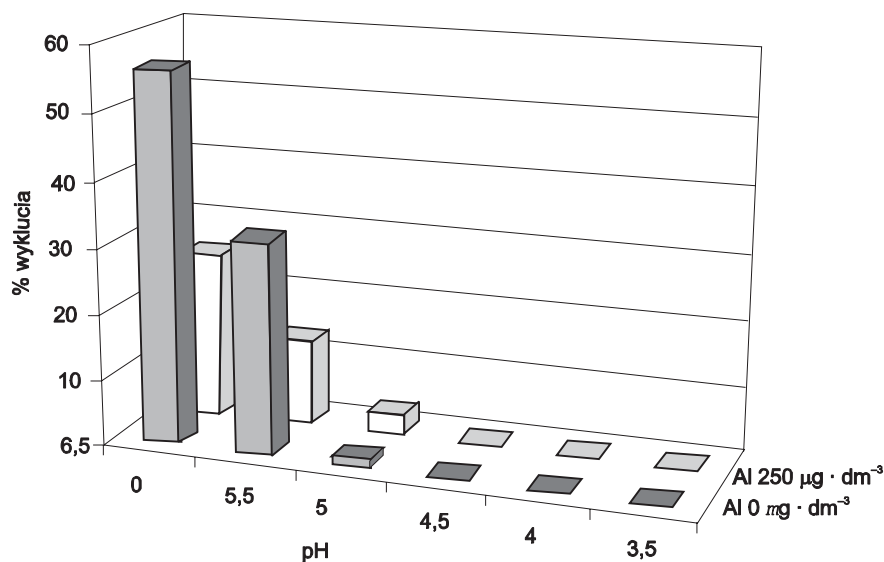
Wpływ glinu na rozwój embrionalny ryb siejowatych zależy od jego stężenia i składu hydrochemicznego wód. Badania Duisa i Oberemma [6] wykazały, że Al w niskich stężeniach ($0,1\text{--}0,2\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w kwaśnych wodach o pH 4,75 i 5,0 z zawartością $1,0\text{--}1,1\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Mn i $0,1\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Fe nie wpływa negatywnie na proces wyklucia oraz na rozwój zarodkowy i wczesnolarwalny sielawy. Dalsze badania cytowanych wyżej autorów wykazały, że po podwyższeniu zawartości Al do $2,1$ i $2,4\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w tych samych warunkach hydrochemicznych śmiertelność przed wykluciem była wysoka, a nieliczne wyklute larwy w pH 5,0 żyły bardzo krótko. Wapń w stężeniach od $111\text{--}117\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $233\text{--}236\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ nie wykazywał właściwości protekcyjnych wobec toksycznych oddziaływań Al. Tak więc zakłócający wpływ wysokich stężeń Al ($2,1\text{--}2,4\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) był większy niż protekcyjny efekt wysokich zawartości Ca.

W wodach zawierających niewielkie ilości Ca ($<4\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) nieznaczny wzrost jego zawartości prowadzi do znacznego wzrostu tolerancji na zakwaszenie [14]. Protekcyjny wpływ mają także jony Mg^{2+} , Na^+ i K^+ , lecz w mniejszym stopniu, niż jony Ca^{2+} [13]. Interesujące są również obserwacje, że Al w niskich stężeniach może łagodzić szkodliwy wpływ kwaśnego odczynu wód na rozwój zapłodnionych jaj ryb.

Dla przykładu, protekcyjny wpływ glinu na rozwój zarodkowy siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) w pH 5,0 przejawiał się mniejszą ilością zarodków z krzywizną końca ogona i w konsekwencji niższą ich śmiertelnością [17]. Mechanizm protekcyjnego działania glinu może być spowodowany tym, że w kwaśnym środowisku występuje on głównie w postaci Al^{3+} . Trójwartościowe kationy w niektórych przypadkach wchodzi w interakcję z chorionem, który jest zdolny do akumulacji wielowartościowych jonów dodatnich, co w efekcie obniża przepuszczalność tej osłony dla jonów wodorowych – H^+ [23].

Przeżywalność zarodków siejowatych zależy również w dużym stopniu od siły jonowej i podobnie jak u innych gatunków ryb rośnie wraz ze wzrostem stężenia jonów w środowisku wodnym [5, 17]. Zarodki siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) nie przeżywają w pH 5,0 w wodzie o niskiej sile jonowej [17]. Jak wspomniano wcześniej zarodki siejowatych w kwaśnych wodach w obecności wysokich stężeń glinu rozwijają się w zmniejszonej przestrzeni okołożółtkowej i otoczone są zdeformowanym chorionem. Oba te czynniki utrudniają proces wyklucia takich zarodków.

Szczegółowe badania Duisa i Oberemna [5] nad wpływem kwaśnego środowiska na wyklucie sielawy (*Coregonus albula*) wykazały, że w pH 5,0 i poniżej proces ten jest praktycznie zahamowany. Natomiast po podniesieniu pH do 5,5 i 7,0 następuje sukcesywny wzrost wyklucia. Fakt ten związany jest przede wszystkim z enzymatycznym procesem wyklucia u ryb. Enzym wyklucia (chorionaza) siejowatych, odpowiedzialny za ten proces, wykazuje maksymalną aktywność w środowisku zasadowym [19, 20]. Przy wysokich stężeniach jonów wodorowych następuje sukcesywna utrata aktywności omawianej proteiny. Wyklucie w pH 5,5 jest również



Rysunek 1. Wpływ stężenia glinu i pH na szybkość wyklucia siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*); opracowanie autora według danych Keinänen i in. [17]

opóźnione o kilka dni. Na opóźnienie wyklucia w tych warunkach ma niewątpliwie wpływ nie tylko niska aktywność proteolityczna chorionazy, ale również osłabione ruchy zarodka wewnątrz zmniejszonej przestrzeni okołozółtkowej [5].

Interesujący jest fakt, że w kwaśnych wodach (pH 5,5 i 6,5) zawierających glin ($250 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$) odsetek wyklucia zarodków siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) jest ponad połowę niższy, niż w tych samych warunkach bez Al. Natomiast w pH poniżej 5,0 larwy nie wykluwają się wcale i niewiele w pH 5,0, niezależnie od obecności w medium glinu (rys. 1).

Zakłócenia równowagi jonowej w płynie okołozółtkowym mogą również niekorzystnie wpływać na proces wyklucia, bowiem na aktywność chorionazy siejowatych w dużym stopniu wpływają jony metali [21]. Pozytywny wpływ na proces wyklucia ryb, w tym siejowatych wywierają jony wapnia [6]. W kolejnych interesujących badaniach [27] wykazano, że ekspozycja jaj troci (*Salmo trutta* L.) w środowisku kwaśnym (pH 4,5) z zawartością Ca^{2+} $20 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, niezależnie od obecności takich metali jak Cu, Pb, Zn i Al korzystnie wpływa na przeżywalność zarodków.

Rozwój larwalny

Stadia larwalne większości gatunków ryb, w tym siejowatych są bardzo wrażliwe na zakwaszenie wód i toksyczne działanie glinu. U larw siei (*Coregonus lavaretus* L.) przejawia się to spadkiem wymiany zawartości Na^+ i Cl^- w organizmie, zmniejszeniem aktywnego pływania i wzrostem śmiertelności. Czterodniowa ekspozycja larw siei w wodzie o średniej sile jonowej i pH 6,0 z zawartością $400 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glinu kończy się wysoką śmiertelnością. Wymiana jonów sodowych i chlorkowych oraz aktywność pływania tych młodocianych ryb ulega zmniejszeniu w wodzie o tym samym pH, zawierającej $200 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Al [16]. W innych badaniach [17] wykazano, że larwy siei (*Coregonus lavaretus lavaretus*) są niezdolne do życia w pH 5,0, a wysoka śmiertelność występuje również w pH 5,5. Wyklute larwy siei nie tolerują Al o stężeniu $250 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w pH 5,5.

Tolerancja na zakwaszenie wód i podwyższoną zawartość jonów glinu jest specyficzna gatunkowo. Na przykład larwy płoci (*Rutilus rutilus*) całkowicie giną po 9 dniach ekspozycji w pH 4,75, a w obecności $100 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Al już w pH 5,0, natomiast odsetek larw szczupaka (*Esox lucius*) zmniejsza się tylko o 30% po 10-dniowej ekspozycji w wodach o pH 4,0 z zawartością $600 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glinu [15]. Larwy pstrąga źródlanego (*Salvelinus fontinalis*), są również relatywnie tolerancyjne na kwaśny stres, bowiem przeżywalność ich zmniejsza się dopiero w pH 4,0–4,4 w obecności monomerycznego glinu o stężeniu $5 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [14].

Gatunkowo specyficzna wrażliwość ryb na zakwaszenie wód i toksyczność glinu powiązana jest z ilościowym ubytkiem jonów z organizmu, podczas ekspozycji

w tych warunkach. Typową odpowiedzią świeżo wyklutych larw na niskie pH i wysokie stężenie glinu jest bowiem obniżenie aktywności pływania skorelowanej ze spadkiem zawartości Na^+ i Cl^- w ich organizmach.

Ubytek wymiennalnych jonów w organizmach larw może być czułym bioindykatorem ich przeżywalności podczas ekspozycji na glin w kwaśnych wodach. Uważa się, że taką graniczną wartością jest utrata około 30% tych jonów [16]. Należy jednak zaznaczyć, że letalne limity utraty jonów dla różnych gatunków ryb są funkcją zarówno siły jonowej jak i twardości wód. Na przykład Booth i in. [2] wykazali, że utrata 4% całkowitego sodu po 2 dniach ekspozycji w kwaśnym środowisku ma skutki śmiertelne dla dorosłych osobników pstrąga źródlanego (*Salvelinus fontinalis*) w miękkiej wodzie ($\text{Ca}^{2+} - 25 \mu\text{Eq} \cdot \text{dm}^{-3}$), podczas gdy w twardej wodzie ($\text{Ca}^{2+} 400 \mu\text{Eq} \cdot \text{dm}^{-3}$) ryby te tolerują większe ubytki sodu.

Wrażliwość na zakwaszenie wód generalnie spada wraz z etapem rozwoju w następującej kolejności: świeżo zapłodnione jaja > zaoczkowana ikra > świeżo wyklute larwy = pływające larwy. Na przykład przeżywalność świeżo zapłodnionych i zaoczkowanych jaj pstrąga źródlanego (*Salvelinus fontinalis*) była obniżona w pH 5,2, podczas gdy przeżywalność larw nie spadała do pH 4,0–4,4 [14].

Wrażliwość na stężenie glinu zasadniczo wzrasta z etapem rozwoju, odpowiednio: (świeżo zapłodnione jaja = zaoczkowana ikra < świeżo wyklute larwy < pływające larwy) [14]. Wzrost toksyczności glinu obserwowany u starszych osobników może wiązać się z uszkodzeniem przez glin rozwijających się skrzel, które kumulują w znacznych ilościach ten pierwiastek [11].

Interesujące jest, że przy niskich wartościach pH glin w ograniczonych stężeniach może wpływać pozytywnie na niektóre funkcje życiowe larw ryb. Keinänen i in. [16] zaobserwowali, że w obecności niewielkich stężeń glinu w wodach o pH 4,0 śmiertelność młodych larw siei (*Coregonus lavaretus* L.) zmniejsza się, natomiast wzrasta ich aktywność pływania i zawartość jonów Na^+ i Cl^- w organizmie. Również w innych badaniach [31] odnotowano, że przeżywalność młodych larw siei (*Coregonus lavaretus pallasi*) w $\text{pH} \leq 4,25$ wzrasta w obecności niewielkich ilości glinu. Nie wykazano natomiast takich zależności u młodych larw gatunków bardziej wrażliwych na zakwaszenie, takich jak płoć (*Rutilus rutilus*), sandacz (*Stizostedion lucioperca*), a także u szczupaka (*Esox lucius*), gatunku tolerancyjnego na zakwaszenie wód. Glin w stężeniu $37\text{--}111 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ wywiera pozytywny wpływ również na wczesne stadia larwalne pstrąga źródlanego (*Salvelinus fontinalis*) w pH 4,8–5,2, co przejawia się w postaci wzrostu całkowitej zawartości jonów w organizmie i spadkiem śmiertelności [33]. Mechanizm protekcyjnego działania Al nie jest wyjaśniony.

Należy również podkreślić, że obecność metali w kwaśnym środowisku wywiera duży wpływ na skład mineralny rosnących organizmów larw ryb. Interesujące badania wpływu pierwiastków śladowych na skład mineralny larw troci (*Salmo trutta* L.) przedstawili Sayer i in. [27]. Autorzy ci wykazali, że takie metale jak Cu ($80 \text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Zn ($300 \text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Pb ($50 \text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), i Al ($6000 \text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$),

w kwaśniej, miękkiej wodzie zmniejszają zawartość Mg w organizmach larw tego gatunku. Dodatkowo Cu może obniżać całkowitą zawartość Ca, K i Na w młodych organizmach tych ryb. Cynk zmniejsza skład mineralny organizmu larwy troci w pH 5,6 i w obecności $20 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ca. Ekspozycja pływających larw troci na Al i Pb w kwaśnym pH wpływa na obniżenie całkowitej zawartości wapnia, sodu i potasu. Miedź, glin i ołów mogą uszkadzać szkieletową kalcyfikację, odwrotnie Zn może wzmacniać ten proces w rosnącym organizmie ryb.

Jony wapniowe wywierają korzystny wpływ na wszystkie stadia rozwojowe ryb z tym, że końcowy efekt tych jonów zależy od stadium rozwojowego, wartości pH i poziomu glinu [14]. Generalnie jony wapnia łagodzą stres wywołany u ryb zarówno przez zakwaszenie wód jak i glin [12]. Należy jednak zaznaczyć, że toksyczny wpływ obu tych czynników na młode organizmy ryb może być zminimalizowany, ale nie całkowicie zahamowany przez wysokie stężenie jonów wapnia.

Podsumowanie

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że toksyczny wpływ na organizmy zwierzęce w zakwaszonych wodach wywołany jest nie tylko przez wysokie stężenie jonów wodorowych, ale także przez podwyższone stężenie dobrze rozpuszczalnego glinu w kwaśnym środowisku. Dotyczy to również ryb. Populacje wielu gatunków ryb mogą być weryfikowane w zakwaszonych akwenach wodnych przez podwyższony poziom glinu. Do nich można zaliczyć również gatunki ryb siejowatych, które są wysoce wrażliwe na toksyczne oddziaływanie wysokich stężeń jonów wodorowych i glinu już w początkowych etapach swego rozwoju.

Reasumując toksyczność glinu jest jednym z najważniejszych czynników powodujących spadek liczebności ryb w kwaśnych, miękkich wodach. Ze względu na fakt, że zakłócenia wywołane przez wysokie stężenie glinu i niskie pH mogą występować na poszczególnych etapach rozrodu jak i w różnych stadiach życia ryb, można wnioskować, że populacje siejowatych pod wpływem zakwaszenia wód będą stopniowo zanikały.

Literatura

- [1] Bi S.P., An S.Q., Yang M., Chen T. 2001. Dynamics of aluminium speciation in forest – well drainage waters from the Rhode River watershed, Maryland. *Environ. Inter.* 26(5–6): 377–380.
- [2] Booth C.E., McDonald D.G., Simons B.P., Wood C.M. 1988. Effects of aluminum and low pH on net ion balance in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 45: 1563–1574.
- [3] Camilleri C., Markich S.J., Noller B.N., Turley C.J., Parker G., van Dam R.A. 2003. Silica reduces the toxicity of aluminium to a tropical freshwater fish (*Mogurnda mogurnda*). *Chemospheres* 50(3): 355–364.
- [4] Daye P.G., Glebe B.D. 1984. Fertilization success and sperm motility of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in acidified water. *Aquaculture* 43: 307–312.
- [5] Duis K., Oberemm A. 2000. Sensitivity of early life stages of vendace, *Coregonus albula*, to acid pH in postmining lakes: An experimental approach. *Environ. Toxicol.* 15: 214–224.

- [6] Duis K., Oberemm A. 2001. Aluminium and calcium – key factors determining the survival of vendace embryos and larvae in post-mining lakes? *Limnologica* 31: 3–10.
- [7] Eddy F.B., Talbot C. 1983. Formation of the perivitelline fluid in Atlantic salmon eggs (*Salmo salar*) in fresh water and solutions of metal ions. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C: 1–4.
- [8] Exley C., Schneider C., Doucet F.J. 2002. The reaction of aluminium with silicic acid on acidic solution: an important mechanism in controlling the biological availability of aluminium? *Coord. Chem. Rev.* 228(2): 127–135.
- [9] Friese K., Hupfer M., Schultze M. 1998. Chemical characteristics of water and sediment in acid mining lakes of the Lusatian lignite district. W: Geller W., Klapper H., Salomons W. (red.), Acidic mining lakes. Acid mine drainage, limnology and reclamation. Berlin: 25–45.
- [10] Guibaud G., Gauthier C. 2003. Study of aluminium concentration and speciation of surface water in four catchments in the Limousin region (France). *J. Inorg. Biochem.* 97(1): 16–25.
- [11] Havas M., Rosseland B.O. 1995. Response of zooplankton, benthos, and fish to acidification: and overview. *Water Air Soil Pollut.* 85: 52–62.
- [12] Hunn J.B. 1985. Role of calcium in gill function in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 82A: 543–547.
- [13] Hutchinson N.J., Holtze K.E., Munro J.R., Pawson T.W. 1989. Modifying effects of life stage, ionic strength and post-exposure mortality on lethality of H⁺ and Al to lake trout and brook trout. *Aquat. Toxicol.* 15: 1–26.
- [14] Ingersoll C.G., Mount D.R., Gulley D.D., La Point T.W., Bergman H.L. 1990. Effects of pH, aluminum, and calcium on survival and growth of eggs and fry of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1580–1592.
- [15] Keinänen M., Peuranen S., Nikinmaa M., Tigerstedt Ch., Vuorinen P.J. 2000. Comparison of the responses of yolk-sac fry of pike (*Esox lucius*) and roach (*Rutilus rutilus*) to low pH and aluminium: sodium influx, development and activity. *Aquat. Toxicol.* 47: 161–179.
- [16] Keinänen M., Peuranen S., Tigerstedt Ch., Vuorinen P.J. 1998. Ion regulation in whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) yolk-sac fry exposed to low pH and aluminum at low and moderate ionic strength. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40: 166–172.
- [17] Keinänen M., Tigerstedt Ch., Kälax P., Vuorinen P.J. 2003. Fertilization and embryonic development of whitefish (*Coregonus lavaretus lavaretus*) in acidic low-ionic-strength water with aluminum. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 314–329.
- [18] Kügel B., Hoffmann W., Friess A. 1990. Effects of low pH on the chorion of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *J. Fish Biol.* 37: 301–310.
- [19] Luberda-Bieńkowska Z. 1995. Właściwości enzymu wyklucia zarodków ryb głabielowatych (*Coregonidae*). *Acta Acad. Agricult. Tech. Olszt.* 42: 1–44.
- [20] Luberda Z., Strzeżek J., Łuczynski M. 1992. The influence of chosen physico-chemical factors on proteolytic activity of the hatching liquid of *Coregonus albula* and *C. lavaretus*. *Acta Biochim. Pol.* 39: 59–64.
- [21] Luberda Z., Strzeżek J., Łuczynski M. 1992. Some properties of a proteinase isolated from the hatching liquid of *Coregonus albula*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 3–4: 615–621.
- [22] Peterson R.H., Martin-Robichaud D.J. 1982. Water uptake by Atlantic salmon ova as affected by low pH. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111: 772–774.
- [23] Peterson R.H., Martin-Robichaud D.J. 1986. Perivitelline and vitelline potentials in teleost eggs as influenced by ambient ionic strength, natal salinity, and electrode electrolyte; and the influence of these potentials on cadmium dynamics within the egg. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1445–1450.
- [24] Poleo A.B.S., Østbye K., Øxnevad A., Anderson R.A., Heibo E., Vøllestad L.A. 1997. Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. *Environ. Pollut.* 96(2): 129–139.
- [25] Rahaman-Noronha E., O'Donnell M.J., Pillely C.M., Wright P.A. 1996. Extraction and distribution of ammonia and the influence of boundary layer acidification in embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 199: 2713–2723.
- [26] Rombough P.J., Jensen J.O.T. 1985. Reduced water uptake and resistance to deformation in acid-exposed eggs of steelhead *Salmo gairdneri*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114: 571–576.
- [27] Sayer M.D.J., Reader J. P., Morris R. 1991. Embryonic and larval development of brown trout, *Salmo trutta* L.: exposure to aluminium, copper, lead or zinc in soft, acid water. *J. Fish Biol.* 38: 431–455.
- [28] Sharma Ch.M. 2003. Effects off exposure to aluminium on fish in acidic waters. A term paper submitted to the Department of Ecology and Natural Resource Management (INA). Agricultural University of Norway: 1–17.

- [29] St-Pierre M., Moreau G. 1987. Résistance et viabilité des gamètes d'Omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, à différents pH. *Hydrobiologia* 153: 139–148.
- [30] von Westernhagen H. 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. W: Hoar W.S., Randall D.J. (red.), *Fish Physiology*, Vol. 11, *The Physiology of Developing Fish, Part A, Eggs and Larvae*. Academic Press, London: 253–346.
- [31] Vourinen M., Vourinen P.J., Hoikka J., Peuranen S. 1993. Lethal and sublethal threshold values of aluminium and acidity to pike (*Esox lucius*), whitefish (*Coregonus lavaretus pallasii*), pike perch (*Stizostedion lucioperca*) and roach (*Rutilus rutilus*) yolk-sac fry. *Sci. Total Environ. (Suppl. Part 2)*: 953–967.
- [32] Weng L., Temminghoff E.J.M., Van Riemsdijk W. 2002. Aluminium speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modelling using NICA-Donnan. *Water Res.* 36(17): 4215–4226.
- [33] Wood C.M., Mc Donald D.G., Ingresoll C.G., Mount D.R., Johansson O.E., Landsberger S., Bergman H.L. 1990. Whole body ions of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) alevins: Responses of yolk-sac and swim-up stages to water acidity, calcium, and aluminum, and recovery effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1604–1615.

Effect of aluminium in acidified water on reproduction and early life stages of coregonid fishes

Keywords: fish, acidified water, aluminium, reproduction, early life stage

Summary

Water acidification and high aluminium levels are the key factors responsible for toxicity to freshwater fish species. The toxic effects of acidic water and aluminium are dependent on different life stages of the fish. The early life stages of coregonid fishes are more sensitive to high concentration of aluminium and hydrogen ions in the surface waters. Both low pH and increased aluminium levels disturbed the fertilization process and impaired cortical reaction, resulting in the reduction of the egg perivitelline space and decomposition of perivitelline fluid. Disturbance of the cortical reaction can have harmful effects on embryonic development, ion regulation and excretion of metabolic products. The combined effects of low pH and aluminium high levels might delay or inhibit the hatching process. Furthermore, newly hatched fry showed high mortality rate. The sensitivity of fish embryos and fry to acidic toxicity decreased with age in the following sequences: freshly fertilized eggs > eyed eggs > yolk-sac fry = swim-up fry. The sensitivity to aluminium toxicity generally increased with age: freshly fertilized eggs = eyed eggs < yolk-sac fry < swim-up fry. Calcium ions have a mitigating effect on low pH and aluminium toxicity to embryonic and larvae development of coregonids.

Finansowe instrumenty wspierania rozwoju rolnictwa i obszarów wiejskich w Unii Europejskiej w latach 2007–2013

Dorota Czykier-Wierzba

Katedra Finansów, Uniwersytet Gdański

ul. Armii Krajowej 101, 81-824 Sopot

e-mail: dwierzba@wzr.pl

Słowa kluczowe: Unia Europejska, budżet ogólny, rozwój obszarów wiejskich, instrumenty finansowe

Wprowadzenie

W nowej Perspektywie Finansowej na lata 2007–2013 określone zostały wydatki z budżetu ogólnego oraz środki przeznaczone na finansowanie prowadzonych w UE polityk, w tym również polityki rynkowej oraz polityki rozwoju obszarów wiejskich. W latach 2007–2013 z ogólnej kwoty środków na płatności, wynoszącej 820,8 mld euro, na politykę rynkową przeznaczony się 293,1 mld euro (tj. 35,7% ogółu wydatków budżetowych) i 88,3 mld euro na rozwój obszarów wiejskich (tj. 10,7% ogółu wydatków budżetowych), w tym 33 mld euro dla nowych krajów członkowskich [8]. Z tej ostatniej kwoty zarezerwowano 10,6 mld euro dla Bułgarii i Rumunii¹. W latach 2007–2013 największym beneficjentem środków przeznaczonych na rozwój obszarów wiejskich będzie Polska, która może wykorzystać na ten cel 13,2 mld euro, tj. około 15% ogólnej kwoty środków przeznaczonych na rozwój obszarów wiejskich². Środki te zostaną uzupełnione o wkład z budżetu krajowego w wysokości 3,6 mld euro. W sumie w latach 2007–2013 na rozwój obszarów wiejskich w Polsce zostanie wykorzystanych około 17 mld euro.

¹ W latach 2001–2005 na rozwój obszarów wiejskich przeznaczano od 4,3% do 6,0% ogółu wydatków budżetowych [1].

² Są to jednak kwoty znacznie niższe od propozycji Komisji [6].

Warto, jak sądzę, podkreślić, że po raz pierwszy w historii Unii więcej środków z budżetu ogólnego zostanie wykorzystane na finansowanie polityki strukturalnej, aniżeli rynkowej.

Określając kwoty na wymienione wyżej cele wzięto pod uwagę fakt, że w UE obszary wiejskie zajmują 90% terytorium. Zamieszkuje je około 50% ludności [10]. Rolnictwo i leśnictwo w UE są nadal największymi użytkownikami gruntów wiejskich. Wykorzystują one bowiem około 77% ogółu gruntów. Stąd sektory te wywierają decydujący wpływ na jakość terenów wiejskich i stan środowiska naturalnego.

Ocenia się jednak, że na obszarach wiejskich dochód na 1 mieszkańca jest o jedną trzecią niższy, aniżeli na pozostałych obszarach. Niższy jest również poziom wykształcenia ludności zamieszkującej te obszary oraz wskaźnik aktywności zawodowej kobiet. Słabiej rozwinięty jest sektor usług. Ponadto mniejszy odsetek gospodarstw domowych ma dostęp do szerokopasmowego internetu. W związku z tym uznano, że bez obu filarów Wspólnej Polityki Rolnej, tj. polityki rynkowej (filar I) i rozwoju obszarów wiejskich (filar II) wiele obszarów wiejskich stanęłoby w obliczu narastających problemów ekonomicznych, społecznych i środowiskowych [3].

W trakcie dyskusji nad Perspektywą Finansową na lata 2007–2013 zmienione zostały źródła finansowania polityki rynkowej i rozwoju obszarów wiejskich. Do 2007 roku pierwsza była finansowana z Sekcji Gwarancji funduszu FEOGA, rozwój obszarów wiejskich zaś z Sekcji Orientacji tego funduszu. Od 1 stycznia 2007 r. uruchomione zostały dwa nowe fundusze, tj. Europejski Fundusz Gwarancji Rolnej (EFGR) oraz Europejski Fundusz Rolny na Rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich (EFRROW) [13]. Ze środków pierwszego z tych funduszy będzie finansowana polityka rynkowa i płatności bezpośrednie, a drugiego rozwój obszarów wiejskich.

Niezależnie od wymienionych wyżej funduszy realizowane na obszarach wiejskich działania są również dofinansowywane ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (EFRR), Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS), Funduszu Spójności oraz Europejskiego Funduszu Rybołówstwa (EFR). Zarządzanie tymi funduszami oraz kontrolę ich wykorzystania powierzono Komisji Europejskiej.

Ze względu jednak na ograniczone ramy artykułu dalsze rozważania poświęcone zostaną omówieniu celów i kierunków wykorzystania środków z EFRROW, stanowiącego w latach 2007–2013 podstawowy instrument wspierania zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich w UE.

Zasady działania EFRROW w latach 2007–2013

Rada Europejska ustaliła w Göteborgu (w dniach 15 i 16 czerwca 2001) podstawowe zasady Wspólnej Polityki Rolnej, w tym polityki rynkowej i rozwoju obszarów wiejskich. Zgodnie z jej konkluzjami w latach 2007–2013 jednym z celów Wspólnej Polityki Rolnej jest zapewnienie zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich. W szerszym ujęciu rozwój zrównoważony oznacza prowadzenie polityki rozwojowej

w sposób zapewniający trwałość struktur społecznych, gospodarczych i kulturowych w długim okresie. W odniesieniu do obszarów wiejskich wiąże się on z koncepcją wielofunkcyjności, kształtowaniem warunków dla różnorodnej działalności ekonomicznej prowadzonej z poszanowaniem równowagi środowiska naturalnego, rozwojem funkcji społecznych i kulturowych, dbałością o zapewnienie mieszkańcom wsi dobrych warunków życia i pracy [15].

Realizacji zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich będą podporządkowane w latach 2007–2013 wydatki z budżetu ogólnego UE przeznaczone Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich. Fundusz ten uruchomiony został od 1 stycznia 2007 roku. Nie jest on zaliczany do funduszy strukturalnych. Ze środków tego funduszu wspierany jest, jak wspomniano, zrównoważony rozwój obszarów wiejskich na terytorium całej UE. Ponadto pomoc z tego funduszu stanowi uzupełnienie polityki wsparcia rynku i wsparcia dochodów rolników w ramach Wspólnej Polityki Rolnej, polityki spójności oraz wspólnej polityki rybołówstwa [14]. Zgodnie z zasadą komplementarności EFRROW uzupełnia działania krajowe, regionalne i lokalne, ale tylko tam, gdzie środki własne są niewystarczające.

W związku z tym Komisja i kraje członkowskie powinny zapewnić spójność pomocy z EFRROW i krajów członkowskich z działalnością, polityką i priorytetami Wspólnoty oraz całym prawodawstwem wspólnotowym. Niezależnie od tego Komisja i kraje członkowskie obowiązane są zapewnić koordynację pomiędzy pomocą pochodzącą z różnych funduszy, tj. Europejskiego Funduszu Rozwoju Rolnictwa (EFRR), Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS), Funduszu Spójności, instrumentu wsparcia wspólnotowego dla rybołówstwa oraz interwencjami Europejskiego Banku Inwestycyjnego (EBI) i innymi wspólnotowymi instrumentami finansowymi. Spójność dotyczy również środków finansowanych przez Europejski Fundusz Gwarancji Rolnej i EFRROW [14].

Pomoc udzielana z tego ostatniego funduszu powinna umożliwić osiągnięcie następujących celów polityki rozwoju obszarów wiejskich [14]:

- poprawę konkurencyjności rolnictwa i leśnictwa poprzez wspieranie restrukturyzacji, rozwoju i innowacji;
- poprawę stanu środowiska naturalnego i terenów wiejskich poprzez racjonalną gospodarkę ziemią;
- poprawę jakości życia na obszarach wiejskich oraz popierania różnicowania działalności gospodarczej.

W latach 2007–2013 wymienione wyżej cele będą realizowane w ramach następujących czterech osi:

- oś 1: poprawa konkurencyjności sektora rolnego i leśnego,
- oś 2: poprawa środowiska naturalnego i terenów wiejskich,
- oś trzecia: poprawa jakości życia na obszarach wiejskich i promowanie różnicowania gospodarki wiejskiej,
- oś czwarta: leader [3].

W ramach pierwszej osi środki z EFRROW mogą być wykorzystane w krajach członkowskich na następujące działania: restrukturyzację i modernizację sektora rolniczego, poprawę integracji produkcyjnego łańcucha rolno-spożywczego, ułatwienie innowacji i dostępu do badań i rozwoju, zachęcanie do wdrażania i rozprzestrzeniania technologii informacyjno-komunikacyjnych (ICT), wspieranie przedsiębiorczości, rozwój nowych rynków zbytu produktów rolnych i leśnych oraz poprawę wyników gospodarstw rolnych i leśnych w dziedzinie ochrony środowiska itp.

W celu ochrony i poprawy stanu zasobów naturalnych i krajobrazowych obszarów wiejskich UE środki z EFRROW przeznaczone na oś 2 powinny być wykorzystane na trzy priorytetowe obszary, tj. różnorodność biologiczną, ochronę i rozwój systemów rolnictwa i leśnictwa oraz tradycyjnych krajobrazów wiejskich o wysokich wartościach przyrodniczych, wodę i łagodzenie skutków zmian klimatycznych.

W celu realizacji priorytetów, ustalonych dla osi 2, działania podejmowane w krajach członkowskich powinny obejmować: wspieranie usług środowiskowych i sposobu gospodarowania w rolnictwie przyjaznego dla zwierząt, ochronę krajobrazu rolniczego i lasów, walkę ze zmianami klimatycznymi, utrwalenie korzystnego wpływu rolnictwa ekologicznego, popieranie działań rolno-środowiskowych, promowanie równowagi terytorialnej pomiędzy obszarami miejskimi i wiejskimi itp.

Z kolei środki z EFRROW przeznaczone na różnicowanie gospodarki wiejskiej i poprawę jakości życia na obszarach wiejskich w ramach osi 3 powinny wspierać nadrzędny priorytet, tj. tworzenie możliwości zatrudnienia i warunków rozwoju, a także przyczyniać się do zapewnienia atrakcyjności obszarów wiejskich dla przyszłych pokoleń.

Realizacja tych priorytetów będzie mogła nastąpić w wyniku podjęcia w latach 2007–2013 w krajach członkowskich takich działań jak: mobilizacja działalności gospodarczej i podniesienie wskaźnika zatrudnienia w szerszej rozumianej gospodarce wiejskiej, promowanie wchodzenia kobiet na rynek pracy, ożywienie wsi poprzez: rozwój przedsiębiorczości, infrastruktury usług lokalnych, inwestowanie w dziedzictwo kultury, rozwój mikroprzedsiębiorczości i rzemiosła, zachęcanie do wdrażania i rozprzestrzeniania ICT, innowacyjne wykorzystanie odnawialnych źródeł energii, promowanie rozwoju turystyki oraz modernizację lokalnej infrastruktury, w tym szczególnie w nowych krajach członkowskich.

Jeżeli chodzi o oś 4 to wspiera ona priorytety określone przede wszystkim dla osi 3. Celem wykorzystania środków przeznaczonych na oś 4 jest wzmocnienie kapitału społecznego na obszarach wiejskich poprzez promowanie inicjatyw oddolnych, aktywizację mieszkańców wsi na rzecz lokalnych społeczności oraz wymianę najlepszych praktyk. Realizacja wymienionych celów bazuje na budowaniu Lokalnych Grup Działania (LGD) – partnerstwo międzysektorowe. Do zadań LGD będzie należało opracowywanie lokalnych strategii rozwoju obszarów wiejskich oraz dokonywanie wyboru projektów, których realizacja przyczyni się do osiągnięcia celów określonych w tej strategii [12]. Oczekuje się, że takie oddolne podejście wzmocni

spójność podejmowanych lokalnie decyzji, podniesie jakość zarządzania i przyczyni się do wzmocnienia kapitału społecznego w społecznościach wiejskich, a także skłoni do stosowania innowacyjnych rozwiązań w zakresie rozwoju regionu.

Praktyka wykazuje, że budowa lokalnych strategii umożliwi osiągnięcie szeregu korzyści, wśród których jako najważniejsze można wymienić lepsze wykorzystanie posiadanych zasobów (ludzkich i naturalnych) oraz dostosowanie kierunków działania do potrzeb podmiotów funkcjonujących na danym obszarze [9].

W sumie w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1698/2005 zaproponowane zostały, w ramach poszczególnych osi, działania, w liczbie 37, które od 2007 roku zostaną objęte wsparciem ze środków EFRROW. Każdy kraj członkowski ma prawo wybrać z tej listy takie obszary wsparcia, które uważa za najważniejsze. W konsekwencji będzie mógł zbudować własny program rozwoju obszarów wiejskich dla całego kraju lub programy dla poszczególnych regionów na okres od 1 stycznia 2007 roku do 31 grudnia 2013 roku [14]. W przypadku Polski, w wyniku przeprowadzonych selekcji, jako priorytetowe uznano 24 działania. W związku z tym w latach 2007–2013 najwięcej środków przeznaczony się na poprawę konkurencyjności rolnictwa i leśnictwa, tj. os 1 [7].

Zasady finansowania programów z EFRROW w krajach członkowskich w latach 2007–2013

Kwota wsparcia wspólnotowego z EFRROW jej podział na poszczególne lata oraz minimalna kwota, która zostanie wykorzystana w regionach objętych celem Konwergencja, jest ustalana przez Radę na wniosek Komisji, zgodnie z Perspektywą Finansową na lata 2007–2013. Z kwoty tej 0,25% przeznaczony się dla Komisji na pomoc techniczną. Podziału kwot z EFRROW na poszczególne lata według krajów członkowskich dokonuje Komisja. Przyjęto, że pomoc z EFRROW, Europejskiego Funduszu Gwarancji Rolnej, EFRR, EFS, Funduszu Spójności, Instrumentu Sąsiedztwa, Instrumentu Pomocy Przedakcesyjnej oraz Europejskiego Funduszu Rybołówstwa nie mogą przekroczyć 4% PKB kraju członkowskiego [14].

W latach 2007–2013 dofinansowanie z EFRROW programów realizowanych w ramach poszczególnych osi będzie zróżnicowane w zależności od realizowanych priorytetów. I tak w przypadku działań realizowanych w ramach osi 1 i 3 maksymalny poziom wsparcia wyniesie 75% kwalifikowanych wydatków publicznych w regionach objętych celem 1 – konwergencja oraz 50% kwalifikowanych wydatków na pozostałych obszarach. Dla osi 2 i 4 dofinansowanie realizowanych w ich ramach działań wyniesie 80% w regionach objętych celem 1 oraz 55% na pozostałych obszarach. Minimalny poziom wsparcia wyniesie 20% kwalifikowanych wydatków publicznych.

Wkład EFRROW może zostać zwiększony do 85% dla programów realizowanych w najbardziej peryferyjnych regionach oraz mniejszych wyspach Morza Egejskiego. Jeżeli chodzi o działania realizowane w ramach pomocy technicznej podejmowanej z inicjatywy Komisji to mogą one być finansowane w 100%. Ustalono też, że działania dofinansowywane przez EFRROW nie mogą być współfinansowane z innych funduszy strukturalnych, Funduszu Spójności lub jakiegokolwiek innego instrumentu finansowego [14].

W Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1698/2005 przyjęto, że do kosztów kwalifikowanych nie można wliczać podatku VAT, z wyjątkiem podatku VAT, który nie podlega zwrotowi, odsetek od zadłużenia i zakupu ziemi kosztującej więcej niż 10% całości wydatków kwalifikowanych na dane działanie³. W rozporządzeniu tym określono także minimalny poziom środków z budżetu Unii, jaki każde państwo członkowskie powinno przeznaczyć na poszczególne osie priorytetowe. Przyjęto, że w latach 2007–2013 na oś 1 i 3 powinno zostać wykorzystanych po 10% środków, na oś 2 – 25%, na oś 4 zaś – 5% środków. W przypadku natomiast programów realizowanych we francuskich departamentach zamorskich minimalny wkład finansowy Wspólnoty dla osi 2 wyniesie 10% [14].

Środki z EFRROW, związane z realizacją programów rozwoju obszarów wiejskich, przekazuje krajom członkowskim Komisja w postaci finansowania wstępnego, płatności pośrednich oraz wyrównania końcowego (płatności salda) [13]. Łączna kwota finansowania wstępnego i płatności pośrednich może wynieść 95% udziału EFRROW w każdym programie rozwoju obszarów wiejskich.

Płatność wstępna jest przekazywana przez Komisję krajowi członkowskiemu po zatwierdzeniu programu rozwoju obszarów wiejskich. Wynosi ona 7% wkładu EFRROW w dany program. Może ona być podzielona na dwa lata budżetowe, w zależności od środków dostępnych w budżecie ogólnym UE.

Przy finansowaniu działań z tego funduszu obowiązuje zasada „n+2”. W praktyce oznacza to, że środki przydzielone na dany rok (rok „n”) muszą zostać zrealizowane i wniosek o ich zwrot musi zostać złożony w ciągu dwóch kolejnych lat (tj. do roku „n+2”). Reguła ta ma na celu zapewnienie wysokiego poziomu zgodności wydatków z planem, efektywności finansowej, a także zapewnienie bardziej równomiernego wydatkowania środków z tego funduszu [4]. Kwota przekazana z EFRROW krajowi członkowskiemu tytułem finansowania wstępnego jest rozliczana w momencie zamknięcia programu rozwoju obszarów wiejskich.

W przypadku jednak, gdy w terminie 24 miesięcy, od przekazania pierwszej raty finansowania wstępnego, nie wpłynie żadna deklaracja wydatków w ramach programu rozwoju obszarów wiejskich, dokonywany jest zwrot do Komisji całości kwoty wypłaconej krajowi członkowskiemu tytułem finansowania wstępnego.

³ W wyjątkowych i należycie uzasadnionych przypadkach może zostać ustalony wyższy odsetek dla działań dotyczących zachowania środowiska naturalnego [14].

W ramach każdego programu rozwoju obszarów wiejskich dokonywane są również, jak wspomniano, płatności pośrednie. Komisja dokonuje każdej płatności pośredniej pod warunkiem wywiązania się przez kraj członkowski z następujących obowiązków:

- przekazania Komisji sporządzonej i podpisanej przez akredytowaną agencję płatniczą deklaracji wydatków odnoszących się do programów rozwoju obszarów wiejskich dokonanych przez agencję płatniczą;
- przestrzegania całkowitej kwoty wkładu EFRROW przyznanej dla każdego z priorytetów dla całego okresu objętego danym programem;
- przekazania Komisji ostatniego rocznego sprawozdania dotyczącego wykonania danego programu rozwoju obszarów wiejskich [13].

Komisja dokonuje płatności pośredniej w terminie nieprzekraczającym 45 dni od daty rejestracji prawidłowo sporządzonej deklaracji wydatków.

Jeżeli natomiast Komisja stwierdzi na podstawie uzyskanej deklaracji wydatków, że w kraju członkowskim nie były przestrzegane warunki wydatkowania środków z EFRROW, zawarte w Rozporządzeniu Rady nr 1290/2005 art. 27, może zredukować czasowo lub zawiesić płatności pośrednie na rzecz kraju członkowskiego.

Po otrzymaniu natomiast ostatniego rocznego sprawozdania, dotyczącego wykonania programu rozwoju obszarów wiejskich, Komisja dokonuje wyrównania końcowego (płatności salda). Płatność salda następuje najpóźniej w terminie 6 miesięcy od przekazania Komisji rocznego sprawozdania. Nieprzekazanie natomiast Komisji, najpóźniej do dnia 30 czerwca 2016 roku, tego sprawozdania (wraz z dokumentami niezbędnymi dla dokonania rozliczenia rachunków z ostatniego roku realizacji programu) pociąga za sobą odebranie krajowi członkowskiemu środków, jakie miały być wypłacone z tytułu wyrównania końcowego.

Podobna sytuacja występuje również w przypadku niewykorzystania środków przyznanych na realizację płatności wstępnych lub płatności pośrednich. Jeżeli bowiem do Komisji nie wpłynie, do 31 grudnia drugiego roku następującego po roku, w którym powstało zobowiązanie budżetowe żadna deklaracja, następuje automatyczne anulowanie części zobowiązań budżetowych dotyczących programu rozwoju obszarów wiejskich. W związku z tym udział EFRROW w danym programie rozwoju obszarów wiejskich zostaje zmniejszony dla danego roku o kwotę anulowanej części zobowiązań finansowych. W takiej sytuacji kraj członkowski zobowiązany jest przedstawić Komisji skorygowany plan finansowania rozwoju obszarów wiejskich w celu podzielenia kwoty zmniejszenia między priorytety programu. W przypadku braku takiego planu Komisja dokonuje proporcjonalnego zmniejszenia kwot przyznanych dla każdego priorytetu [13].

Niezależnie od tego w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1290/2005 w art. 33 został uregulowany problem nieprawidłowości w wykorzystaniu środków z EFRROW. W przypadku stwierdzenia przez Komisję, na podstawie deklaracji wydatków, występowania nieprawidłowości, środki niesłusznie wypłacone beneficjentowi powinny

być odzyskane przez akredytowaną agencję płatniczą. Ustalono, że środki odzyskane mogą być ponownie wykorzystane przez kraj członkowski dla działań przewidzianych w tym samym programie rozwoju obszarów wiejskich.

Natomiast w przypadku, gdy kraj członkowski nie wszczął wszystkich postępowań administracyjnych lub sądowych przewidzianych ustawodawstwem krajowym lub wspólnotowym dla odzyskania środków niesłusznie wypłaconych beneficjentom Komisja może podjąć decyzję o obciążeniu kraju członkowskiego kwotami do odzyskania. Jeżeli natomiast odzyskanie kwot niesłusznie wypłaconych beneficjentom nastąpi po zamknięciu programu rozwoju obszarów wiejskich kraj członkowski zobowiązany jest zwrócić odzyskane kwoty do budżetu UE. W przypadku ich ponownego wykorzystania mogą być one przeznaczone jedynie na finansowanie wydatków z EFGR lub EFRROW.

Organizacja pomocy i kontrola wykorzystania środków z EFRROW w latach 2007–2013

Wykorzystanie w latach 2007–2013 środków z EFRROW warunkowane jest utworzeniem w krajach członkowskich instytucji zarządzającej, akredytowanej agencji płatniczej i jednostki certyfikującej [13, 14]. Instytucja zarządzająca (koordynująca) odpowiedzialna jest za zarządzanie programem oraz jego wdrażanie w sposób efektywny, skuteczny i prawidłowy. Instytucja ta czuwa także nad tym, aby podejmowane działania były zgodne z kryteriami przyjętymi dla programu rozwoju obszarów wiejskich. Jest ona także odpowiedzialna za upowszechnienie programu rozwoju obszarów wiejskich. W tym celu informuje ona potencjalnych beneficjentów, organizacje zawodowe, partnerów ekonomicznych i społecznych, organizacje pozarządowe o możliwościach uzyskania dostępu do finansowania programu i o wkładzie Wspólnoty.

Powinna ona zapewnić także, aby oceny programu były przeprowadzane w odpowiednich terminach, a wyniki przeprowadzonych ocen przedkładane odpowiednim organom krajowym i Komisji [14]. W krajach członkowskich UE płatnościami środków pomocowych pochodzących z EFRROW zajmują się agencje płatnicze. Do zadań tych agencji należy m.in.:

- przyjmowanie wniosków wraz z niezbędnymi dokumentami, rejestrowanie wniosków w systemie komputerowym;
- dokonywanie oceny formalnoprawnej zgodności wniosków z obowiązującymi wymogami;
- kwalifikowanie wniosków;
- podpisywanie umowy z beneficjentem programu, dokonywanie płatności;
- monitoring i kontrola umowy podpisanej z beneficjentem;
- prowadzenie księgowości;
- prowadzenie sprawozdawczości w terminach i formach określonych przepisami UE itp. [13].

Niezależnie od agencji płatniczej kraj członkowski zobowiązany jest, jak wspomniano, wyznaczyć jednostkę certyfikującą. Może to być podmiot prawa publicznego lub prawa prywatnego odpowiedzialny za zatwierdzanie rachunków akredytowanych agencji płatniczych w zakresie ich prawdziwości, kompletności i dokładności [13].

Warto podkreślić, że w Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1290/2005 przewidziana została możliwość przetrzucania przez poszczególne kraje części środków przyznanych im na finansowanie polityki rynkowej na finansowanie programów realizowanych w ramach rozwoju obszarów wiejskich.

Kontrolę nad prawidłowym funkcjonowaniem EFRROW sprawuje, jak wspomniano, Komisja. W związku z tym kraje członkowskie zobowiązane są, na jej żądanie, przekazać przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne, które zostały przyjęte w tych krajach w celu zastosowania aktów prawnych Wspólnoty, dotyczących instrumentów Wspólnej Polityki Rolnej, tj. EFGR i EFRROW. Niezależnie od tego kraje członkowskie zobowiązane zostały do udostępnienia Komisji informacji dotyczących stwierdzonych nieprawidłowości w zakresie wykorzystania środków pomocowych oraz informacji dotyczące podjętych działań w celu odzyskania kwot w związku z tym niesłusznie wypłaconych.

Ponadto Komisja, w ramach zarządzania finansowaniem wspólnotowym, może przeprowadzać kontrole w poszczególnych krajach członkowskich. Mają one na celu sprawdzenie m.in. zgodności praktyk administracyjnych z unormowaniami wspólnotowymi, istnienia niezbędnych dokumentów dowodowych i ich zgodności z działaniami finansowanymi ze środków EFRROW, warunków, w jakich są przeprowadzane i kontrolowane transakcje finansowane ze środków tego funduszu.

W Rozporządzeniu Rady (WE) nr 1290/2005 ustalono, że osobom upoważnionym przez Komisję do przeprowadzenia kontroli w kraju członkowskim kraj ten winien zapewnić dostęp do ksiąg i wszystkich innych dokumentów związanych z wydatkami realizowanymi z EFRROW, łącznie z informacjami sporządzonymi i przechowywanymi w postaci elektronicznej.

Przed przeprowadzeniem kontroli Komisja zawiadamia kraje członkowskie lub kraj członkowski, na terenie którego kontrola ma się odbyć, o zamiarze jej przeprowadzenia. Udział w tej kontroli mogą brać również przedstawiciele zainteresowanego kraju członkowskiego [13].

Podsumowanie

Z powyższych rozważań wynika, że EFRROW będzie w latach 2007–2013, zgodnie z obowiązującą w UE zasadą komplementarności, uzupełniał działania krajowe, regionalne i lokalne oraz wspierał priorytety Wspólnoty [14]. W związku z tym funkcjonowanie EFRROW winno być spójne i zgodne z innymi politykami oraz z całym prawodawstwem wspólnotowym.

Uwzględniając fakt, że w latach 2007–2013 finansowanie rozwoju obszarów wiejskich będzie odbywało się, jak wspomniano, obok EFRROW jeszcze ze środków kilku innych funduszy konieczne staje się w poszczególnych krajach członkowskich, w tym i w Polsce skoordynowanie na szczeblu regionalnym środków ze wszystkich źródeł tak, aby powstał logiczny i spójny program finansowania rozwoju obszarów wiejskich. Brak takiej koordynacji może, jak wykazują doświadczenia innych krajów członkowskich UE, prowadzić do dublowania realizowanych ze środków tych funduszy projektów, marnotrawstwa środków pomocowych oraz zmniejszenia efektywności wykorzystania tych środków. Może to również wywierać negatywny wpływ na poziom absorpcji tych środków.

Z punktu widzenia Polski niezmiernie istotną sprawą będzie bowiem jak najpełniejsze wykorzystanie w latach 2007–2013 przyznanych nam z budżetu ogólnego UE środków na wspieranie zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich. W latach tych Polska będzie, jak wspomniano, największym beneficjentem pomocy przyznanej krajom członkowskim na wspieranie rozwoju obszarów wiejskich. Należy podkreślić, że pełne wykorzystanie przyznanych nam środków stwarza niepowtarzalną szansę ograniczenia dystansu, w zakresie poziomu rozwoju, dzielącego polskie obszary wiejskie od obszarów wiejskich „starych” krajów UE.

Realizacja tego celu warunkowana jednak będzie likwidacją występujących w Polsce oraz w pozostałych nowych krajach członkowskich UE szeregu barier utrudniających wykorzystanie środków pomocowych, w tym szczególnie takich jak skomplikowane regulacje prawne dotyczące wdrażania unijnych programów, zbiurokratyzowane i czasochłonne procedury dotyczące wykorzystania tych środków, duża rotacja pracowników ministerstw obsługujących Narodowe Strategiczne Ramy Odniesienia na lata 2007–2013 oraz zajmujących się funduszami strukturalnymi w gminach, wysokie ceny usług doradczych itp. [2].

Nie należy bowiem oczekiwać, że po 2013 roku pomoc dla Polski z budżetu Unii na rozwój obszarów wiejskich będzie równie wysoka, jak w latach 2007–2013. Wynika to z kilku względów. Przyjęto bowiem, że w następnej perspektywie finansowej obowiązkowy udział programów dotyczących ochrony środowiska będzie znacznie wyższy, aniżeli w perspektywie na lata 2007–2013. Dyskusja o przyszłym kształcie Wspólnej Polityki Rolnej została zaplanowana na 2008 rok [11].

Od 1 stycznia 2007 roku członkami Unii zostały również dwa znacznie biedniejsze od Polski kraje, tj. Bułgaria i Rumunia. Po 2013 roku, przy istniejących uregulowaniach prawnych, to one staną się największymi beneficjentami pomocy z budżetu UE, w tym również przeznaczonej na rozwój obszarów wiejskich. Jednocześnie wszystko wskazuje na to, że w nowej perspektywie finansowej, obowiązującej po 2013 roku, uwzględnione zostaną w znacznie większym niż dotychczas stopniu postulaty płatników netto (tj. Austrii, Francji, Holandii, Niemiec, Szwecji i Wielkiej Brytanii) odnośnie dalszego obniżenia ich wpłat do budżetu ogólnego. Uwzględnienie tych postulatów będzie skutkowało zmniejszeniem kwoty dotychczasowej

pomocy udzielanej z budżetu ogólnego UE biedniejszym krajom członkowskim, w tym również dla Polski.

Biorąc pod uwagę przedstawione kierunki rozdysponowania środków z EFRROW można stwierdzić, że wykorzystanie w latach 2007–2013 środków z tego funduszu daje szansę stworzenia warunków stymulujących wzrost gospodarczy, tworzenie nowych miejsc pracy na obszarach wiejskich oraz zrównoważony rozwój tych obszarów. W sumie powinno to przyczynić się do realizacji celów założonych w odnowionej Strategii Lizbońskiej, tj. uczynienia Europy bardziej atrakcyjnym miejscem do inwestowania i pracy, promowania wiedzy i innowacji na rzecz rozwoju gospodarczego oraz tworzenia większej liczby lepszych miejsc pracy [5].

Literatura

- [1] 35 sprawozdanie finansowe Europejskiego Funduszu Orientacji i Gwarancji Rolnej (EFOGR). Sekcja Gwarancji. Rok budżetowy 2005. Komisja Wspólnot Europejskich, Bruksela dnia 20.09.2006. KOM (2006) 512, Załącznik 2.
- [2] Czykier-Wierzbę D. 2006. Finansowanie z budżetu UE polityki strukturalnej w Polsce w latach 2007–2013. *Wież i Rolnictwo* 4:
- [3] Decyzja Rady z dnia 20 lutego 2006 r. w sprawie strategicznych wytycznych Wspólnoty dla rozwoju obszarów wiejskich (okres programowania 2007–2013). Załącznik. Dz. Urz. UE L 55/20 z dnia 25.2.2006.
- [4] Kowalski A. 2004. Wymuszona reforma. *Nowe Życie Gospodarcze* 23: 15.
- [5] Nowy początek Strategii Lizbońskiej. 2005. Komisja Europejska, Luksemburg 2005. [http:// europa.eu.int/growthandjobs/index_en.htm](http://europa.eu.int/growthandjobs/index_en.htm)
- [6] Plewa J. 2006. Czas na polską debatę. *Nowe Życie Gospodarcze* 1.
- [7] Parzuchowski L. 2006. Wykorzystajmy te miliardy. *Nowe Życie Gospodarcze* 22: 22.
- [8] Porozumienie międzyinstytucjonalne pomiędzy Parlamentem Europejskim, Radą i Komisją w sprawie dyscypliny budżetowej i należytego zarządzania finansami. (Dz. Urz. UE C 139/1 14.6.2006). Załącznik I.
- [9] Program Rozwoju Obszarów wiejskich na lata 2007–2013. 2006. *Nowa Wieś Europejska* 12: 26.
- [10] Putting rural development to work for jobs and growth. 2006. Newsletter, Special Edition: 1
- [11] Rowiński J. 2006. Koncepcja rozwoju obszarów wiejskich w latach 2007–2013. Referat wygłoszony na seminarium naukowym w Pułtuskach w dniach 11–12 grudnia nt. Ekonomiczne i społeczne uwarunkowania rozwoju gospodarki żywnościowej po wstąpieniu Polski do Unii Europejskiej, maszynopis powielony: 1.
- [12] Rowiński J. 2006. Próba optymalizacji struktury Programu Operacyjnego Rozwój Obszarów wiejskich w latach 2007–2013 W: Łysoń P., Rowiński J. Program Rozwoju Obszarów Wiejskich w latach 2007–2013. IERiGŻ, Warszawa: 27.
- [13] Rozporządzenie Rady (WE) Nr 1290/2005 z dnia 21 czerwca 2005 r. w sprawie finansowania Wspólnej Polityki Rolnej. (Dz. Urz. UE L 209/1, 11.8.2005).
- [14] Rozporządzenie Rady (WE) Nr 1698/2005 z dnia 20 września 2005 w sprawie wsparcia rozwoju obszarów wiejskich przez Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich (EFRROW). (Dz. Urz. UE L/277/9 z dnia 21.10.2005).
- [15] Wigier M. 2006. Wykorzystanie funduszy strukturalnych UE. Referat wygłoszony na seminarium naukowym w Pułtuskach w dniach 11–12 grudnia nt. Ekonomiczne i społeczne uwarunkowania rozwoju gospodarki żywnościowej po wstąpieniu Polski do Unii Europejskiej, maszynopis powielony: 9.

Financial instruments supporting the development of agriculture and rural areas in the European Union within 2007–2013

Key words: European Union, general budget, the development of rural areas,
financial instruments

Summary

From 2007 to 2013 the principal instrument supporting the development of rural areas in the European Union will be The European Agricultural Fund for Rural Development. This Fund will finance measures taken by the EU Member States and aimed at improving competitiveness of agriculture and forestry, conservation and restoration of natural environment, improving quality of life in the rural areas as well as on promoting diversification of economic activity in these areas. Based on analysis results presented in the paper it can be concluded that Poland will be the biggest recipient of the aid from this Fund from 2007 to 2013. Proper utilization of funds available to Poland creates a unique opportunity to reduce the gap between the level of development of Polish rural areas and the rural areas of the „Old” Members of the European Union.