



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie

Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Aleksandra Maria Witusińska

Wpływ niklu na procesy związane ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem azotu w siewkach ogórka

The influence of nickel on processes related to
oxidative stress and nitrogen metabolism in cucumber
seedlings

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Fizjologii
i Biochemii Roślin

pod kierunkiem
dr hab. Ewy Gajewskiej, prof. UŁ

Łódź, 2023



Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej.....	11
1. Wstęp	12
1.1. Nikiel	12
1.1.1. Pobieranie, transport i translokacja niklu	13
1.1.2. Korzystny wpływ niklu na rośliny	14
1.1.3. Toksyczny wpływ niklu na rośliny	15
1.1.3.1. Wpływ niklu na wzrost, strukturę i morfologię	16
1.1.3.2 Wpływ niklu na gospodarkę mineralną	17
1.1.3.3. Wpływ niklu na fotosyntezę	17
1.2. Stres oksydacyjny	18
1.2.1. Reaktywne formy tlenu	18
1.2.2. Miejsca generowania RFT w komórce.....	21
1.2.3. Negatywne skutki działania RFT	24
1.2.3.1. Oksydacyjne uszkodzenia lipidów	24
1.2.3.2. Oksydacyjne uszkodzenia białek	30
1.2.3.3. Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych	32
1.3. System antyoksydacyjny roślin	33
1.3.1. Enzymy antyoksydacyjne.....	35
1.3.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa	35
1.3.1.2. Katalaza	36
1.3.1.3. Peroksydaza askorbinianowa.....	36
1.3.1.4. Peroksydazy klasy III	37
1.3.1.5. Peroksydaza glutationowa	38
1.3.1.6. S-transferaza glutationowa	39
1.3.2. Antyoksydanty nieenzymatyczne.....	40
1.3.2.1. Askorbinian.....	40
1.3.2.2. Glutation	41
1.3.2.3. Tokoferole.....	41
1.3.2.4. Karotenoidy	42
1.3.2.5. Związki fenolowe	43
1.4. Metabolizm azotu	44

1.4.1. Enzymy zaangażowane w metabolizm azotu w komórkach roślinnych	45
1.4.1.1. Reduktaza azotanowa	45
1.4.1.2. Reduktaza azotynowa	46
1.4.1.3. Enzymy cyklu GS-GOGAT.....	47
Syntetaza glutaminowa	47
Syntaza glutaminianowa	47
1.4.1.4. Dehydrogenaza glutaminianowa	48
1.4.1.5. Syntetaza asparaginowa.....	48
1.4.1.6. Aminotransferazy	49
Aminotransferaza alaninowa	49
Aminotransferaza asparaginianowa	49
2. Cel pracy.....	50
3. Materiał i metody.....	51
3.1. Materiał.....	51
3.2. Metody	52
3.2.1. Ocena parametrów wzrostowych	52
3.2.2. Oznaczenie zawartości niklu, magnezu, żelaza, manganu, potasu i sodu.....	52
3.2.3. Oznaczenie zawartości barwników fotosyntetycznych.....	53
3.2.4. Oznaczenie wydajności fotosyntetycznej.....	53
3.2.5. Określenie stopnia przepuszczalności błon plazmatycznych.....	54
3.2.6. Histochemiczna detekcja reaktywnych form tlenu	55
3.2.6.1. Histochemiczna detekcja nadtlenu wodoru (H_2O_2).....	55
3.2.6.2. Histochemiczna detekcja anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-)	55
3.2.7. Oznaczanie zawartości aldehydu malonowego (MDA).....	55
3.2.8. Oznaczenie profilu lipidów	56
3.2.8.1. Ekstrakcja i analiza lipidów	56
3.2.8.2. Rozdział klas fosfolipidów metodą HPLC-MS i charakterystyka cząsteczek fosfolipidów	56
3.2.8.3. Stopień nienasycenia fosfolipidów	57
3.2.8.4. Ekstrakcja i analiza oksylipin metodą LC – MS	58
3.2.9. Oznaczenie aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym	58
3.2.9.1. Przygotowanie ekstraktów enzymatycznych	58
3.2.9.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD).....	59
3.2.9.3. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)	59

3.2.9.4. Oznaczanie aktywności peroksydazy askorbinianowej (APX)	60
3.2.9.5. Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec substratów fenolowych.....	60
3.2.9.5.1. Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec guajakolu (GPOX).....	60
3.2.9.5.2 Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec syringaldazyny (SPOX).....	61
3.2.9.6. Oznaczenie aktywności S - transferazy glutationowej (GST).....	61
3.2.9.7. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px).....	62
3.2.9.8. Oznaczenie aktywności amoniakolizacji L-fenylalaniny (PAL).....	62
3.2.10. Oznaczenie stężenia białka.....	63
3.2.11. Oznaczenie stężenia fenoli całkowitych	63
3.2.12. Oznaczenie zawartości związków fenolowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.	64
3.2.12.1. Przygotowanie ekstraktów	64
3.2.12.2 Oznaczenie zawartości związków fenolowych metodą HPLC.....	64
3.2.13. Oznaczenie aktywności enzymów związanych z metabolizmem azotu	67
3.2.13.1. Przygotowanie ekstraktów enzymatycznych	67
3.2.13.2. Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej (NR)	67
3.2.13.3. Oznaczenie aktywności reduktazy azotynowej (NiR).....	68
3.2.13.4. Oznaczenie aktywności syntetazy glutaminowej (GS).....	68
3.2.13.5. Oznaczenie aktywności dehydrogenazy glutaminianowej (GDH).....	69
3.2.13.6. Oznaczenie aktywności syntazy glutaminianowej (GOGAT).....	70
3.2.13.7. Oznaczenie aktywności aminotransferazy alaninowej (AlaAT)	70
3.2.13.8. Oznaczenie aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT)	71
3.2.14. Oznaczenie ilości jonów azotanowych (NO_3^-) oraz jonów amonowych (NH_4^+)....	72
3.2.14.1. Przygotowanie homogenatów	72
3.2.14.2. Oznaczenie ilości jonów NO_3^-	72
3.2.14.3. Oznaczanie ilości jonów NH_4^+	72
3.2.15. Oznaczenie zawartości kwasu L - glutaminowego	72
3.2.16. Analiza profilu ekspresji genów dla białek NR, NiR, GS, GOGAT i GDH.....	73
3.2.16.1. Izolacja RNA	73
3.2.16.2. Pomiar stężenia i ocena czystości RNA	73
3.2.16.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	74
3.2.16.4. Reakcja RT-qPCR	74
3.2.17. Analiza statystyczna wyników	75
4. Wyniki	77

4.1. Parametry wzrostowe.....	77
4.1.1. Biomasa.....	77
4.1.2. Powierzchnia blaszki liściowej.....	78
4.2. Zawartość niklu, magnezu, żelaza, manganu, potasu i sodu	79
4.3. Zawartość barwników fotosyntetycznych.....	85
4.3.1. Zawartość chlorofilu a.....	85
4.3.2. Zawartość chlorofilu b.....	86
4.3.3. Stosunek chlorofilu a/b.....	87
4.3.4. Zawartość karotenoidów	87
4.4. Wydajność kwantowa fotoukładu II	88
4.5. Przepuszczalność błon plazmatycznych liści siewek ogórka	88
4.6. Histochemiczna detekcja anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu w liściach ogórka	89
4.7. Peroksydacja lipidów	90
4.7.1. Zawartość MDA.....	91
4.7.2. Skład fosfolipidów	92
4.7.3. Skład i poziom nienasycenia kwasów tłuszczowych fosfolipidów.....	93
4.7.4. Zawartość wczesnych produktów peroksydacji lipidów.....	95
4.8. Aktywność enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym.....	96
4.8.1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej.....	96
4.8.2. Aktywność katalazy	97
4.8.3. Aktywność peroksydazy askorbinianowej	98
4.8.4. Aktywność peroksydazy oznaczanej wobec guajakolu	99
4.8.5. Aktywność peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazyny.....	101
4.8.6. Aktywność S-transferazy glutationowej	102
4.8.7. Aktywność peroksydazy glutationowej	103
4.8.8. Aktywność amoniakolizy L-fenylalaniny	104
4.9. Analiza zawartości i profilu związków fenolowych.....	105
4.9.1. Zmiany zawartości fenoli całkowitych	105
4.9.2. Profil związków fenolowych uzyskany metodą HPLC.....	106
4.10. Aktywność enzymów związanych z metabolizmem azotu.....	112
4.10.1. Aktywność reduktazy azotanowej.....	112
4.10.2. Aktywność reduktazy azotynowej	113
4.10.3. Aktywność syntetazy glutaminowej.....	113

4.10.4. Aktywność syntazy glutaminianowej	114
4.10.5. Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej	116
4.10.5.1. Aktywność NADH-GDH.....	116
4.10.5.2. Aktywność NAD-GDH	117
4.10.6. Aktywność aminotransferazy alaninowej	118
4.10.7. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej.....	119
4.11. Zawartość jonów NO_3^-	120
4.12. Zawartość jonów NH_4^+	121
4.13. Zawartość kwasu glutaminowego.....	122
4.14. Analiza profilu ekspresji genów dla białek NR, NiR, GS, GOGAT i GDH.....	124
5. Dyskusja	125
5.1. Wpływ Ni na wzrost siewek ogórka	125
5.2. Wpływ Ni na procesy pro- i antyoksydacyjne	130
5.3. Wpływ Ni na zawartość i profil związków fenolowych	142
5.4. Wpływ Ni na metabolizm azotu	149
6. Wnioski.....	156
7. Streszczenie	157
8. Abstract	159
9. Literatura	161

Wykaz stosowanych skrótów

8,13-diHODE	kwasy 8,13-dihydroksyoktadekadienowe (ang. 8,13-dihydroxy octadecanoic acid)
4-HNE	4-hydroksynonenal (ang. 4-hydroxynonenal)
9-HODE	kwasy 9-hydroksyoktadekadienowe (ang. 9-hydroxy octadecadienoic acid)
13-HODE	kwasy 13-hydroksyoktadekadienowe (ang. 13-hydroxy octadecadienoic acid)
9-HOTrE	kwasy 9-hydroksyoktadekatrienowe (ang. 9-hydroxy octadecatrienoic acid)
12-HOTrE	kwasy 12-hydroksyoktadekatrienowe (ang. 12-hydroxy octadecatrienoic acid)
13-HOTrE	kwasy 13-hydroksyoktadekatrienowe (ang. 13-hydroxy octadecatrienoic acid)
16-HOTrE	kwasy 16-hydroksyoktadekatrienowe (ang. 16-hydroxy octadecatrienoic acid)
9-HPODE	kwasy 9-hidroperoksyoktadekadienowe (ang. 9-hydroperoxy octadecadienoic acid)
13-HPODE	kwasy 13-hidroperoksyoktadekadienowe (ang. 13-hydroperoxy octadecadienoic acid)
9-HPOTrE	kwasy 9-hidroperoksyoktadekatrienowe (ang. 9- hydroperoxy octadecatrienoic acid)
13-HPOTrE	kwasy 13- hidroperoksyoktadekatrienowe (ang. 13- hydroperoxy octadecatrienoic acid)
13-oksoODE	kwasy 13-okso-oktadekadienowe (ang. 13-oxo octadecadienoic acid)
Acetylo-Co A	acetylo-koenzym A (ang. acetylo-coenzyme A)
AlaAT	aminotransferaza alaninowa (ang. alanine aminotransferase)
APX	peroksydaza askorbinianowa (ang. ascorbate peroxidase)
AsA	askorbinian, forma zredukowana (ang. ascorbic acid)

AspAT	aminotransferaza asparaginianowa (ang. aspartate aminotransferase)
CAT	katalaza (ang. catalase)
Cu/Zn-SOD	miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa (ang. Cu/Zn superoxide dismutase)
Cykl AsA-GSH	cykl askorbianian-glutation (ang. ascorbate-glutathione cycle)
DAB	3,3' - diaminobenzydina (ang. 3,3' - diaminobenzidine)
DBI	indeks wiązań podwójnych (ang. double bound index)
DHA	dehydroaskorbinian, forma utleniona AsA (ang. dehydroascorbic acid)
DHAR	reduktaza dehydroaskorbinianowa (ang. dehydroascorbate reductase)
Fe-SOD	żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa (ang. Fe superoxide dismutase)
GDH	dehydrogenaza glutaminianowa (ang. glutamate dehydrogenase)
GOGAT	syntaza glutaminianowa (ang. glutamate synthase)
GPOX	peroksydaza oznaczana wobec guajakolu (ang. guaiacol peroxidase)
GR	reduktaza glutationowa (ang. glutathione reductase)
GS	syntetaza glutaminowa (ang. glutamine synthetase)
GSH	glutation, forma zredukowana (ang. glutathione)
GSH-Px	peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
GSSG	disulfid glutationu, forma utleniona GSH (ang. glutathione disulfide)
GST	S-transferaza glutationowa (ang. glutathione S-transferase)

LDS	syntaza diolu kwasu linolowego (ang. linoleate diol synthase)
LH	wielonienasycony kwas tłuszczowy (ang. polyunsaturated fatty acid)
LOOH	wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid hydroperoxides)
LOX	lipoksygenaza (ang. lipoxygenase)
MDA	dialdehyd malonowy (ang. malondialdehyde)
MDHA	monodehydroaskorbinian (ang. monodehydroascorbate)
MDHAR	reduktaza monodehydroaskorbinianowa (ang. monodehydroascorbate reductase)
Mn-SOD	manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (ang. Mn superoxide dismutase)
NAD(P) ⁺ /NAD(P)H	(fosforan) dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma utleniona/forma zredukowana (ang. nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate))
NBT	błękit tetrazoliowy (ang. nitro blue tetrazolium)
NiR	reduktaza azotynowa (ang. nitrite reductase)
NR	reduktaza azotanowa (ang. nitrate reductase)
PA	kwas fosfatydowy (ang. phosphatidic acid)
PAL	amoniakoliza L-fenyloalaniny (ang. phenylalanine ammonia-lyase)
PC	fosfatydylocholina (ang. (phosphatidylcholine))
PE	fosfatydyloetanolamina (ang. phosphatidylethanolamine)
PG	fosfatydyloglicerol (ang. phosphatidylglycerol)
PI	fosfatydyloinozytol (ang. phosphatidylinositol)

POX	peroksydaza (ang. peroxidase)
PSI/PSII	fotosystem I/fotosystem II (ang. photosystem I/II)
QY	wydajność kwantowa fotoukładu II (ang. quantum yield)
RFT	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
s.m.	sucha masa
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)
SPOX	peroksydaza oznaczana wobec syringaldazyny (ang. syringaldazine peroxidase)
św.m.	świeża masa

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

- Projekt pt. „Badanie mechanizmów toksycznego działania niklu na siewki ogórka i próby jego obniżenia poprzez zastosowanie krzemu” w ramach dotacji na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, realizowany w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin UŁ w roku 2018. Kod projektu: B1811000001815.02
- Projekt pt. „Wpływ niklu na wybrane enzymy związane z metabolizmem azotu w liściach siewek ogórka” w ramach dotacji na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, realizowany w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin UŁ w roku 2019. Kod projektu: B1911000002133.02

1. Wstęp

Obecnie, zarówno z powodu działalności antropogenicznej człowieka, czy też z przyczyn naturalnych skażenie środowiska powoduje poważne zaburzenia w ekosystemach i wpływa znacząco na sektor rolniczy. Wśród największych zagrożeń dla środowiska naturalnego i organizmów żywych znajdują się metale ciężkie, czyli metale o gęstości przekraczającej 5 g cm^{-3} . Należą do nich m.in. Cd, Cu, Pb, Hg, Zn, Cr, Ni. Ze względu na ich szerokie zastosowanie w różnych szlakach technologicznych i przemysłowych oraz do produkcji nawozów czy pestycydów zanieczyszczenie metalami ciężkimi stanowi wciąż narastający problem ekologiczny. Część z nich w odpowiednich dawkach jest niezbędna dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin pełniąc istotne funkcje w przebiegu procesów fizjologicznych i biochemicznych. Do tej grupy należą np. Cu, Zn, Ni zaklasyfikowane do mikroelementów. Natomiast metale takie jak Cd, Pb, Hg nie pełnią w roślinach żadnych znanych funkcji. Wszystkie metale ciężkie w podwyższonych stężeniach, przekraczających granice tolerancji, wywołują u roślin redukcję wzrostu i inne efekty toksyczne wynikające z ich wielokierunkowego negatywnego działania na strukturę i funkcjonowanie tych organizmów. Rośliny ze względu na brak możliwości ruchu są szczególnie narażone na niekorzystne warunki środowiska, w tym obecne w glebie metale ciężkie. Metale ciężkie stanowią również poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka ponieważ wykazują działanie cytotoksyczne, mutagenne i stanowią tym samym przyczynę wielu poważnych chorób, w tym nowotworów. Chociaż za najważniejsze drogi przedostawania się metali do organizmu człowieka uznaje się wnikanie przez drogi oddechowe i skórę, istotnym ich źródłem mogą być również rośliny uprawiane na glebach skażonych metalami ciężkimi [Tiwari i Lata, 2018].

1.1. Nikiel

Nikiel jest 22 pierwiastkiem najliczniej występującym w skorupie ziemskiej i stanowi 0,008% jej powierzchni [Shahzad i wsp., 2018]. Obecny w środowisku Ni może mieć pochodzenie naturalne, choć w większym stopniu pochodzi on ze źródeł antropogenicznych. Głównym naturalnym źródłem Ni są gleby serpentynowe wykształcone na skałach ultramaficznych (magmowych), które zawierają naturalnie wysokie stężenie Ni, zwykle w zakresie 0,1% - 3%. Nikiel dostaje się do gleby oraz wód powierzchniowych głównie w wyniku procesu wietrzenia skał. Stężenie Ni w glebie i wodach powierzchniowych naturalnie zanieczyszczonych tym pierwiastkiem wynosi odpowiednio około 100 mg kg^{-1} oraz

0,005 mg dm⁻³. W glebach zanieczyszczonych w wyniku działalności człowieka zawartość Ni jest 20 - 30-krotnie wyższa [He i wsp., 2012]. Antropogenicznymi źródłami Ni są m.in.: wydobywanie metali, hutnictwo, górnictwo, spalanie paliw kopalnych do celów energetycznych, emisja spalin z pojazdów, składowanie odpadów komunalnych i przemysłowych, produkcja nawozów i pestycydów oraz przemysł cementowy. Nikiel jest szeroko stosowany jako surowiec w przemyśle metalurgicznym oraz galwanotechnicznym, jako katalizator w przemyśle spożywczym oraz chemicznym, a także jako składnik akumulatorów elektrycznych [Chen i wsp., 2009; Shahzad i wsp., 2018; Hassan i wsp., 2019]. Nikiel może występować w kilku stopniach utlenienia (od -1 do +4), jednak najczęstszą formą występowania tego metalu w układach biologicznych jest +2 stopień utlenienia [Sreekanth i wsp., 2013].

1.1.1. Pobieranie, transport i translokacja niklu

Pobieranie Ni przez rośliny odbywa się głównie przez system korzeniowy na drodze dyfuzji biernej oraz transportu aktywnego [Seregin i Kozhevnikova, 2006]. Stosunek wychwytu jonów na drodze dyfuzji biernej i transportu aktywnego zmienia się w zależności od gatunku rośliny, formy Ni oraz jego stężenia w podłożu [Chen i wsp., 2009; Hassan i wsp., 2019]. Rozpuszczalne związki Ni mogą być absorbowane przez system transportu kationów. Wychwyt Ni²⁺ jest hamowany konkurencyjnie przez Cu²⁺ oraz Zn²⁺ co może sugerować, że wszystkie trzy jony metali są pobierane przez ten sam system transportowy. Ponadto Ni²⁺ mogą być również absorbowane do rośliny przez system transportu Mg²⁺, ze względu na podobny stosunek wielkości obu metali do ich ładunku. Jednakże Mg²⁺ nie wykazuje hamującego wpływu na pobieranie Ni²⁺. W roślinach możliwy jest również wtórny transport aktywny schelatowanego Ni²⁺ w połączeniu z białkami, specyficznymi wiążącymi Ni²⁺ takimi jak metalotioneina, metalochaperony. Uważa się, że kompleksy metal-chelat są bezpośrednio absorbowane przez komórki korzenia, po czym albo następuje dysocjacja metalu z liganda wewnątrz komórek korzenia i metal jest wychwytywany przez roślinę, albo kompleks jest transportowany przez plazmolemę w korzeniach [Shahzad i wsp., 2018]. Natomiast nierozpuszczalne związki Ni dostają się do komórek roślinnych głównie poprzez endocytozę [Ahmad i Ashraf, 2011]. Stopień pobierania Ni przez rośliny jest uzależniony od kilku czynników, m.in. stężenia Ni²⁺ w glebie, metabolizmu rośliny, obecności innych metali, składu materii organicznej czy pH gleby [Chen i wsp., 2009]. Wśród wymienionych najważniejszym czynnikiem decydującym o rozpuszczalności Ni jest pH gleby, a to z kolei determinuje dostępność niklu dla roślin,

ponieważ w kwaśnym pH Ni staje się bardziej mobilny [Ahmad i Ashraf, 2011]. Nikiel jest transportowany od korzeni do pędów, a następnie do liści strumieniem transpiracyjnym przez ksylem [Chen i wsp., 2009]. Ze względu na dużą mobilność może być przenoszony ze starszych do młodszych liści, a także innych części roślin jak pąki, owoce i nasiona za pośrednictwem łyka. Wykazano, że Ni może być pobierany nie tylko przez korzenie, ale także przez liście. Sajwan i wsp. [1996] wykazali, że ponad 37% zaaplikowanego na liście Ni zostało przeniesione do innych części roślin, takich jak korzeń, łodyga i nasiona. Ni jest transportowany w roślinie głównie w postaci kompleksu Ni-ligand [Hassan i wsp., 2019]. Ligandami dla tego metalu mogą być nikotianamina, histydyna oraz kwasy organiczne, m.in. kwas cytrynowy i jabłkowy, pełniące funkcję wewnątrzkomórkowych chelatorów. Wiążą one Ni w cytozolu w celu transportu, translokacji bądź akumulacji w obrębie rośliny [Chen i wsp., 2009]. Transport wolnych jonów Ni^{2+} z korzeni do pędów jest poważnie utrudniony, ponieważ komórki ksylemu mają wysoką zdolność wymiany kationów, co utrudnia mobilność Ni [Briat i Lebrun, 1999]. Szacuje się u roślin nie będących hiperakumulatorami większość tego pierwiastka pobranego przez roślinę zatrzymywana jest w systemie korzeniowym [Cataldo i wsp., 1978]. Może to wynikać z sekwestracji Ni w miejscach wymiany kationów ścian naczyń, miąższu ksylemu oraz unieruchomienia go w wakuolach korzenia [Seregin i Kozhevnikova, 2006]. Co więcej, ponad 80% pobranego przez roślinę Ni zatrzymywane jest w wiązce przewodzącej, podczas gdy niecałe 20% występuje w obszarze korowym [Hassan i wsp., 2019]. W liściach akumuluje się głównie na brzegu blaszki, komórkach mezofilu oraz w epidermie w pobliżu nerwu głównego. Wykazano, że liście starsze akumulują Ni w większym stopniu niż młodsze. Natomiast w łodygach odwrotnie, większa akumulacja Ni występuje w młodych pędach [Shahzad i wsp., 2018].

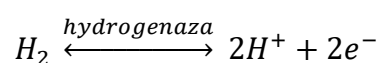
1.1.2. Korzystny wpływ niklu na rośliny

Nikiel jest uważany za pierwiastek niezbędny do wzrostu i rozwoju roślin, w niskim stężeniu ($0,05\text{--}10\text{ mg kg}^{-1}$ suchej masy). Stanowi ważny mikroskładnik pokarmowy roślin ze względu na różne funkcje biologiczne. Jego deficyt zaburza rozwój roślin, ogranicza ich wzrost, powoduje szybsze starzenie się i utrudnia pobieranie żelaza. Niedobór Ni powoduje chlorozę młodych liści i prowadzi do martwicy wierzchołków pędów. Nikiel odgrywa również ważną rolę w syntezie fitoaleksyn [Hassan i wsp., 2019].

Nikiel stanowi centrum aktywne ureazy, która katalizuje reakcję hydrolizy mocznika, w wyniku której powstaje amoniak oraz karbaminian. Karbaminian jest niestabilny i ulega

rozkładowi do amoniaku oraz kwasu węglowego [Watt i Ludden, 1999]. Wykazano, że u roślin nawożonych mocznikiem niedobór Ni zmniejsza aktywność ureazy, co prowadzi do zaburzenia metabolizmu azotu i akumulacji toksycznego mocznika w pędach roślin. Taka akumulacja mocznika może powodować nekrozy i chlorozę wierzchołków pędów i starszych liści [Gerendás i Sattelmacher, 1999; Hassan i wsp., 2019]. Stwierdzono, że dodatek Ni znacząco zwiększał produkcję suchej masy roślin uprawianych z dodatkiem mocznika [Gerendás i Sattelmacher, 1999].

Nikiel znajduje się także w centrum aktywnym hydrogenazy, która katalizuje odwracalną reakcję utleniania wodoru cząsteczkowego:



Wiązanie azotu w roślinach strączkowych zależy od aktywności hydrogenazy, ponieważ utlenianie wodoru dostarcza ATP niezbędnego do redukcji azotu do amoniaku, natomiast niedobór Ni znacznie zmniejsza aktywność hydrogenazy [Hassan i wsp., 2019]. Objawy niedoboru stwierdza się najczęściej u roślin motylkowych, które żyją w symbiozie z mikroorganizmami wiążącymi azot atmosferyczny. W roślinach strączkowych niedobór Ni powoduje uszkodzenia liści oraz ogranicza wzrost korzeni i rozwój brodawek korzeniowych [Hassan i wsp., 2019]. Mikroorganizmy wiążące azot wymagają Ni do przetwarzania gazowego wodoru wytwarzanego podczas wiązania N_2 [He i wsp., 2012].

Wykazano, że Ni jest również składnikiem innych metaloenzymów jak dehydrogenaza tlenu węgla, glioksalaza I, deformylaza peptydowa, syntaza acetylo-S-koenzymu A, reduktaza metylokoenzymu M i dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca Ni (NiSOD). Ni jest włączany do centrum aktywnego enzymu poprzez koordynację z otaczającymi ligandami, takimi jak histydyna oraz cysteina [He i wsp., 2012].

1.1.3. Toksyczny wpływ niklu na rośliny

Mimo korzystnego wpływu w małych ilościach, zbyt wysokie stężenia Ni są toksyczne, a w roślinach częściej występuje nadmiar Ni niż jego niedobór. Toksyczne stężenie Ni w roślinach skutkuje m.in. zahamowaniem wzrostu, a także występowaniem takich objawów jak chlorozy, nekrozy, więdnienie. Powoduje zaburzenia podstawowych procesów jak fotosynteza, zakłócenie gospodarki mineralnej czy zmiany strukturalne i morfologiczne w roślinach. Toksyczne działanie Ni wynika m.in. z jego zdolności do zastępowania innych

jonów metali w białkach strukturalnych i enzymatycznych, a także z silnego wiązania się ze związkami zawierającymi atomy O, N oraz S. Nikiel ma stosunkowo wysokie powinowactwo do grup sulfhydrylowych i wiązań disiarczkowych, dzięki czemu może powodować uszkodzenie drugorzędowej struktury białek, a tym samym powodować inaktywację enzymów prowadząc do zaburzeń różnych szlaków metabolicznych [He i wsp., 2012; Harasim i Filipek, 2015]. Istnieje także wiele dowodów na to, że Ni zaburza podstawowy metabolizm roślin w tym metabolizm azotu, o czym świadczą zmiany w zawartości jonów oraz aktywności enzymów zaangażowanych w gospodarkę azotową roślin [He i wsp., 2012].

Uważa się że fitotoksyczność Ni w dużym stopniu jest związana z wywoływaniem przez ten metal stresu oksydacyjnego. Mimo iż jest pierwiastkiem o niskiej aktywności oksydoredukcyjnej wykazano, że może generować stres oksydacyjny, na co wskazuje obecność uszkodzonych oksydacyjnie makrocząsteczek takich jak lipidy. Stwierdzono także zwiększone generowanie RFT oraz zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych i nieenzymatycznych antyoksydantów [Chen i wsp., 2009; Sreekanth i wsp., 2013].

1.1.3.1. Wpływ niklu na wzrost, strukturę i morfologię

Nikiel w wysokich stężeniach ma negatywny wpływ na kiełkowanie nasion i wzrost siewek. Indukowane przez Ni hamowanie kiełkowania i wzrostu może wynikać ze zmniejszonej syntezy białek oraz negatywnego wpływu na enzymy odpowiedzialne za mobilizację rezerw pokarmowych z bielma liścieni [Ahmad i Ashraf, 2011]. Nikiel hamuje wzrost wydłużeniowy pędów i korzeni z powodu zmniejszenia tempa procesów metabolicznych, redukcji podziałów komórkowych a także obniżenia plastyczności ściany komórkowej prawdopodobnie przez bezpośrednie wiązanie z pektynami i promowanie aktywności peroksydaz w ścianach komórkowych i przestrzeniach międzykomórkowych [Seregin i Kozhevnikova, 2006].

Częstymi objawami toksyczności Ni są chlorozy oraz plamy nekrotyczne. Takie chlorozy mogą wynikać z zakłócania przez ten metal metabolizmu chlorofilu [Seregin i Kozhevnikova, 2006; Chen i wsp., 2009].

Oprócz redukcji wzrostu metale ciężkie mogą wywoływać zmiany w morfologii i anatomii roślin. W liściach kapusty warzywnej traktowanie Ni spowodowało zmniejszenie przestrzeni międzykomórkowych, a także rozmiarów komórek miękiszu palisadowego i gąbczastego. W liściach pszenicy Ni spowodował zmniejszenie grubości mezofilu, spadek wielkości wiązek naczyniowych i średnicy naczyń w głównych i bocznych wiązках naczyniowych, a także

zmniejszenie szerokości komórek skórki. Nikiel może powodować zaburzenia w mitozie i aberracje chromosomowe, takie jak metafazy C, lepkie chromosomy i mostki chromosomowe. Natomiast komórki międzyfazowe mogą zawierać mikrojądra [Sreekanth i wsp., 2013].

1.1.3.2 Wpływ niklu na gospodarkę mineralną

Jednym z mechanizmów toksyczności metali ciężkich jest zmniejszenie pobierania kationów i anionów przez korzenie roślin. Nikiel ma cechy podobne do innych pierwiastków niezbędnych takich jak Ca, Mg, Mn, Fe, Cu oraz Zn, dlatego może konkurować z nimi w procesach absorpcji i transpiracji. Przy wysokim stężeniu Ni może hamować ich pobieranie i w rezultacie prowadzić do wystąpienia ich niedoboru w roślinach [Chen i wsp., 2009].

1.1.3.3. Wpływ niklu na fotosyntezę

Wpływ Ni na przebieg procesu fotosyntezy dotyczy różnych jego aspektów. Negatywny wpływ Ni na fotosyntezę związany jest z obniżeniem zawartości chlorofilu, zmienioną strukturą chloroplastów, a także zaburzeniami w przebiegu fazy jasnej i ciemnej fotosyntezy. Pod wpływem wysokiego stężenia Ni może nastąpić uszkodzenie struktury gran i błony tylakoidów bądź ich deformacja, zmniejszenie ilości gran i tylakoidów, a także spadek wielkości i ilości chloroplastów [Sreekanth i wsp., 2013; Hassan i wsp., 2019]. Nikiel wpływa redukująco na pulę chlorofilu, co może wynikać z obniżonej biosyntezy tego barwnika na skutek zmniejszonej ilości pobieranych przez rośliny jonów Fe^{2+} oraz Mg^{2+} . Obniżenie stężenia chlorofilu może również wynikać ze zwiększonej aktywności chlorofilazy, co skutkuje zwiększoną jego degradacją [Szymańska i Matraszek, 2005].

Nikiel może hamować przebieg fazy jasnej fotosyntezy poprzez zaburzenie transportu elektronów. Nikiel może oddziaływać hamująco na transport elektronów z feofityny przez plastochinon QA i Fe do plastochinonu QB poprzez zmianę struktury tych nośników, bądź białek wchodzących w skład ich centrum reakcji. Następuje również zmniejszenie zawartości cytochromów b_{6f} i b_{559} oraz ferredoksyny i plastocyjaniny, co w efekcie obniża wydajność transportu elektronów. Nikiel wpływa przede wszystkim na fotosystem II (PSII) i tam się akumuluje w znacznie większych ilościach niż w fotosystemie I (PSI). [Drażkiewicz i Baszyński, 2010].

Wywołane obecnością Ni zakłócenie przebiegu fazy ciemnej fotosyntezy wiąże się z obniżeniem aktywności enzymów cyklu Calvina, w tym karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco), kinazy 3-fosfoglicerynianowej, fruktozo-1,6-bisfosfatazy, aldolazy oraz zależnych od NAD i NADP dehydrogenaz fosfogliceraldehydu. Hamowanie reakcji cyklu Calvina prowadzi do zwiększonej akumulacji wytworzonych w fazie jasnej ATP i NADPH, a nagromadzenie się tych związków powoduje powstanie wysokiego gradientu pH w poprzek błony tylakoidów, który blokuje aktywność PSII. Inny mechanizm hamujący przebieg fazy ciemnej wynika z zamykania aparatów szparkowych w roślinach poddanych stresowi Ni, co ogranicza pobieranie CO₂ przez rośliny [Drażkiewicz i Baszyński, 2010; Sreekanth i wsp., 2013].

1.2. Stres oksydacyjny

Około 2,7 miliarda lat temu tlen cząsteczkowy został wprowadzony do środowiska przez ewoluujące organizmy fotosyntetyzujące, a reaktywne formy tlenu (RFT) stały się produktem ubocznym życia w środowisku tlenowym [Gill i Tuteja, 2010]. Oszacowano, że w tkankach roślin 1-2% O₂ jest przekształcana do RFT [Das i Roychoudhury, 2014].

1.2.1. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu to chemicznie reaktywne cząstki wywodzące się z tlenu cząsteczkowego w stanie podstawowym charakteryzujące się wyższą zdolnością do utleniania związków organicznych niż cząsteczka tlenu. Grupa RFT obejmuje wolne rodniki, które mają 1 lub więcej niesparowanych elektronów oraz formy nierodnikowe, które nie posiadają niesparowanych elektronów. Mogą wykazywać działanie szkodliwe jak i pożyteczne, w zależności od ich stężenia w roślinach. Wysokie stężenia mogą powodować uszkodzenia biomolekuł, podczas gdy w niskim stężeniu działają jako cząsteczki przekaźnikowe w wewnątrzkomórkowych kaskadach sygnalizacyjnych [Sharma i wsp., 2012]. Do najczęściej spotykanych RFT zaliczamy anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻), rodnik hydroksylowy (HO[•]), tlen singletowy (¹O₂) oraz nadutlenek wodoru (H₂O₂).

Tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym występuje jako tryplet (³O₂) i choć może wykazywać działanie utleniające to jest on mało reaktywny. Posiada 2 niesparowane elektrony o równoległych spinach na dwóch oddzielnych orbitalach, co czyni go paramagnetycznym. W związku z tym może reagować z cząsteczkami, które mają dwa podobne elektrony

z antyrównoległymi spinami (są także w stanie trypletowym), co znacznie ogranicza możliwości tlenu jako utleniacza [Apel i Hirt, 2004; Dumanović i wsp., 2021; Savchenko i Tikhonov, 2021].

Cząsteczka O_2 może zostać aktywowana w dwojaki sposób:

1. poprzez pochłonięcie nadmiaru energii wystarczającej, aby odwrócić spin jednego z niesparowanych elektronów do stanu singletowego (powstaje 1O_2), w którym oba elektrony mają przeciwny spin,
2. poprzez stopniową redukcję jednowartościową, w wyniku której O_2 jest kolejno redukowany do O_2^- , H_2O_2 , $HO^{\cdot}$ i ostatecznie do wody (H_2O) [Dumanović i wsp., 2021].

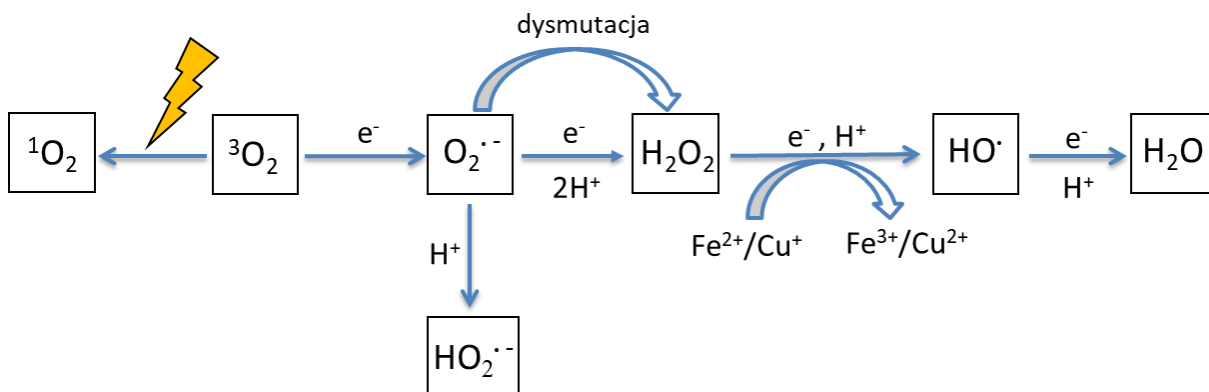
Tlen singletowy

Tlen singletowy w roślinach wytwarzany jest głównie przez chlorofil i jego tetrapiolowe związki pośrednie w błonach tylakoidowych chloroplastów w obecności światła. Chlorofil jest obecny zarówno w kompleksie zbierającym światło, jak i w centrach reakcji fotosyntezy. Ich stan wzbudzenia trwa dosyć długo i umożliwia przekształcenie energii wzbudzenia do potencjału elektrochemicznego poprzez rozdział ładunku. W wyniku nieefektywnego transferu energii podczas fotosyntezy powstaje stan trypletowy chlorofilu, który reaguje z tlenem w stanie trypletowym, co prowadzi do powstania 1O_2 [Tripathy i Oelmüller, 2012]. Nie znane są żadne bezpośrednie zmiatacze enzymatyczne 1O_2 , a jego usuwanie zachodzi głównie poprzez reakcje z innymi cząsteczkami, zwłaszcza z karotenoidami, tokoferolami i lipidami błonowymi [Waszczak i wsp., 2018]. Ograniczona dostępność CO_2 spowodowana zamykaniem aparatów szparkowych w wyniku działania różnych stresów środowiskowych sprzyja tworzeniu się 1O_2 . Czas życia tej formy tlenu w komórce trwa 3 μs lub mniej i może ona dyfundować na odległość kilkuset nm. Tlen singletowy bezpośrednio utlenia białka, nienasycone kwasy tłuszczowe oraz DNA [Sharma i wsp., 2012]. Wykazuje powinowactwo do reszt białkowych takich jak tryptofan, histydyna, tyrozyna i cysteina [Dumanović i wsp., 2021]. Ponadto uważa się, że jest odpowiedzialny za indukowaną światłem utratę aktywności PSII poprzez degradację białka D1 [Krieger-Liszkay, 2005].

Anionorodnik ponadtlenkowy

Tlen cząsteczkowy posiada zdolność pobierania elektronów ze związków organicznych powodując ich utlenienie, przy czym sam ulega redukcji. Do całkowitej redukcji cząsteczki

tlenu niezbędne jest przyłączenie 4 elektronów oraz 4 protonów, co prowadzi do powstania 2 cząsteczek wody. W wyniku niepełnej redukcji cząsteczki tlenu: jedno-, dwu- lub trzelektronowej powstają RFT (Rys.1).



Rys.1. Powstawanie RFT w roślinach (wg Sharma i wsp. [2012], zmodyfikowane)

$^1\text{O}_2$ - tlen singletowy; $^3\text{O}_2$ - tlen w stanie trypletowym; $\text{O}_2^{\cdot-}$ - anionorodnik ponadtlenkowy; $\text{HO}_2^{\cdot-}$ - rodnik wodoronadtlenkowy; H_2O_2 - nadtlenek wodoru; $\text{HO}^\cdot$ - rodnik hydroksylowy; H_2O - woda

Jednoelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego w komórce prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Anionorodnik ponadtlenkowy jest umiarkowanie reaktywny, ma krótki okres półtrwania 2–4 μs , dlatego może przemieścić się tylko kilka μm od miejsca powstania. Sam nie powoduje rozległych uszkodzeń, natomiast ulega przemianie w bardziej reaktywny i toksyczny $\text{HO}^\cdot$ [Das i Roychoudhury, 2014]. W środowisku wodnym $\text{O}_2^{\cdot-}$ może przyłączyć proton, w wyniku czego powstaje rodnik wodoronadtlenkowy ($\text{HO}_2^{\cdot-}$), który jest stabilniejszy, bardziej reaktywny oraz łatwo przechodzi przez błony. Anionorodnik ponadtlenkowy jest dysmutowany do H_2O_2 nieenzymatycznie lub w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD). W tej reakcji dwie cząsteczki $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagują ze sobą w obecności 2H^+ , w wyniku czego następuje utlenienie jednej cząsteczki do tlenu oraz redukcja drugiej do H_2O_2 . Reakcja ta jest najbardziej efektywna w pH kwaśnym, natomiast staje się wolniejsza w środowisku zasadowym [Dumanović i wsp., 2021]. Anionorodnik ponadtlenkowy utlenia, a w związku z tym inaktywuje białka zawierające centra Fe-S (np. akonitaza, dehydrataza) [Sharma i wsp., 2012].

Nadtlenek wodoru

W wyniku przyłączenia kolejnego elektronu do anionorodnika ponadtlenkowego bądź dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu w obecności protonów powstaje H_2O_2 . W wysokich stężeniach jest toksyczny dla komórek, natomiast w niskich stężeniach uczestniczy w przekazywaniu sygnałów m.in. dzięki możliwości przechodzenia poprzez błony biologiczne. Jego obecność w apopląście jest niezbędna dla prawidłowego wzrostu komórek. Stanowi substrat dla peroksydaz klasy III, ponadto jest odpowiedzialny za utlenianie związków fenolowych, a w konsekwencji za polimeryzację i lignifikację ściany komórkowej. Toksyczne działanie H_2O_2 opiera się na bezpośredniej inaktywacji enzymów (np. SOD) w wyniku utleniania reszt cysteiny lub metioniny [Dumanović i wsp., 2021]. Może powodować także utlenianie kinaz białkowych, fosfataz i czynników transkrypcyjnych zawierających reszty tiolowe. Nadtlenek wodoru jest umiarkowanie reaktywny i jest stosunkowo długo żyjącą cząsteczką (okres półtrwania to 1 ms). Nie ma niesparowanych elektronów, dlatego łatwo może przenikać przez błony, a w konsekwencji powodować uszkodzenia daleko od miejsca powstania [Sharma i wsp., 2012].

Rodnik hydroksylowy

Jednoelektronowa redukcja cząsteczki H_2O_2 katalizowana przez wolne jony metali ziem przejściowych (Fe^{2+} , Cu^{2+}) prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego $HO^\bullet$ w reakcji Fentona [Savchenko i Tikhonov, 2021]. Rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywny spośród wszystkich RFT, a dodatkowo komórki nie posiadają enzymatycznego mechanizmu usuwania tego rodnika. Ze względu na krótki czas życia (okres półtrwania 1 ns) oraz silnie dodatni potencjał redoks $HO^\bullet$ reaguje z cząsteczkami znajdującymi się w pobliżu miejsca powstania. Jego wysoka toksyczność wynika z faktu, że może bezpośrednio reagować z wszystkimi cząsteczkami biologicznymi powodując ich utlenienie [Sharma i wsp., 2012].

1.2.2. Miejsca generowania RFT w komórce

Reaktywne formy tlenu powstają w organellach, w których występuje tlen oraz transport elektronów. Są produkowane m.in. w chloroplastach, peroksysomach, mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, a także w apopląście [Dumanović i wsp., 2021]. W zielonych częściach roślin w obecności światła głównymi miejscami generowania RFT są chloroplasty

oraz peroksosomy. Natomiast w ciemności oraz w częściach niefotosyntetyzujących roślin RFT są głównie wytwarzane w mitochondriach [Farooq i wsp., 2019].

W chloroplastach głównym źródłem RFT jest łańcuch transportu elektronów. Oprócz $^1\text{O}_2$ powstają tu także O_2^- oraz H_2O_2 . Anionorodnik ponadtlenkowy powstaje głównie w wyniku wycieku elektronów z centrów żelazowo-siarkowych 2 Fe-2S oraz 4 Fe-4S. Ponadto może być wytwarzany w reakcji Mehlera w sytuacji przeciążenia. Zwykle przepływ elektronów z wzbudzonych centrów PSI jest kierowany do NADP^+ , który jest redukowany do NADPH. W sytuacjach przeciążenia łańcucha transportu elektronów, elektrony ze zredukowanej ferredoksyny zamiast na NADP^+ , kierowane są na O_2 powodując jego redukcję. W wyniku wycieku elektronów z miejsc akceptorowych PSII na tlen również może powstawać O_2^- [Das i Roychoudhury, 2014; Phua i wsp., 2021].

Peroksosomy ze względu na ich zaangażowanie w procesy tlenowe są głównym miejscem wewnątrzkomórkowej produkcji H_2O_2 . Stanowią również ważne źródło generowania O_2^- . Głównym źródłem peroksosomalnego H_2O_2 jest proces fotooddychania. Gdy w powodu różnych stresów środowiskowych dostępność dwutlenku węgla jest ograniczona Rubisco katalizuje konkurencyjną reakcję, w której tlen jest faworyzowany w stosunku do CO_2 jako substrat. Prowadzi ona do powstania glikolanu, który jest transportowany z chloroplastów do peroksosomów, gdzie ulega utlenieniu do glioksalanu w reakcji katalizowanej przez oksydazę glikolanową. W wyniku tej reakcji jako produkt uboczny powstaje H_2O_2 [Tripathy i Oelmüller, 2012]. Oprócz oksydazy glikolanowej w peroksosomie występują też inne enzymy, których aktywność generuje H_2O_2 . W pierwszym etapie β -oksydacji kwasów tłuszczowych, w którym kwasy tłuszczowe są rozkładane do acetylo-koenzymu A (acetylo-Co A) w wyniku reakcji katalizowanej przez oksydazę acetylo-CoA jest generowany H_2O_2 . W metabolizmie siarki przekształcenie siarczynu do siarczanu przez oksydazę siarczynową również powoduje wytworzenie tej reaktywnej formy tlenu [Phua i wsp., 2021].

Anionorodnik ponadtlenkowy jest generowany w peroksosomach w dwóch miejscach. Oksydaza ksantynowa znajdująca się w macierzy peroksosomalnej, katalizuje reakcję utleniania ksantyny oraz hypoksantyny z wytworzeniem kwasu moczowego oraz O_2^- jako produktu ubocznego [Das i Roychoudhury, 2014]. Kwas moczowy jest dalej przekształcany do allantoiny przez oksydazę moczanową również z wytworzeniem tej RFT [Małecka i Tomaszewska, 2005]. Drugim miejscem syntezy O_2^- jest zależny od NADPH peroksosomalny łańcuch elektronów zlokalizowany w błonie peroksosomu [Das i Roychoudhury, 2014].

Mitochondria są miejscem produkcji RFT podczas procesów fosforylacji oksydacyjnej. Głównym źródłem RFT jest mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, a szczególnie dwa jego elementy takie jak kompleks I oraz kompleks III. W kompleksie I redukcja O_2 do $O_2^{\cdot-}$ następuje w regionie flawoproteinowym dehydrogenazy NADH w macierzy mitochondrialnej [Phua i wsp., 2021]. Produkcja RFT w kompleksie I jest dodatkowo nasiloną, gdy występuje odwrócony przepływ elektronów z kompleksu III do kompleksu I z powodu braku substratów związanych z NAD^+ . Ten odwrócony przepływ elektronów jest kontrolowany przez hydrolizę ATP [Das i Roychoudhury, 2014]. Na poziomie kompleksu III całkowicie zredukowany ubichinon przekazuje elektrony do cytochromu c, w wyniku czego powstaje niestabilny rodnik ubisemichinonu, który dostarcza elektrony do redukcji O_2 w macierzy mitochondrialnej oraz przestrzeni międzybłonowej [Phua i wsp., 2021]. Zwiększone tempo przepływu elektronów wynikające z intensywnego metabolizmu oddechowego prowadzi do nadmiernej redukcji puli ubichinonu oraz wzrostu produkcji RFT [Farooq i wsp., 2019]. W mitochondrium RFT mogą być generowane również przez flawoproteiny, do których zaliczamy dehydrogenazę 3- fosfoglicerolową czy kompleks II łańcucha oddechowego [Young i wsp., 2002]. Uważa się, że z produkcją RFT może być także związana aktywność akonitazy a pośrednio również dehydrogenazy 1-galakton- γ -laktonu, która dostarcza elektronów do łańcucha oddechowego [Das i Roychoudhury, 2014]. Anionorodnik ponadtlenkowy powstający podczas oddechowego transportu elektronów jest utrzymywany w niskim stężeniu ze względu na szybkie tempo dysmutacji do H_2O_2 . W obecności jonów metali ziem przejściowych wytwarzany może być również rodnik hydroksylowy [Phua i wsp., 2021].

Oprócz RFT wytwarzanych w organellach komórkowych w wyniku zachodzących tam szlaków metabolicznych, RFT mogą być produkowane w błonie oraz ścianie komórkowej. Oksydazy NAD(P)H związane z błoną komórkową, a także peroksydazy związane ze ścianą komórkową są głównie odpowiedzialne za wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$ oraz H_2O_2 w apoplasmie w warunkach stresowych [Tripathy i Oelmüller, 2012]. Oksydazy NAD(P)H uczestniczą w przenoszeniu elektronów z cytoplazmatycznego NAD(P)H na tlen cząsteczkowy, w wyniku czego powstaje $O_2^{\cdot-}$ [Phua i wsp., 2021]. Peroksydaza związana ze ścianą komórkową katalizuje powstawanie H_2O_2 w obecności NADH. Stwierdzono, że NADH jest dostarczane przez dehydrogenazę jabłczanową [Sharma i wsp., 2012]. Zależne od pH peroksydazy ściany komórkowej są aktywowane przez alkaliczne pH i w obecności reduktora wytwarzają H_2O_2 [Gill i Tuteja, 2010]. Reaktywne formy tlenu w apoplasmie mogą być generowane przez inne enzymy, takie jak oksydaza szczawianowa wytwarzająca H_2O_2 i CO_2 z kwasu szczawowego czy oksydazy

poliaminowe katalizujące deaminację oksydacyjną poliamin (putrescyny, spermidyny i sperminy) z wytworzeniem H_2O_2 [Waszczak i wsp., 2018; Dumanović i wsp., 2021]. Wytwarzanie RFT może być związane z enzymatycznym utlenianiem kwasów tłuszczowych. Lipoksygenaza zlokalizowana w ścianie komórkowej także stanowi źródło RFT takich jak $HO^\bullet$, $O_2^\bullet$ oraz H_2O_2 [Farooq i wsp., 2019].

Reaktywne formy tlenu produkowane są również w retikulum endoplazmatycznym. Mikrosomalny łańcuch elektronów składa się z reduktazy zależnej od NAD(P)H oraz cytochromu P 450 i stanowi źródło $O_2^\bullet$ oraz H_2O_2 [Małecka i Tomaszewska, 2005].

1.2.3. Negatywne skutki działania RFT

Na skutek intensywnego wytwarzania RFT, bądź nieefektywnego działania systemu antyoksydacyjnego może dochodzić do uszkodzeń biomolekuł, takich jak lipidy, białka, kwasy nukleinowe i cukry. W związku z tym RFT mogą zmieniać właściwości błony, takie jak płynność, transport jonów, wpływać na aktywność enzymatyczną, hamować syntezę białek, powodować uszkodzenie DNA, a ostatecznie prowadzić do śmierci komórki.

1.2.3.1. Oksydacyjne uszkodzenia lipidów

Lipidy występujące w błonach plazmatycznych komórek roślinnych dzielą się na 3 grupy: glicerolipidy, sfingolipidy i sterole. Najwięcej jest glicerolipidów, wśród których wyróżnia się 4 rodzaje: fosfolipidy, galaktolipidy, triacyloglicerole i sulfolipidy. Głównymi składnikami błon plazmatycznych u roślin są fosfolipidy, które w plazmolemie stanowią około 90% wszystkich lipidów. W zależności od grupy obecnej w tzw. części główowej cząsteczki dzieli się je na kilka klas: fosfatydylocholinę (PC), fosfatydyloetanolaminę (PE), fosfatydyloglicerol (PG), fosfatydyloserynę (PS), fosfatydyloinozytol (PI) i kwas fosfatydowy (PA). Hydrofobową część cząsteczek fosfolipidów nazywaną ogonem budują łańcuchy kwasów tłuszczowych różniące się długością łańcucha i stopniem nienasycenia. Spośród kwasów nasyconych najczęściej występują palmitynowy (16:0) i stearynowy (18:0), natomiast najliczniejsze kwasy nienasycone to palmitooleinowy (16:1), oleinowy (18:1), linolowy (18:2) i α -linolenowy (18:3) [Reszczyńska i Hanaka, 2020; Wang i wsp., 2020].

Oksydacyjne uszkodzenia lipidów są związane z utlenianiem nienasyconych kwasów tłuszczowych wolnych bądź występujących w cząsteczce lipidów. Proces ten nazywany jest

peroksydacją lipidów. Najbardziej wrażliwe na proces utleniania są wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które stanowią znaczną część całkowitej puli kwasów tłuszczowych zawartych w komórkach roślinnych [Bartosz, 2013]. Produkty utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są ogólnie nazywane oksylipinami. Jest to strukturalnie zróżnicowana grupa metabolitów obejmująca zarówno pierwotne produkty peroksydacji lipidów jak i związki powstające w wyniku różnorodnych reakcji wtórnych [Griffiths, 2015]. Wiele spośród oksylipin wykazuje właściwości toksyczne, jednak niektóre z nich pełnią istotną rolę w komórkach roślinnych, np. kwas jasmonowy, uczestniczący w sygnalizacji i ekspresji genów. Peroksydacja lipidów będących istotnymi składnikami błon biologicznych pociąga za sobą zmiany w funkcjonowaniu tych struktur, w tym zaburzenia ich integralności, płynności i przepuszczalności [Yadav i wsp., 2018]. Mimo, że utlenianie lipidów błonowych niesie za sobą wspomniane wyżej niekorzystne dla funkcjonowania komórek konsekwencje to istnieje pogląd, że błony plazmatyczne bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą pełnić rolę wielkocząsteczkowych antyoksydantów zabezpieczających białka przed utlenieniem. Uważa się, że ochrona białek kosztem peroksydacji lipidów błonowych jest zjawiskiem korzystnym dla komórki, ponieważ w porównaniu z uszkodzonymi oksydacyjnie białkami usuwanie utlenionych lipidów i ich zastąpienie nowymi jest mniej kosztowne pod względem nakładu energii [Møller i wsp. 2007; Schmid-Siebert i wsp., 2016].

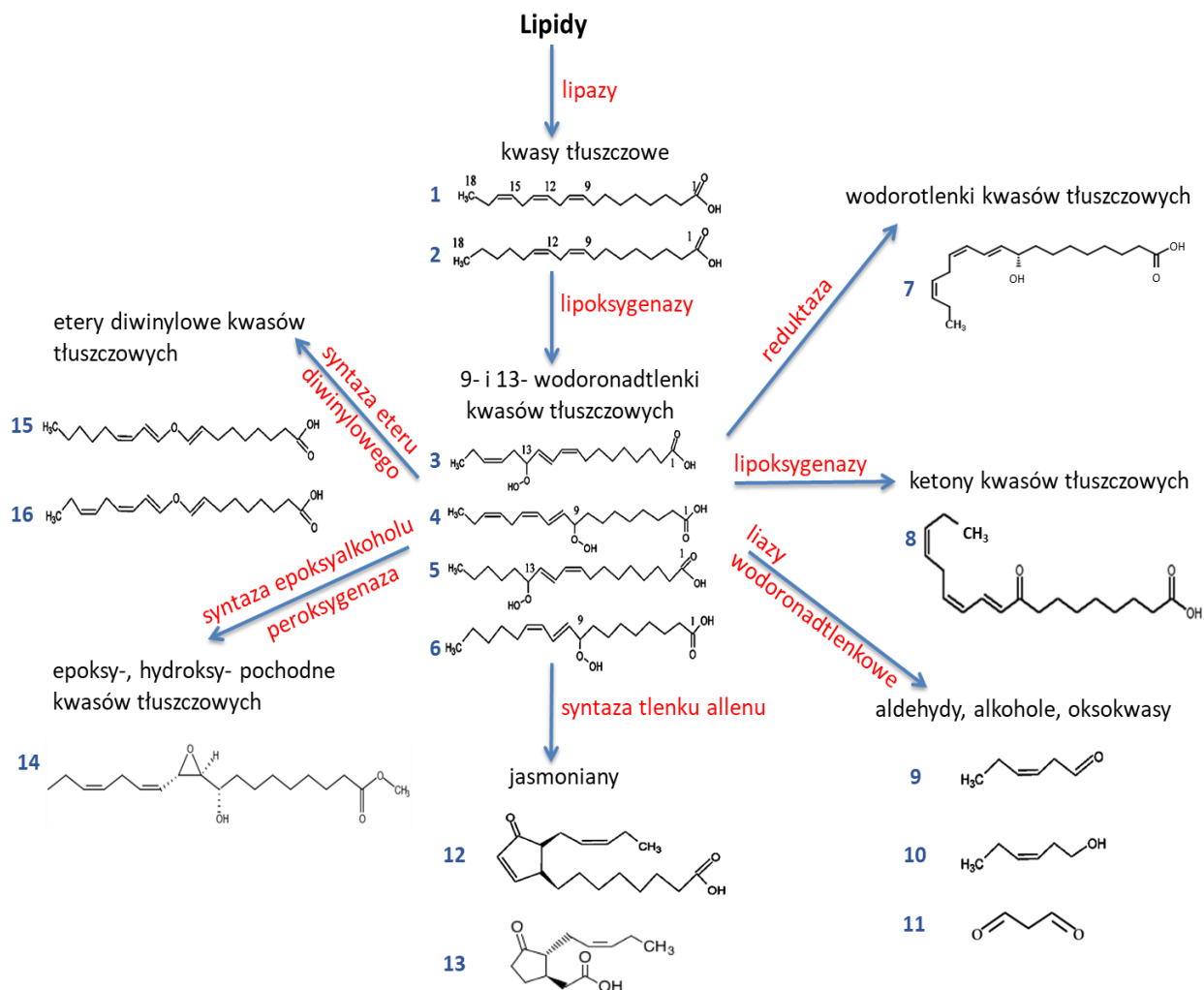
Reakcje peroksydacji lipidów mogą zachodzić zarówno na drodze enzymatycznej jak i nieenzymatycznej (autooksydacji).

Enzymatyczne utlenianie lipidów

Za utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych takich jak 18:2 czy 18:3 odpowiada głównie lipoksygenaza (LOX), a mniejszym stopniu α -dioksygenaza.

Roślinne lipoksygenazy są klasyfikowane ze względu na specyficzne utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych, które może nastąpić przy 9 lub 13 atomie węgla 18-węglowego kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstają odpowiednio 9- i 13- wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych [Singh i wsp., 2022]. Z kwasu 18:2 powstają kwas 9- hydroperoksyoktadekadienowy (9-HPODE) oraz kwas 13-hydroperoksyoktadekadienowy (13-HPODE), natomiast z kwasu 18:3 powstają kwas 9- hydroperoksyoktadekatrienowy (9-HPOTrE) oraz kwas 13- hydroperoksyoktadekatrienowy (13-HPOTrE) [Seta i wsp., 2009]. Wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych to oksylipiny będące pierwotnymi produktami peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Mogą one ulegać dalszym przekształceniom przy

udziale enzymów takich jak: syntaza tlenu allenu, liaza wodoronadtlenkowa, syntaza eteru diwinylowego, peroksygenaza, syntaz epoksyalkoholu oraz reduktaza (Rys.2) [Mosblech i wsp., 2009].



Rys.2. Drogi biosyntezy oksylipin (wg Savchenko i wsp. [2014], zmodyfikowane)

1. kwas linolenowy; 2. kwas linolowy; 3. kwas 13-hydroperoksyoktadekatrienowy (13- HPOTrE); 4. kwas 9-hydroperoksyoktadekatrienowy (9-HPOTrE); 5. kwas 13- hydroperoksyoktadekadienowy (13-HPODE); 6. kwas 9-hydroperoksyoktadekadienowy (9-HPODE); 7. kwas 9 hydrokso-oktadekatrienowy (9-HOTrE); 8. kwas 9-keto-oktadekatrienowy; 9. 3-heksenal; 10. 3- heksenol; 11. aldehyd malonowy (MDA); 12. kwas 12- okso-fitodienowy; 13. kwas jasmonowy; 14. 10,11-epoksy-9-hydrokso-12,15-oktadekadienian metylu; 15. kwas kolneinowy; 16. kwas kolnenowy

Głównymi enzymami wykorzystującymi wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych jako substrat są syntaza tlenu allenu i liaza wodoronadtlenkowa [Savchenko i wsp., 2014]. Syntaza tlenu allenu bierze udział w przekształcaniu wodoronadtlenku kwasu linolenowego do niestabilnego tlenu allenu, który dalej przy udziale cykazy tlenu allenu jest przekształcany w kwas

12- oksofitodienowy. Następnie w wyniku redukcji zależnej od NADPH i przemian w cyklu β - oksydacji powstaje kwas 7-izojasmonowy, stanowiący bezpośredni prekursor kwasu jasmonowego. Liazy wodoronadtlenkowe działają odpowiednio na 9- i 13- wodoronadtlenki, tworząc aldehydy C6-C9 oraz oksokwasy [Biswas i Mano, 2021].

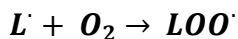
W reakcji liazy z 13-wodoronadtlenkami 18-węglowych kwasów tłuszczowych powstają 6- węglowe aldehydy oraz 12-węglowe oksokwasy, natomiast z 9-wodoronadtlenków powstają 9-węglowe aldehydy i oksokwasy. Syntaza eteru diwinylowego bierze udział w przekształceniu wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych w etery diwinyłowe takie jak kwas kolnenowy, kolnelenowy oraz eterolowy. Peroksygenazy uczestniczą w utlenianiu wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych i tworzeniu epoksy-, hydroksy- i epoksyhydroksypochodnych kwasów tłuszczowych. Wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych mogą być również substratami dla lipoksygenazy, reduktazy oraz syntazy epoksyalkoholi. W wyniku aktywności tych enzymów powstają, odpowiednio, pochodne ketonowe, hydroksylowe oraz epoksyhydroksylowe [Santino i wsp., 2010; Savchenko i wsp., 2014].

α -Dioksygenaza, podobnie jak lipoksygenaza, powoduje powstanie wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych poprzez dioksygenację łańcucha węglowego, z tą różnicą, że zachodzi ona na węglu α . Powstałe nietrwałe 2-hydroksypochodne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są dalej przekształcane do 2-hydroksykwasów tłuszczowych, aldehydów i kwasów tłuszczowych o skróconym łańcuchu [Griffiths, 2015].

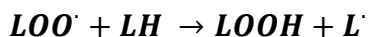
Nieenzymatyczne utlenianie lipidów

Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów przebiega w trzech etapach i obejmuje etap inicjacji, propagacji oraz terminacji (Rys. 3) [Demidchik, 2015]. W reakcji inicjacji peroksydacji lipidów następuje odłączenie atomu wodoru z grupy metylenowej cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (LH). Obecność wiązania podwójnego w kwasie tłuszczowym osłabia wiązanie C-H na atomie węgla w pobliżu wiązania podwójnego co ułatwia odłączanie atomu wodoru [Catalá, 2009; Hasanuzzaman i wsp., 2020a]. W wyniku tej reakcji kwas tłuszczowy ulega przekształceniu w wolny rodnik alkilowy ($L^{\cdot}$). Reakcja peroksydacji lipidów może zostać zapoczątkowana przez rodniki: hydroksylowy ($HO^{\cdot}$) bądź wodoronadtlenkowy ($HO_2^{\cdot}$) [Yalcinkaya i wsp., 2019], a także rodniki lipidowe takie jak rodnik alkilowy ($L^{\cdot}$), alkoksylowy ($LO^{\cdot}$) i nadtlenkowy ($LOO^{\cdot}$) [Demidchik, 2015].

W reakcji propagacji wolne rodniki alkilowe reagują z tlenem cząsteczkowym, w wyniku czego powstają rodniki nadtlenkowe ($LOO\cdot$).

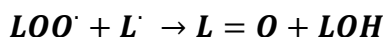
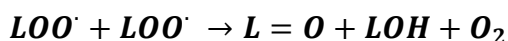
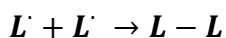


Rodniki nadtlenkowe mogą reagować z kolejnymi cząsteczkami kwasu tłuszczowego, odłączając atom wodoru od jego cząsteczki, co prowadzi do powstania wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych ($LOOH$), a także kolejnych rodników alkilowych [Alché, 2019].



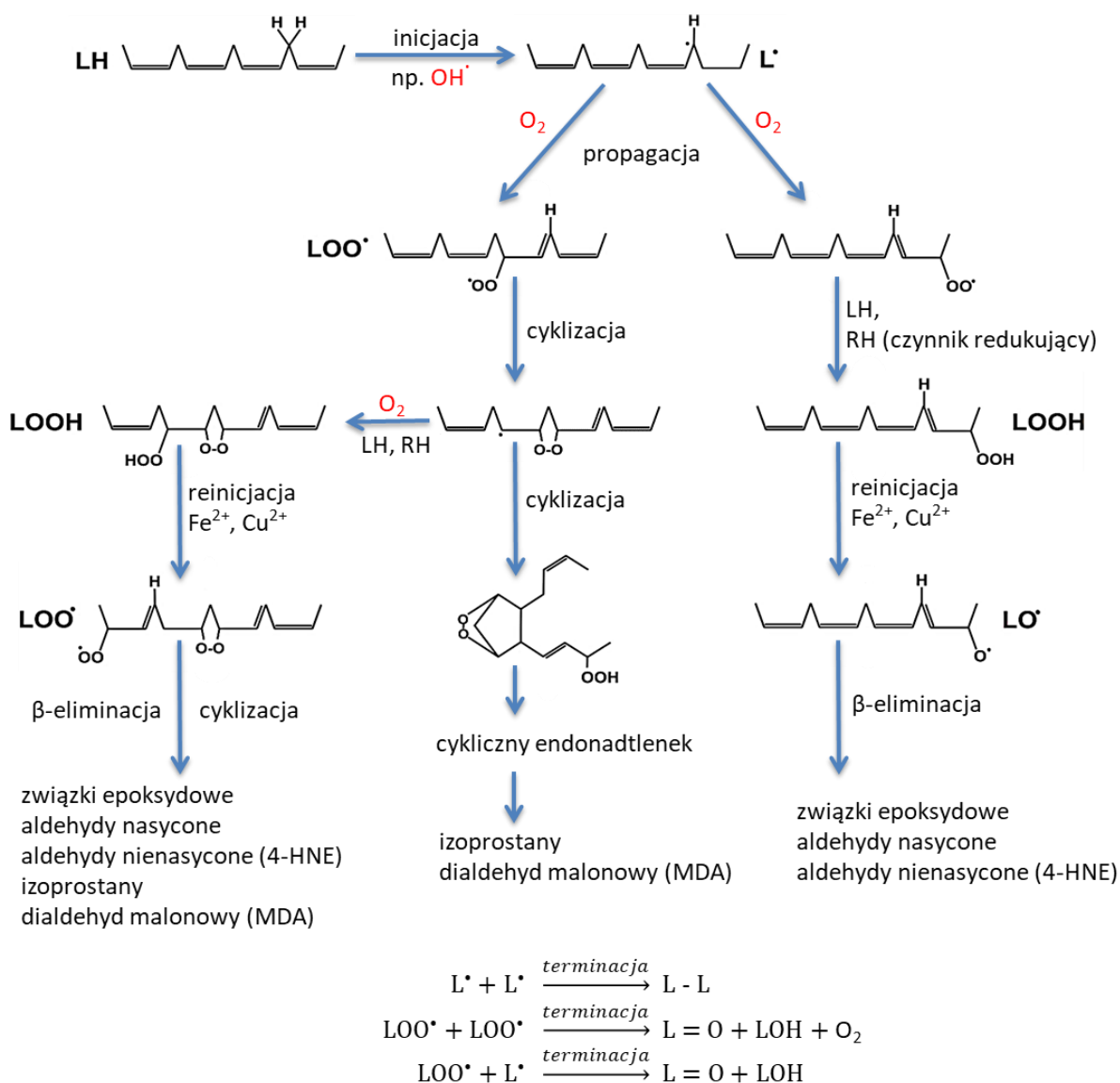
Powstający wodoronadtlenek może być redukowany w obecności zredukowanych jonów metali przejściowych, głównie Fe^{2+} i Cu^{2+} do reaktywnego rodnika alkoksylowego, który może ulegać dalszym przekształceniom np. na drodze β -eliminacji. Zjawisko to nosi nazwę reinicjacji [Hasanuzzaman i wsp., 2020a]. Zarówno rodniki alkoksylowe, jak i nadtlenkowe stymulują reakcję łańcuchową peroksydacji lipidów poprzez odrywanie dodatkowych atomów wodoru [Catalá, 2009]. Reakcje tej fazy zachodzą wielokrotnie, aż do momentu gdy nastąpi faza terminacji [Bartosz, 2013].

Utlenianie kwasów tłuszczowych może być powodowane także przez tlen singletowy, w wyniku czego również powstają wodoronadtlenki lipidowe. Tlen singletowy uderza w wiązanie podwójne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w wyniku czego powstaje endonadtlenek lipidowy, który następnie może zostać przekształcony w $LOOH$ [Yalcinkaya i wsp., 2019]. W fazie terminacji będącej ostatnim etapem peroksydacji lipidów wolne rodniki reagują ze sobą, co prowadzi do powstania stabilnego produktu niebędącego wolnym rodnikiem [Su i wsp., 2019].



Produktami tych reakcji mogą być dimery kwasów tłuszczowych jak również oksy- i hydroksykwasów tłuszczowych. Związki te mogą ulegać dalszym przekształceniom m.in. na drodze β -eliminacji, w wyniku czego powstają różne produkty końcowe takie jak związki epoksydowe, np. 2,3-epoksy-4-hydroksynonenal; nienasycone aldehydy α i β , np. 4-hydroksynonenal (4-HNE) oraz aldehydy nasycone, np. heksanal, pentanal. W przypadku gdy grupa nadtlenkowa jest zlokalizowana wewnątrz łańcucha kwasu tłuszczowego następuje

cyklizacja rodnika i powstaje cykliczny nadtlenek. Cykliczny nadtlenek może zostać przekształcony w rodnik nadtlenkowy lub w wyniku ponownej cyklizacji do bicyklicznego nadtlenku, a ten w wyniku dalszych reakcji utleniania i redukcji przekształca się w cykliczny endonadtlenek. Dalsze przemiany powodują konwersję bicyklicznej grupy nadtlenkowej, w wyniku czego powstają izoprostany oraz dialdehyd malonowy (MDA), który jest najczęściej oznaczanym markerem oksydacyjnych uszkodzeń lipidów [Gutteridge i Halliwell, 1990; Ayala i wsp., 2014].



Rys. 3. Wolnorodnikowa peroksydacja lipidów (wg Skutnik-Radziszewska i Zalewska [2020], zmodyfikowane)

L· - rodnik alkilowy, LO· - rodnik alkoksylowy, LOO· - rodnik nadtlenkowy, O₂ – tlen cząsteczkowy, LH- wielonienasycony kwas tłuszczowy

1.2.3.2. Oksydacyjne uszkodzenia białek

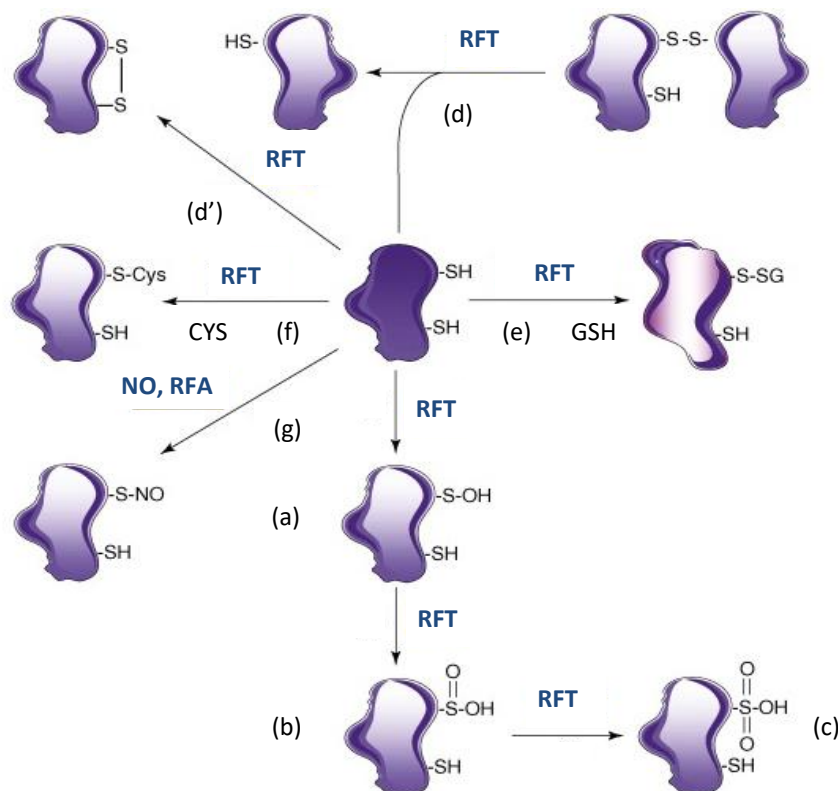
Utlenianie białka definiuje się jako kowalencyjną modyfikację białka powodowaną bezpośrednio przez RFT lub pośrednio przez produkty uboczne procesów oksydacyjnych [El- Maarouf-Bouteau i wsp., 2013]. Taka modyfikacja, poza zmianami w strukturze, może skutkować zaburzeniami funkcji transportowej, regulacyjnej czy metabolicznej utlenionego białka [Demidchik, 2015]. Oksydacyjne modyfikacje białek mogą dotyczyć łańcucha głównego jak również reszt łańcuchów bocznych aminokwasów. Do modyfikacji białek zaliczamy karbonylację, nitrozylację, glutationylację oraz tworzenie wiązań disiarczkowych wewnątrz- i między białkowymi [Xie i wsp., 2019; Hasanuzzaman i wsp., 2020a]. Uważa się, że większość oksydacyjnych uszkodzeń białek jest nieodwracalna, z wyjątkiem utleniania aminokwasów zawierających siarkę, takich jak cysteina oraz metionina. Nieodwracalne modyfikacje są odpowiedzialne za trwałą utratę funkcji uszkodzonych białek, podczas gdy odwracalne modyfikacje mogą odgrywać rolę w regulacji redoks [Demidchik, 2015].

Karbonylacja białka obejmuje utlenianie zarówno szkieletu białka, jak również łańcuchów bocznych aminokwasów, w szczególności histydyny, argininy, lizyny, proliny, treoniny oraz tryptofanu, dając pochodne ketonowe lub aldehydowe [El-Maarouf-Bouteau i wsp., 2013]. Bezpośrednie oddziaływanie RFT, głównie $\cdot\text{OH}$ z białkami może prowadzić do rozerwania wiązań peptydowych i ostatecznie do fragmentacji łańcucha polipeptydowego. Przerwanie łańcucha białkowego powoduje powstanie grup karbonylowych i zachodzi w wyniku oddziaływania RFT z resztą prolinową, aspartyłową bądź glutamylową. Utlenianie cząsteczki białka wiąże się z oderwaniem atomu wodoru przy węglu α aminokwasu w wyniku czego powstaje rodnik alkilowy. Może on reagować z tlenem, co prowadzi do powstania rodnika alkilnadotlenkowego i dalej alkilowodonoradotlenku. W wyniku dalszych modyfikacji powstaje rodnik alkoksylowy, który następnie może przejść w hydroksylowaną przy węglu α resztę aminokwasową, bądź może powodować fragmentację łańcucha białkowego. Rozerwanie łańcucha polipeptydowego może nastąpić w wyniku α -amidacji lub diamidacji [Ambrożewicz i Bielawska, 2016].

Dodatkowo karbonylacja białka może również następować w wyniku reakcji białka z produktami peroksydacji lipidów (m.in. 4-HNE, MDA) oraz przez sprzęganie białek z cukrami redukującymi (glikacja) lub produktami ich utleniania (glikooksydacja). Karbonylacja należy do najpowszechniej występujących modyfikacji oksydacyjnych białek

i w związku z tym jest najczęściej oznaczanym markerem utleniania tych makrocząsteczek [Anjum i wsp., 2015].

Najbardziej podatne na utlenienie są aminokwasy zawierające grupy tiolowe i siarkę. Cysteina i metionina są najbardziej wrażliwe na utlenienie przez $^1\text{O}_2$ oraz $\text{HO}^\cdot$. Enzymy zawierające centra żelazowo-siarkowe w wyniku utlenienia przez $\text{O}_2^\cdot$ ulegają nieodwracalnej dezaktywacji [Das i Roychoudhury, 2014].



Rys. 4. Oksydacyjne modyfikacje grup tiolowych białek (wg Dalle-Donne i wsp. [2009], zmodyfikowane)

(a) kwas sulfenowy; (b) kwas sulfinowy; (c) kwas sulfonowy; (d) tworzenie wiązań disiarczkowych międzybiałkowych; (d') tworzenie wiązań disiarczkowych wewnątrzcząsteczkowych; (e) tworzenie mieszanego disiarczku między grupą tiolową białka a glutationem; (f) tworzenie mieszanego disiarczku między grupą tiolową białka a cysteina; (g) S-nitrozylacja białka przez NO i reaktywne formy azotu (RFA); RFT – reaktywne formy tlenu; CYS – cysteina, GSH – glutation forma zredukowana

W wyniku działania RFT następuje oderwanie atomu wodoru od reszty cysteiny, co powoduje powstanie rodnika tiolowego, który łącząc się z drugim rodnikiem tiolowym tworzy mostki dwusiarczkowe [Gill i Tuteja, 2010]. Utlenianie grup tiolowych białek może skutkować powstawaniem mostków disiarczkowych między grupami $-\text{SH}$ różnych białek (wiązania

disiarczkowe międzybiałkowe) lub w obrębie tego samego białka (wiązania disiarczkowe wewnątrzcząsteczkowe). Ponadto, utlenianie cysteiny przez RFT może generować utlenione pochodne kwasu sulfenowego (CysSOH), kwasu sulfinowego (CysSO₂H) lub kwasu sulfonowego (CysSO₃H) (Rys. 4). Głównymi produktami utleniania metioniny są diastereoizomery S i R sulfotlenku metioniny (MetSO), a dalsze modyfikacje mogą powodować tworzenie się sulfonu (MetSO₂) [El-Maarouf-Bouteau i wsp., 2013].

Proces S-nitrozylacji jest odwracalną modyfikacją potranslacyjną, która polega na przyłączeniu ugrupowania NO (N=O) do grupy tiolowej białka cysteiny, w wyniku czego powstają S-nitrozotiole. Tlenek azotu może występować w kilku formach w tym jako kation nitrozoniowy (NO⁺), jako anion nitroksylowy (NO⁻) oraz jako rodnik tlenku azotu (NO[•]), przy czym wszystkie wykazują różną reaktywność z grupami tiolowymi [Huang i wsp., 2019; Zhang i Liao, 2019].

S-glutationylacja jest również odwracalną modyfikacją potranslacyjną i polega na tworzeniu mieszanych disiarczków pomiędzy glutationem, a grupami tiolowymi białek [Corpas i wsp., 2022]. Tworzenie mieszanych disiarczków białko-S-S- glutation może zachodzić w dwojaki sposób. Po pierwsze, tworzenie takich związków może występować pomiędzy zredukowanym glutationem, a produktami powstałymi w wyniku utlenienia reszt tiolowych białek jak rodnik tiolowy, S-nitrozotiole czy kwas sulfenowy. Po drugie, S-glutationylacja może zachodzić na skutek oddziaływania pomiędzy utlenionym glutationem, a grupami sulfhydrylowymi białek [Rodacka i wsp., 2014].

1.2.3.3. Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych

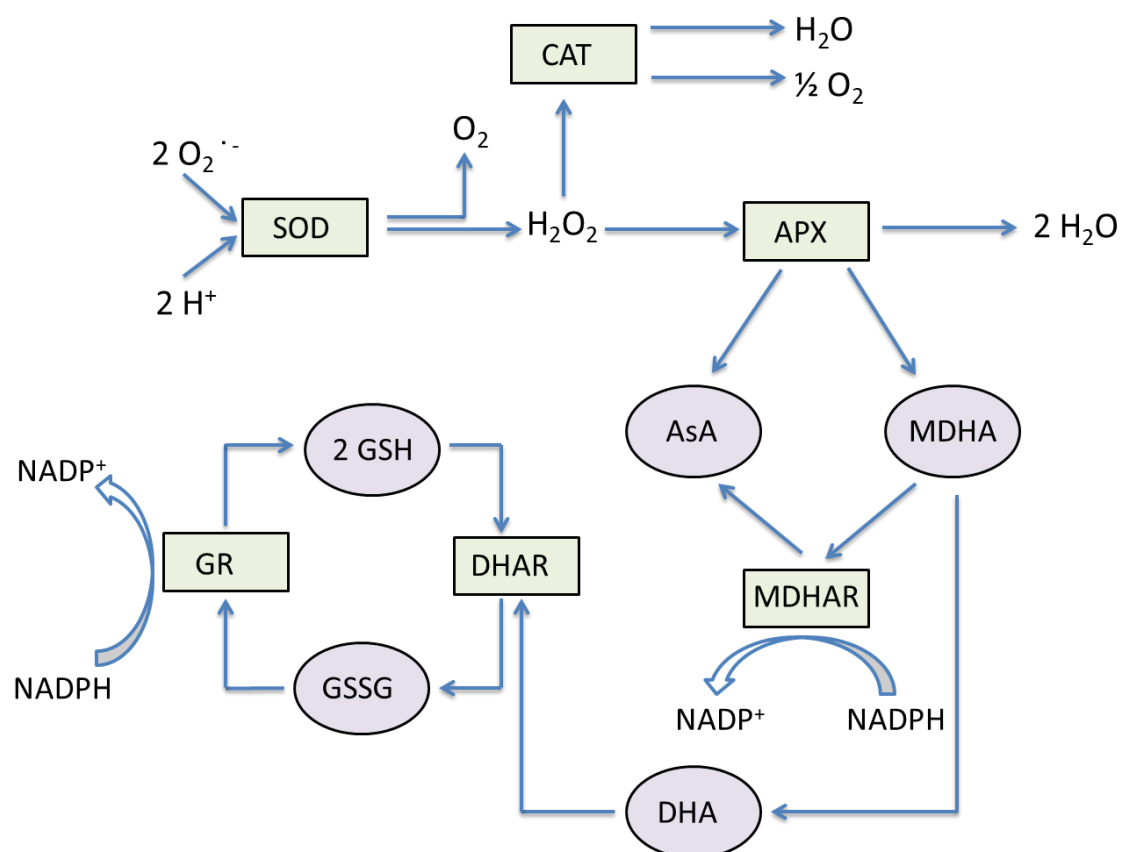
Reaktywne formy tlenu mogą powodować oksydacyjne uszkodzenia jądrowego, mitochondrialnego i chloroplastowego DNA. Uważa się, że mitochondrialne i chloroplastowe DNA są bardziej podatne na uszkodzenia oksydacyjne niż DNA jądrowe z powodu braku białka ochronnego, histonów i bliskiej lokalizacji miejsc generowania RFT. Jakikolwiek uszkodzenie DNA może powodować zmiany w kodowanych białkach, skutkujące ich nieprawidłowym działaniem lub całkowitą inaktywacją. Anionorodnik ponadtlenkowy oraz nadrtlenek wodoru nie reagują z kwasami nukleinowymi w ogóle, natomiast tlen singletowy oddziałuje głównie z guaniną [Møller i wsp., 2007; Sharma i wsp., 2012]. Rodnik hydroksylowy jest głównym czynnikiem uszkadzającym dla kwasów nukleinowych, reaguje ze zasadami purynowymi i pirymidynowymi, a także szkieletem cukrowym - dezoksyrybozą [Gill i Tuteja, 2010].

Oddziaływanie $\text{HO}^\bullet$ na zasady DNA polega na ogół na jego przyłączeniu do węgla przy wiązaniu podwójnym, podczas gdy uszkodzenie cukru wynika głównie z usuwania wodoru z pozycji C4' dezoksyrybozy, co prowadzi do powstania rodnika dezoksyrybozy i może prowadzić do pęknięć pojedynczej nici. Uszkodzenia oksydacyjne kwasów nukleinowych nie tylko przez bezpośrednie oddziaływanie z RFT, ale także mogą być wywoływane przez produkty generowane w wyniku oddziaływania RFT na inne makrocząsteczki. Przykładem tego typu oddziaływania jest reakcja MDA z resztami guanidyny w DNA, co powoduje powstanie dodatkowej struktury pierścieniowej - adduktu pirymidopurynonowego [Møller i wsp., 2007; Roldán-Arjona i Ariza, 2009].

1.3. System antyoksydacyjny roślin

Utrzymanie równowagi między wytwarzaniem i usuwaniem RFT jest kluczowe dla ograniczenia występowania stresu oksydacyjnego u roślin. Umożliwia to występujący w komórkach roślinnych rozbudowany system antyoksydacyjny obejmujący współpracujące ze sobą enzymy antyoksydacyjne jak i nieenzymatyczne antyoksydanty (Rys. 5).

Do nieenzymatycznych antyoksydantów zaliczamy głównie metabolity o niskiej masie cząsteczkowej takie jak: askorbinian, glutation, α -tokoferol, karotenoidy czy związki fenolowe. Do enzymatycznych zaliczamy dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), peroksydazy klasy III (POX), a także enzymy uczestniczące w cyklu askorbinian-glutation: peroksydazę askorbinianową (APX), reduktazę dehydroaskorbinianową (DHAR), reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDHAR) oraz reduktazę glutationową (GR) [Dvořák i wsp., 2021].

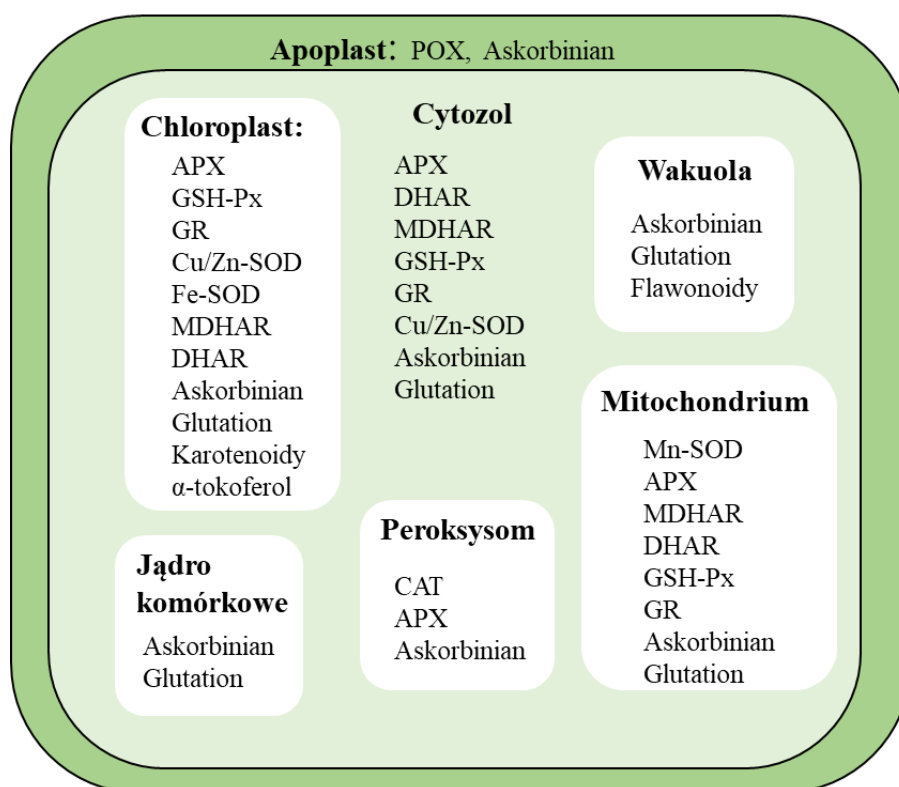


Rys. 5. Główne mechanizmy usuwania O_2^- oraz H_2O_2 (wg Grob i wsp. [2013], zmodyfikowane)

O_2^- - anionorodnik ponadtlenkowy, H_2O_2 - nadtlenek wodoru, SOD - dysmutaza ponadtlenkowa, APX - peroksydaza askorbinianowa, CAT - katalaza, GR - reduktaza glutationowa, DHAR - reduktaza dehydroaskorbinianowa, MDHAR - reduktaza monodehydroaskorbinowa, AsA - askorbinian, MDHA - monodehydroaskorbinian, DHA - dehydroaskorbinian, GSH - glutation, GSSG - disulfid glutationu, $NADP^+$ - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma utleniona, NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana

Enzymatyczne i nieenzymatyczne antyoksydanty zlokalizowane są w różnych obszarach komórki, zarówno w cytozolu jak i chloroplacie, mitochondrium, peroksysomie, wakuoli, jądrze komórkowym, a także apoplacie (Rys. 6).

W warunkach bezstresowych tworzenie i usuwanie RFT pozostaje we względnej równowadze. Występowanie stresu abiotycznego i biotycznego zaburza równowagę metaboliczną komórek, prowadząc zazwyczaj do wzmożonej produkcji RFT. Sprawne funkcjonowanie systemu antyoksydacyjnego jest w takich warunkach szczególnie istotne dla komórek roślinnych [Caverzan i wsp., 2016].



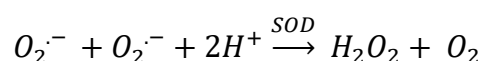
Rys. 6. Rozmieszczenie głównych przeciwutleniaczy w komórce roślinnej (wg Racchi, [2013], zmodyfikowane)

APX - peroksydaza askorbinianowa, GSH-PX - peroksydaza glutationowa, GR - reduktaza glutationowa, SOD - dysmutaza nadrodnikowa, CAT - katalaza, DHAR - reduktaza dehydroaskorbinianowa, MDHAR - reduktaza monodehydroaskorbinowa

1.3.1. Enzymy antyoksydacyjne

1.3.1.1. Dysmutaza nadrodnikowa

Dysmutaza nadrodnikowa (SOD, EC 1.15.1.1) jest metaloproteiną, która katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika nadrodnikowego, w wyniku której powstaje nadtlenek wodoru oraz tlen cząsteczkowy [Racchi, 2013].

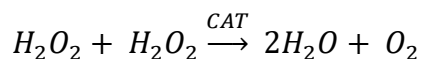


Enzym ten jest uznawany za kluczowy element systemu obrony przed stresem oksydacyjnym u roślin [Rajput i wsp., 2021] i stanowi pierwszą linię obrony przed RFT [Jaleel i wsp., 2009]. Na podstawie obecności kofaktora metalu w centrum aktywnym wyróżnia się 3 izoformy SOD: miedziowo-cynkową (Cu/Zn-SOD), manganową (Mn-SOD) oraz żelazową (Fe-SOD).

Izoforma Cu/Zn- SOD występuje najliczniej i zlokalizowana jest w chloroplastach, cytozolu, peroksysomach [Pandhair i Sekhon, 2006], a także w apoplacie. Izoforma Mn-SOD występuje w macierzy mitochondrialnej, natomiast Fe-SOD zlokalizowano w chloroplastach [Racchi, 2013]. Powstający w reakcji katalizowanej przez SOD H_2O_2 jest dalej metabolizowany przy udziale katalazy i peroksydaz [Dvořák i wsp., 2021].

1.3.1.2. Katalaza

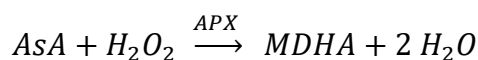
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) jest powszechnie występującą oksydoreduktazą zawierającą żelazo w miejscu aktywnym, która przekształca nadtlenuk wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego [Bhaduri i Fulekar, 2012].



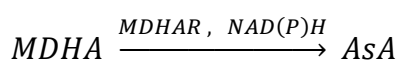
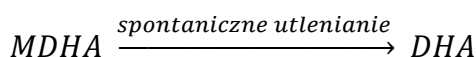
Katalazy roślinne można podzielić na 3 klasy. Katalazy klasy I zlokalizowane w tkankach fotosyntetyzujących biorą udział w usuwaniu H_2O_2 wytwarzanego podczas procesów fotooddechania w peroksysomach. Katalazy klasy II znajdują się w tkankach naczyń i uczestniczą w procesie lignifikacji, natomiast katalazy klasy III w dużych ilościach występują w nasionach oraz młodych roślinach, podczas gdy są prawie nieobecne w późniejszych stadiach rozwoju. Ich funkcja związana jest z usuwaniem H_2O_2 dostarczanego w procesie degradacji kwasów tłuszczowych w cyklu glioksydanowym w glioksysomach [Racchi, 2013; Huchzermeyer i wsp., 2022]. Połączone działanie SOD i CAT ogranicza powstawanie bardziej toksycznego i reaktywnego $HO^\bullet$ [Jaleel i wsp., 2009].

1.3.1.3. Peroksydaza askorbinianowa

Peroksydaza askorbinianowa (APX, EC 1.11.1.11) jest peroksydazą hemową klasy I licznie występującą w komórkach roślinnych m.in. w cytoplazmie i chloroplastach, a także w mitochondriach i peroksysomach [Rajput i wsp., 2021]. Enzym ten katalizuje redukcję nadtlenu wodoru do wody z wytworzeniem monodehydroaskorbininu (MDHA), wykorzystując askorbinian (AsA) jako donora elektronów [Racchi, 2013]. Peroksydaza askorbinianowa jest niestabilna pod nieobecność askorbinianu i traci swoją aktywność gdy jego stężenie spadnie poniżej 20 μM [Rajput i wsp., 2021].



Regeneracja askorbinianu z monodehydroaskorbinianu powstającego w wyniku aktywności APX zachodzi poprzez szereg reakcji cyklu askorbinian-glutation [Kuźniak, 2002]. Wytworzony MDHA jest niestabilny i ulega spontanicznemu utlenianiu do dehydroaskorbinianu (DHA) lub może zostać przekształcony enzymatycznie przy udziale reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR), która katalizuje zależną od NAD(P)H redukcję MDHA do askorbinianu. Aktywność MDHAR została opisana w chloroplastach, mitochondriach, cytozolu i peroksysomach i odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu puli askorbinianu w roślinach [Huchzermeyer i wsp., 2022].



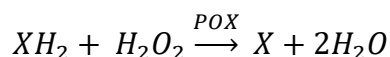
Reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR) katalizuje redukcję DHA do AsA z wykorzystaniem glutationu (GSH) jako donora elektronów, który jest utleniany do disiarczku glutationu (GSSG). Jeśli DHA nie zostanie zredukowany w odpowiednim czasie może ulec spontanicznej, ale nieodwracalnej hydrolizie do kwasu 2,3-diketogulonowego. Z tego powodu aktywność DHAR ma kluczowe znaczenie dla utrzymywania wystarczającej puli askorbinianu w komórce roślinnej [Rajput i wsp., 2021].

Pula zredukowanego glutationu jest odzyskiwana dzięki aktywności reduktazy glutationowej (GR) w reakcji zależnej od NADPH [Dvořák i wsp., 2021]. Enzym ten uczestniczy w redukowaniu wiązania disiarczkowego w disiarczku glutationu, co jest bardzo istotne w utrzymaniu wysokiego stosunku glutationu zredukowanego do utlenionego w komórce roślinnej [Das i Roychoudhury, 2014]. Największą aktywność GR stwierdzono w chloroplastach, ale odnotowano ją również w cytozolu, jądrze, mitochondriach i peroksysomach [Rajput i wsp., 2021].

1.3.1.4. Peroksydazy klasy III

Peroksydazy roślinne klasy III (POX, EC 1.11.1.7) są szeroko rozpowszechnionymi w organizmach żywych oksydoreduktazami zawierającymi żelazo, zlokalizowanymi w cytozolu, wakuoli, ścianie komórkowej oraz przestrzeni pozakomórkowej [Bhaduri i Fulekar, 2012]. Są glikoproteinami złożonymi z pojedynczego polipeptydu zawierającego około 300–350 aminokwasów (zależnie od gatunku rośliny) o masie cząsteczkowej od 33 do

55 kDa. Większość POX klasy III to monomery. Peroksydazy te katalizują utlenianie różnych substratów, w tym związków fenolowych, z wykorzystaniem H_2O_2 [Jouili i wsp., 2011].



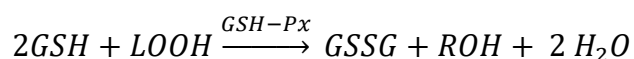
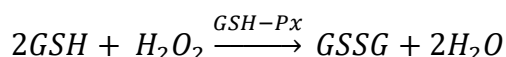
Peroksydazy klasy III reagują głównie ze związkami zawierającymi grupę bądź grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia aromatycznego. Jako produkty powstają rodniki fenoksyłowe, które ulegając sprzęganiu tworzą polimery.

Jedną z kluczowych funkcji peroksydaz w roślinach jest ich udział w lignifikacji ścian komórkowych. Substratami wykorzystywanymi w tym procesie są alkohol *p*-kumaryłowy, synapylowy i koniferylowy. Proces lignifikacji jest dwuetapowy: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Peroksydaza uczestniczy w pierwszym etapie, który polega na utlenianiu wymienionych substratów do odpowiadających im rodników. W kolejnym etapie w wyniku nieenzymatycznego ich sprzęgania powstaje lignina [Hiraga i wsp., 2001; Pandey i wsp., 2017].

Peroksydazy klasy III obniżają poziom H_2O_2 wewnątrz komórki, co czyni je elementem systemu antyoksydacyjnego przeciwko różnym stresom biotycznym i abiotycznym [Kidwai i wsp., 2020]. Pełnią one różnorodne funkcje w cyklu życiowym roślin. Poza lignifikacją biorą udział również w innych procesach modyfikacji ściany komórkowej (sieciowaniu, rozluźnianiu i usztywnianiu ściany komórkowej), a także w metabolizmie RFT, gojeniu się ran, we wzroście i dojrzewaniu owoców, kiełkowaniu nasion czy katabolizmie hormonów [Jouili i wsp., 2011; Rajput i wsp., 2021].

1.3.1.5. Peroksydaza glutationowa

Peroksydazy glutationowe (GSH-Px, EC 1.11.1.9) stanowią dużą rodzinę izoenzymów, które jak wykazano obecne są w różnych kompartmentach komórkowych. Peroksydazy glutationowe to niehemowe monomeryczne białka, które zawierają cysteinę w miejscu aktywnym i katalizują redukcję H_2O_2 lub wodoronadtlenków organicznych, w tym, wodoronadtlenków lipidowych do wody lub odpowiednich alkoholi przy użyciu glutationu bądź tioredoksyny (TRX), które w wyniku tej reakcji ulegają utlenieniu [Ahmad i wsp., 2010; Gill i Tuteja, 2010; Bela i wsp., 2015].



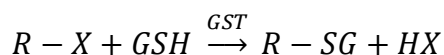
Uważa się, że struktura monomeru umożliwia temu enzymowi bezpośrednią redukcję nadtlenków lipidowych związanych z błoną. Zatem roślinne GSH-Px mogą pełnić rolę w utrzymywaniu integralności błony komórkowej, zwłaszcza w różnych warunkach stresowych [Bela i wsp., 2022].

Sugeruje się, że jako czynnik redukujący GSH-Px wykorzystują TRX skuteczniej niż GSH, ale mogą być również łącznikiem między tymi dwoma układami redoks. Uważa się, że system regeneracji tioredoksyny jest znacznie bardziej wydajny niż glutationu.

Analizy lokalizacji subkomórkowej u różnych gatunków roślin wykazały, że GSH-Px zlokalizowane są w chloroplastach, mitochondriach, cytoplazmie, jądrze komórkowym, błonach retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego, a także w regionach zewnątrzkomórkowych [Bela i wsp., 2022].

1.3.1.6. S-transferaza glutationowa

Roślinne S-transferazy glutationowe (GST, EC 2.5.1.18) stanowią zróżnicowaną grupę wielofunkcyjnych enzymów. Katalizują reakcję sprzęgania między grupą tiolową glutationu a związkami elektrofilowymi lub hydrofobowymi tworząc bardziej rozpuszczalne pochodne [Gallé i wsp., 2019].



Substratami uczestniczącymi w reakcji katalizowanej przez GST mogą być związki pochodzenia egzogenne jak np. ksenobiotyki, ale również pochodzenia endogenne związane z przebiegiem procesów fizjologicznych np. produkty peroksydacji lipidów [Dixon i wsp., 2002]. Powstałe koniugaty są sekwestrowane w wakuolach, bądź są eksportowane z komórek przez błonowe układy pomp zależnych od ATP [Kumar i Trivedi, 2018]. Transferazy glutationowe mogą pełnić funkcje niekatalityczne i działać jako nieenzymatyczne białka nośnikowe umożliwiając wewnątrzkomórkowy transport związków endogennych takich jak kwas indolo-3-octowy, kwas naftalenooctowy czy antocyjany [Conn i wsp., 2008].

Wiele roślinnych GST wykazuje aktywność peroksydazy zależnej od GSH i bierze udział w redukcji organicznych wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych czy kwasów nukleinowych do odpowiednich monohydroksyalkoholi. Reakcja ta odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu degradacji organicznych wodoronadtlenków do cytotoksycznych pochodnych aldehydów [Shahrtash, 2013; Nianiou- Obeidat i wsp., 2017].

S-transferazy glutationowe są na ogół białkami cytoplazmatycznymi, choć opisane zostały również izoformy mikrosomalne, plastydowe, jądrowe i apoplastyczne [Gill i Tuteja, 2010]. Wśród GST można wyróżnić kilka odrębnych klas: Tau, Phi, Lambda, Theta oraz Zeta [Gallé i wsp., 2019]. S-transferazy glutationowe są bardzo licznymi białkami, w niektórych przypadkach stanowią ponad 1% rozpuszczalnych białek w komórkach roślinnych. Są hetero- lub homodimerami zbudowanymi z podjednostek o masie około 25 kDa. Na każdej podjednostce enzymu znajdują się 2 miejsca wiązania substratu: miejsce H, do którego przyłączany jest substrat hydrofobowy oraz miejsce G, gdzie wiązany jest glutation [Rajput i wsp., 2021].

GST odgrywają rolę w detoksykacji herbicydów, homeostazie hormonalnej, sekwestracji antocyjanów, metabolizmie tyrozyny, detoksykacji wodoronadtlenku, regulacji apoptozy oraz w odpowiedziach roślin na stresy biotyczne i abiotyczne [Gill i Tuteja, 2010].

1.3.2. Antyoksydanty nieenzymatyczne

1.3.2.1. Askorbinian

Askorbinian (AsA) jest ważnym elementem roślinnego systemu antyoksydacyjnego i jednym z najlepiej przebadanych przeciwutleniaczy [Jaleel i wsp., 2009]. Uważany jest za najsilniejszy przeciwutleniacz ze względu na jego zdolność do oddawania elektronów w wielu reakcjach enzymatycznych i nieenzymatycznych [Racchi, 2013]. Askorbinian jest syntetyzowany w mitochondriach na szlaku Smirnov-Wheeler w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę L-gulonolaktonową- γ -laktonową [Huchzermeyer i wsp., 2022], a następnie jest transportowany do innych składników komórki. Najczęściej AsA występuje w komórce w postaci zredukowanej (90% puli askorbinianu) [Ahmad i wsp., 2010]. Askorbinian występuje we wszystkich tkankach roślinnych, zwykle jego poziom jest wyższy w tkankach fotosyntetyzujących oraz w merystemach. Uważa się, że 30-40% całkowitego AsA znajduje się w chloroplastach [Shao i wsp., 2008]. Oprócz tego że stanowi substrat redukujący dla APX, może także bezpośrednio usuwać $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz $\text{HO}^{\cdot}$, a także regenerować tokoferol z rodnika tokoferoksylogowego zapewniając w ten sposób ochronę błony komórkowej. Działa jako kofaktor enzymów m. in. deepoksydazy wiolaksantyny, enzymu uczestniczącego w cyklu ksantofilowym zaangażowanym w ochronę komórek roślinnych przed fotoinhibicją [Jaleel i wsp., 2009; Ahmad i wsp., 2010]. Poprzez synergiczne działanie z innymi przeciwutleniaczami minimalizuje szkody powodowane procesami oksydacyjnymi [Shao

i wsp., 2008]. Askorbinian nie tylko jest zaangażowany w ochronę komórek przed uszkodzeniami powodowanymi przez RFT, ale także uczestniczy w kontroli cyklu komórkowego czy w procesach wzrostu i różnicowania [Huchzermeyer i wsp., 2022].

1.3.2.2. Glutation

Glutation (GSH) jest tripeptydem tiolowym (γ -glutamylcysteinylglicyna), który występuje w komórce głównie w formie zredukowanej. Ten antyoksydant o niskiej masie cząsteczkowej obecny jest w prawie wszystkich przedziałach komórkowych takich jak: cytoplazma, retikulum endoplazmatyczne, wakuola, chloroplast, mitochondria oraz apoplast [Racchi, 2013], a jego największe stężenie odnotowano w chloroplastach [Jaleel i wsp., 2009]. Glutation syntetyzowany jest w dwóch zależnych od ATP reakcjach enzymatycznych w cytozolu i chloroplastach. W pierwszym etapie z glutaminianu i cysteiny tworzona jest γ -glutamylcysteina w reakcji katalizowanej przez ligazę glutaminianowo-cysteinową znaną również jako syntetaza γ -glutamylcysteinu. Następnie syntetaza glutationu katalizuje dodanie glicyny do γ -glutamylcysteinu [Gallé i wsp., 2019]. Glutation bierze udział w regulacji poziomu H_2O_2 , reaguje nieenzymatycznie z 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$ oraz $HO^{\cdot}$ [Pandhair i Sekhon, 2006]. Odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu, rozwoju oraz tolerancji roślin na stres. Jest zaangażowany w wiele procesów takich jak: starzenie się komórek, programowana śmierć komórek i ich podział [Huchzermeyer i wsp., 2022]. Stanowiąc substrat do syntezy fitochelatyn GSH odgrywa kluczową rolę w detoksykacji metali ciężkich, a jako substrat dla GST bierze udział w detoksykacji endo- i egzogennych związków toksycznych. Ze względu na odwracalną przemianę pomiędzy formą zredukowaną a utlenioną oraz stosunkowo wysokie stężenie w komórce glutation jest jednym z najważniejszych buforów redoks. Wysoki stosunek GSH/GSSG utrzymywany przez zwiększoną syntezę GSH oraz redukcję GSSG katalizowaną przez GR może zapewnić skuteczną ochronę przed akumulacją RFT wywołaną stresem [Das i Roychoudhury, 2014].

1.3.2.3. Tokoferole

Tokoferole powszechnie znane jako witamina E są lipofilowymi przeciwutleniaczami, syntetyzowanymi tylko przez organizmy fotosyntetyzujące [Caretto i wsp., 2010]. Są syntetyzowane w chloroplastach i protoplastach, a obecne są w błonach komórkowych, zwłaszcza w błonach tylakoidów chloroplastów. Występowanie witaminy E w tkankach niefotosyntetyzujących takich jak korzenie, nasiona czy tkanki etiolowane, może sugerować

syntezę tokoferolu również w tkankach nie zawierających chlorofilu, ale do tej pory nie została opisana biosynteza tokoferolu w tych tkankach. Przypuszcza się, że może być on przenoszony z plastydów. Struktura i lokalizacja tokoferoli determinuje ich funkcję jako stabilizatory błon komórkowych, a także składniki chroniącego lipidy błonowe przed uszkodzeniem [Jaleel i wsp., 2009]. Podstawową jednostką strukturalną tokoferolu jest hydrofilowa głowa złożona z pierścienia chromanolu oraz hydrofobowy łańcuch boczny składający się z 16 atomów węgla, który pochodzi z grupy prenylowej [Caretto i wsp., 2010]. Wyróżnia się cztery izoformy tokoferolu: tokoferol α , β , γ i δ , które różnią się od siebie liczbą i położeniem grupy metylowej (CH_3) na pierścieniu chromanolu. Izoforma z trzema grupami CH_3 w pozycjach 5, 7 i 8 została nazwana α -tokoferolem. Związki z dwiema grupami CH_3 przyłączonymi w pozycjach 5 i 8 pierścienia znane są jako β -tokoferol, a w pozycji 7 i 8 znane jako γ -tokoferol. Związek z tylko jedną grupą CH_3 w pozycji 8 pierścienia to δ -tokoferol. Uważa się, że ze wszystkich izoform α -tokoferol jest najbardziej aktywnym biologicznym przeciwutleniaczem. Dominuje on w tkankach fotosyntetycznych, natomiast w nasionach głównym składnikiem jest γ -tokoferol. Właściwości przeciwutleniające tokoferoli wynikają z ich zdolności do wychwytywania wodoronadtlenków lipidowych i wygaszania RFT m. in. $^1\text{O}_2$, przez co chronią lipidy przed utlenieniem. Tokoferol przerywa łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów poprzez oddanie atomu wodoru do wodoronadtlenków lipidowych, które przekształcają się w obojętne hydrokwasy tłuszczowe lub inne pochodne. W wyniku oddania atomu wodoru tokoferol przekształca się w rodnik tokoferolu. Askorbinian kwas redukuje rodnik tokoferolu z powrotem do tokoferolu [Ali i wsp., 2022].

1.3.2.4. Karotenoidy

Karotenoidy zaliczane są do antyoksydantów lipofilowych, które są na ogół syntetyzowane i zlokalizowane w plastydach. Ich działanie przeciwutleniające opiera się na zdolności do wygaszania $^1\text{O}_2$ oraz wychwytywania wolnych rodników takich jak $\text{LOO}^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$ oraz $\text{O}_2^{\bullet-}$. Na aktywność antyoksydacyjną karotenoidów ma wpływ układ wiązań sprzężonych w łańcuchu polienowym. Za najsilniejsze antyoksydanty z tej grupy uznaje się α - i β -karoten oraz zeaksantynę [Ahmad i wsp., 2010; Racchi, 2013]. Właściwości przeciwutleniające karotenoidów związane są z zabezpieczeniem aparatu fotosyntetycznego. Może się to odbywać poprzez reakcję z produktami peroksydacji lipidów w celu zakończenia rodnikowych reakcji łańcuchowych, poprzez reagowanie z chlorofilem w stanie trypletowym bądź wzbudzonymi cząsteczkami chlorofilu w celu zapobiegania powstawania $^1\text{O}_2$, przez wychwytywanie $^1\text{O}_2$

i rozpraszanie energii w postaci ciepła, a także przez rozpraszanie nadmiaru energii wzbudzenia poprzez cykl ksantofilowy [Pandhair i Sekhon, 2006; Huchzermeyer i wsp., 2022].

1.3.2.5. Związki fenolowe

Związki fenolowe są szeroko rozpowszechnioną i najliczniejszą grupą różnorodnych metabolitów wtórnych w świecie roślin. Mają wspólną strukturę chemiczną obejmującą jeden lub więcej pierścieni aromatycznych z jednym lub większą liczbą podstawników hydroksylowych. Ze względu na ich ogromne zróżnicowanie istnieje kilka sposobów klasyfikacji związków fenolowych biorąc pod uwagę ich właściwości chemiczne, liczbę pierścieni aromatycznych, liczbę atomów węgla w szkielecie, liczbę grup hydroksylowych, rozpuszczalność, itp. Do głównych grup związków fenolowych można zaliczyć kwasy fenolowe, flawonoidy, taniny oraz rzadziej spotykane stilbeny oraz lignany [Dai i Mumper, 2010; Kołton i wsp., 2022]. Kwasy fenolowe można podzielić na dwie grupy: pochodzące od kwasu hydroksybenzoesowego oraz kwasy hydroksycynamonowego. Flawonoidy stanowią najbardziej zróżnicowaną grupą związków fenolowych, i dzielą się na flawony, flawonole, flawanole, flawanony, izoflawony oraz antocyjany [Zhang i wsp., 2022]. Związki fenolowe powstają w wielu szlakach biosyntezy, jednakże źródłem związków wyjściowych do ich syntezy są glikoliza i cykl pentozofosforanowy będące elementami metabolizmu pierwotnego roślin. Fosfoenolopirogronian pochodzący z glikolizy oraz erytrozo-4-fosforan pochodzący z cyklu pentozofosforanowego biorą udział w syntezie kwasu szikimowego. W wyniku dalszych przemian powstają aminokwasy aromatyczne, w tym L-feniloalanina, która przy udziale amoniakolizy L-feniloalaniny (PAL) zostaje przekształcona do kwasu cynamonowego. W ten sposób rozpoczyna się szlak fenylpropanoidowy, w wyniku którego powstaje p-kumaroilo-CoA. Związek ten jest wykorzystywany w szlaku syntezy flawonoidów lub po kondensacji z 3 cząsteczkami kwasu malonowego tworzy bardziej złożone związki fenolowe jak stilbeny [Kołton i wsp., 2022].

Związki fenolowe mogą występować jako wolne cząsteczki – aglikony, a także w formie związanej z cukrami jako glikozydy. Cukrem najczęściej biorącym udział w tworzeniu glikozydów jest glukoza, chociaż występują również galaktoza, ramnoza, ksyloza i arabinoza, a także disacharydy, takie jak rutoza [Rice-Evans i wsp., 1997].

Znaczna część związków fenolowych wykazuje silne właściwości przeciwrodnikowe oraz przeciwutleniające wchodząc w skład nieenzymatycznego systemu obrony antyoksydacyjnej

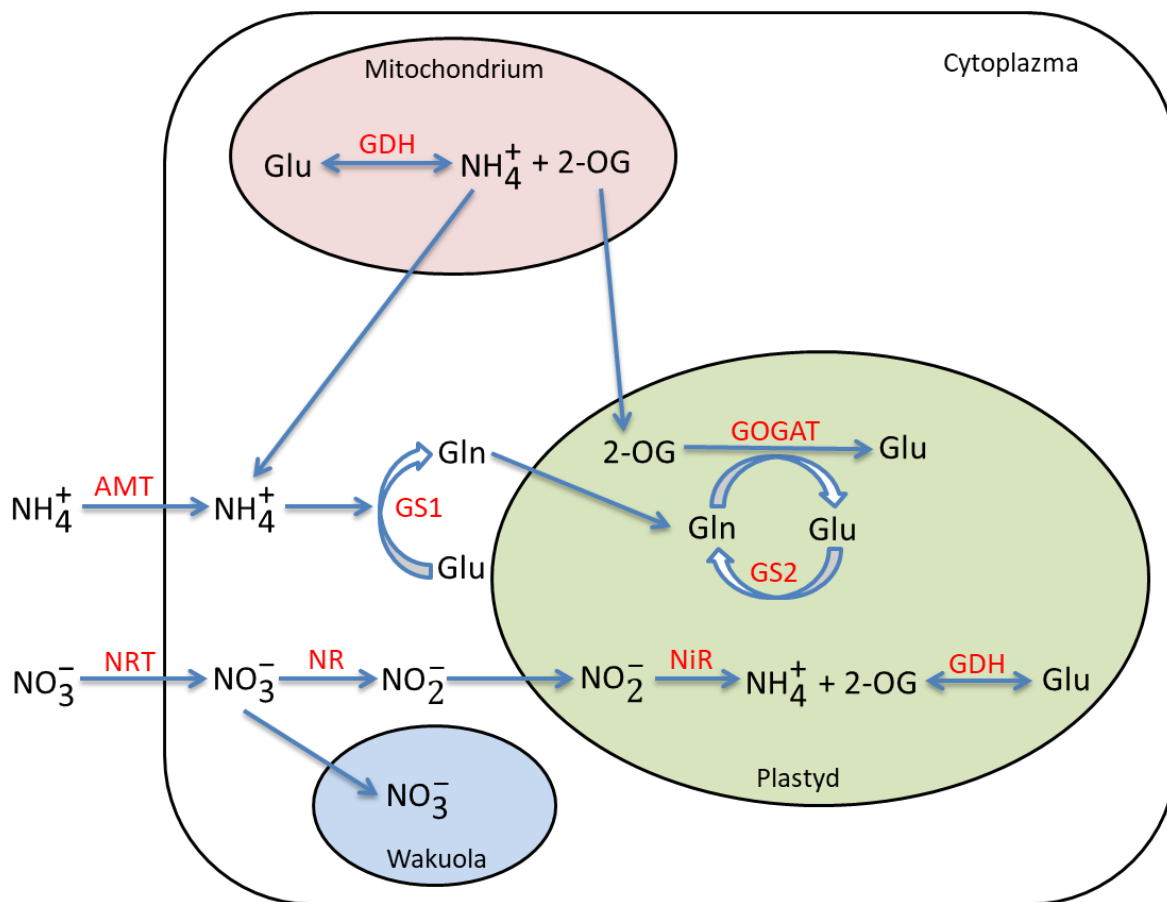
u roślin. U podstaw przeciwutleniających właściwości polifenoli leży ich wysoka reaktywność jako donorów wodoru bądź elektronów, a także ich zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych przez co zapobiegają reakcji Fentona. Innym mechanizmem decydującym o właściwościach antyoksydacyjnych fenoli jest ich zdolność do zmiany kinetyki peroksydacji lipidów poprzez modyfikację kolejności upakowania lipidów i zmniejszenie płynności błony. Zmiany te mogą utrudniać dyfuzję wolnych rodników oraz ograniczać reakcje prooksydacyjne. Przeciwutleniacze fenolowe mogą zakłócać utlenianie lipidów i innych cząsteczek poprzez szybkie oddawanie atomów wodoru rodnikom $\text{LOO}^\cdot$. Pośrednie rodniki fenoksyłowe są stosunkowo stabilne i nie inicjują dalszych reakcji rodnikowych. Ponadto mogą przyczyniać się do terminacji reakcji łańcuchowych poprzez reakcję z innymi wolnymi rodnikami [Ahmad i wsp., 2010].

1.4. Metabolizm azotu

Azot jest jednym z głównych składników mineralnych niezbędnych dla roślin. Wykorzystywany jest on do wytwarzania aminokwasów budujących białka strukturalne i enzymatyczne, kwasów nukleinowych, a także lipidów, chlorofilu oraz innych metabolitów, w strukturze których występuje azot. W związku z tym niedobór azotu ogranicza wzrost i rozwój roślin. Dostępność azotu w glebie zwykle podlega dużym wahaniom ze względu na właściwości gleby, w tym pH, wilgotność czy aktywność mikrobiologiczną [Wang i wsp., 2014]. Oprócz roślin strączkowych, które mogą wiązać azot atmosferyczny, rośliny pobierają ten składnik odżywczy z gleby przez system korzeniowy. W glebie azot występuje w postaci nieorganicznych jonów: azotanowych (NO_3^-) oraz amonowych (NH_4^+), a także jako organiczne związki azotu, do których można zaliczyć mocznik oraz wolne aminokwasy. Jednak głównym źródłem azotu dla roślin są jony NO_3^- , które dominują w glebach dobrze natlenionych oraz jony NH_4^+ , które przeważają na zalanych terenach podmokłych oraz glebach kwaśnych [Krapp, 2015; Chamizo-Ampudia i wsp., 2017].

Istnieją specyficzne transportery dla jonów NO_3^- i NH_4^+ należące, odpowiednio, do grupy NRT i AMT. Pobrane jony NO_3^- mogą być bezpośrednio metabolizowane, magazynowane w wakuolach, bądź transportowane do części nadziemnej poprzez ksylem [Krapp, 2015]. Natomiast jony NH_4^+ są toksyczne i muszą być szybko włączane w strukturę związków organicznych [Islam i wsp., 2022]. Azotany przed włączeniem ich do związków organicznych muszą zostać zredukowane do jonów amonowych. Asymilacja pobranego azotu

nieorganicznego jest procesem wieloetapowym, w który zaangażowany jest szereg enzymów (Rys. 7).



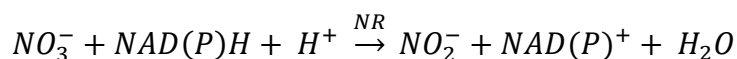
Rys. 7. Pobieranie i asymilacja jonów azotanowych i amonowych w komórkach korzenia (wg Ali, [2020], zmodyfikowane)

Glu - glutaminian, Gln - glutamina, 2-OG - 2-oksoglutaran, NR - reduktaza azotanowa, NiR - reduktaza azotynowa, GS - syntetaza glutaminowa, GOGAT - syntetaza glutaminianowa, GDH - dehydrogenaza glutaminianowa, AMT - transportery jonów NH_4^+ , NRT - transportery jonów NO_3^-

1.4.1. Enzymy zaangażowane w metabolizm azotu w komórkach roślinnych

1.4.1.1. Reduktaza azotanowa

Reduktaza azotanowa (NR) katalizuje reakcję konwersji azotanów do azotynów, która zachodzi w cytoplazmie komórki.



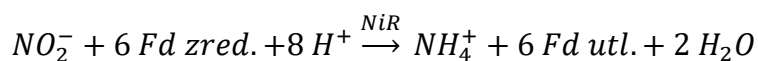
W zależności od wykorzystywanego przez enzym donora elektronów wyróżniono dwie izoformy: specyficzną dla NADH (EC 1.6.6.1), bądź dla NADPH (EC 1.6.6.2). W korzeniach traw oraz w glonach eukariotycznych stwierdzono obecność reduktazy wykorzystującej oprócz NADH także NADPH [Kopcewicz i Lewak, 2019; Ali, 2020]. Wszystkie izoformy NR charakteryzują się podobnymi właściwościami. Są homotetramerami złożonymi z czterech identycznych podjednostek połączonych ze sobą niekowalencyjnie, z których każda zawiera dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), cytochrom b557 (hem) oraz molibdenopterynę [Inokuchi i wsp., 2002; Kopcewicz i Lewak, 2019].

Reduktaza azotanowa jest enzymem indukowanym, którego synteza aktywowana jest przez obecność substratu (NO_3^-). Aby zapobiec akumulacji szkodliwego dla komórek roślinnych NO_2^- aktywność NR jest regulowana przez kilka mechanizmów, w tym degradację enzymu, syntezę, odwracalną inaktywację, a także stężenie substratu. Stężenie białka NR oraz jego aktywność są stymulowane również przez światło. Obniżenie aktywności NR przy małej ilości światła może być związane z ograniczoną podażą czynników redukujących [Wang i wsp., 2014].

Oprócz regulacji aktywności NR przez dostępność substratu, która odbywa się na poziomie ekspresji genu, aktywność tego enzymu może być również modulowana za pomocą mechanizmów potranslacyjnych, m.in. poprzez odwracalną fosforylację, która w obecności jonów magnezu umożliwia przyłączanie do cząsteczki enzymu białka inhibitorowego 14-3-3 [Reda i wsp., 2000; Kaiser i Huber, 2001].

1.4.1.2. Reduktaza azotynowa

Jony azotynowe są przekształcane w jony amonowe w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotynową (NiR, EC 1.7.7.1) w chloroplastach liści lub w plastydach korzeni i innych tkanek nefotosyntetyzujących.



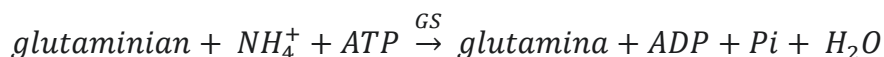
W chloroplastach donorem elektronów jest zredukowana ferredoksyna generowana w fazie jasnej fotosyntezy przez fotosystem I [Ali, 2020]. W plastydach regeneracja zredukowanej ferredoksyny odbywa dzięki NADPH wytwarzanemu w szlaku pentozofosforanowym [Wang i wsp., 2014]. Reduktaza azotynowa jest monomerem o masie cząsteczkowej 60-64 kDa i zawiera dwie grupy prostetyczne: sirohem oraz centrum żelazowo-siarkowe [Yoneyama i Suzuki, 2019].

1.4.1.3. Enzymy cyklu GS-GOGAT

Jony amonowe pobrane bezpośrednio z gleby lub powstałe w wyniku redukcji jonów azotanowych, a także generowane wtórnie w procesie fotooddychania w tkankach fotosyntetyzujących czy w wyniku katabolizmu białek i aminokwasów są asymilowane dzięki połączonemu działaniu syntetazy glutaminowej (GS) oraz syntazy glutaminianowej (GOGAT) w tak zwanym cyklu GS-GOGAT [Krapp, 2015].

Syntetaza glutaminowa

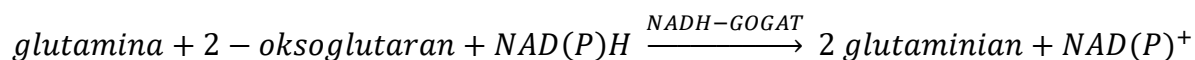
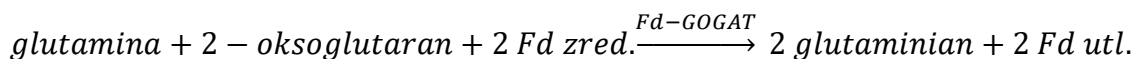
Syntetaza glutaminowa (EC 6.3.1.2) katalizuje zależną od ATP aminację glutaminianu prowadzącą do powstania glutaminy.



W roślinach wyższych wyróżnia się dwie główne izoformy GS: GS1 i GS2 o różnej lokalizacji subkomórkowej i masie cząsteczkowej. Izoenzymy cytozolowej syntetazy glutaminowej (GS1) są mniejsze i kodowane przez kilka genów. Plastydowe/chloroplastowe izoformy tego enzymu (GS2) są większe i zwykle kodowane tylko przez jeden gen, rzadko dwa [Moreira i wsp., 2022]. Uważa się, że GS2 biorą udział w pierwotnej asymilacji NH_4^+ pochodzącego z redukcji azotanów (synteza aminokwasów *de novo*) oraz we wtórnej asymilacji jonów NH_4^+ produkowanych w procesie fotooddychania. Natomiast GS1 uczestniczą w recyklingu NH_4^+ podczas określonych etapów rozwojowych, takich jak np. starzenie się liści [Masclaux-Daubresse i wsp., 2010].

Syntaza glutaminianowa

Syntaza glutaminianowa (GOGAT) przeprowadza redukcyjne przeniesienie grupy aminowej z glutaminy na 2-oksoglutaran, wykorzystując jako reduktor ferredoksynę (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1), NADPH (NADPH-GOGAT, EC 1.4.1.13) lub NADH (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14), co prowadzi do wytworzenia 2 cząsteczek glutaminianu.

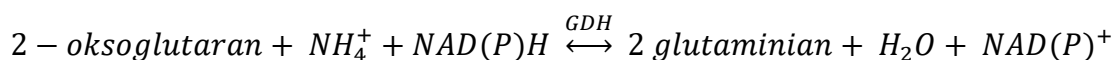


W komórkach roślinnych GOGAT występuje zazwyczaj w dwóch izoformach, Fd-GOGAT i NADH-GOGAT [Inokuchi i wsp., 2002]. Izoforma Fd-GOGAT jest zlokalizowana głównie

w chloroplastach liści, podczas gdy NADH-GOGAT głównie występuje w plastydach tkanek niefotosyntetycznych, takich jak korzenie czy etiolowane tkanki liści [Moreira i wsp., 2022]. Fd-GOGAT jest monomerem (145–168 kDa), z wyjątkiem ryżu, w którym enzym ten składa się z dwóch podjednostek o masie 115 kDa. Sugeruje się, że enzym ten zawiera jeden mononukleotyd flawinowy (FMN), jeden dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i jedno centrum żelazowo-siarkowe (3Fe-4S) na cząsteczkę. NADH-GOGAT jest monomerem o masie cząsteczkowej 190–240 kDa [Inokuchi i wsp., 2002].

1.4.1.4. Dehydrogenaza glutaminianowa

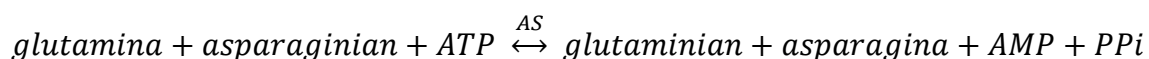
Poza cyklem GS-GOGAT jony amonowe mogą być również włączane do związków organicznych poprzez działanie dehydrogenazy glutaminianowej (GDH). W roślinach można wyróżnić izoenzymy GDH zależne od NAD (EC 1.4.1.2) bądź od NADH (EC 1.4.1.4) [Grzechowiak i wsp., 2020]. Dehydrogenaza glutaminianowa katalizuje zależną od NAD(P)H aminację 2-oksoglutaranu, co powoduje powstanie glutaminianu (reakcja syntezy), a także zależną od NAD deaminację glutaminianu, uwalniając 2-oksoglutaran oraz amoniak (reakcja kataboliczna) [Yoneyama i Suzuki, 2019].



GDH zlokalizowana jest głównie w mitochondriach komórek roślinnych. Posiada liczne izoenzymy, z których każdy zbudowany jest z 6 podjednostek o masie 42-46 kDa [Inokuchi i wsp., 2002]. Ponieważ w szlaku GS-GOGAT w celu zasymilowania NH_4^+ zużywane jest ATP, uważa się że w warunkach stresowych kiedy działanie systemu GS-GOGAT może nie być efektywne, szczególnie ważną rolę odgrywa właśnie GDH [Walker i Van der Donk, 2016]. Wykazano, że aktywność GDH jest niezbędna do przeżycia roślin w warunkach deficytu światła [Masclaux-Daubresse i wsp., 2010].

1.4.1.5. Syntetaza asparaginowa

Syntetaza asparaginowa (AS, EC 6.3.5.4) w połączeniu z GS odgrywa ważną rolę w pierwotnym metabolizmie azotu. Katalizuje reakcję zależnego od ATP transferu amidowej grupy aminowej glutaminy do asparaginianu w wyniku czego powstaje glutaminian i asparagina. Asparagina odgrywa rolę w transporcie i magazynowaniu azotu [Inokuchi i wsp., 2002; Wang i wsp., 2014].

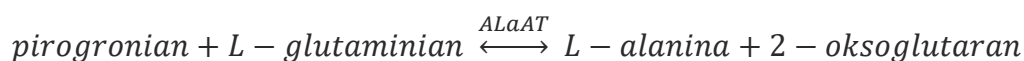


1.4.1.6. Aminotransferazy

Aminotransferazy (EC 2.6.1.x) są enzymami należącymi do grupy transferaz, które katalizują reakcję przeniesienia grupy aminowej z danego aminokwasu na oksokwas z wytworzeniem 2- oksokwasu (pochodnego substratowi aminokwasowemu) oraz aminokwasu [Kendziorek i Zagdańska, 2011].

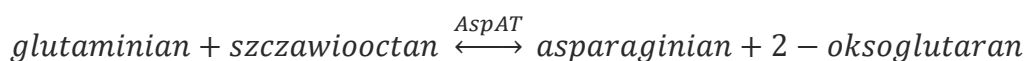
Aminotransferaza alaninowa

Aminotransferaza alaninowa (AlaAT; E.C.2.6.1.2) katalizuje zależne od fosforanu pirydoksalu, odwracalne przeniesienie grupy aminowej z glutaminianu do pirogronianu z wytworzeniem 2- oksoglutaranu i alaniny [Kishorekumar i wsp., 2020].



Aminotransferaza asparaginianowa

Aminotransferaza asparaginianowa (AspAT; EC 2.6.1.1) jest enzymem zależnym od fosforanu pirydoksalu i katalizuje reakcję odwracalnego przeniesienia grupy aminowej z glutaminianu na szczawiooctan z wytworzeniem 2-oksoglutaranu i asparaginianu [Inokuchi i wsp., 2002].



Ze względu na szerokie znaczenie substratów wykorzystywanych przez AspAT, bierze on udział w wielu procesach metabolicznych. Aminotransferaza asparaginianowa jest głównym źródłem asparaginainu w komórkach roślinnych. Asparaginian jest aminokwasem niezbędnym do syntezy białek, służy jako prekursor w biosyntezie aminokwasów takich jak: metionina, lizyna, asparagina, a także ureidów, które są głównymi cząsteczkami transportującymi azot w niektórych roślinach. Enzym ten odgrywa rolę w asymilacji amoniaku w cyklu GS/GOGAT [Ryan i Fottrell, 1974]. Działa na tym szlaku poprzez recykling szkieletów węglowych (2- oksoglutaran) do transaminacji przez GOGAT. Sugeruje się, że AspAT jest elementem mostku jabłczanowo-asparaginianowego uczestniczącego w transporcie wodoru z cytoplazmy przez błonę mitochondrium, chloroplastu oraz peroksysomu [Wadsworth, 1997].

2. Cel pracy

Zanieczyszczenie metalami ciężkimi, pomimo ograniczania ich emisji do środowiska, nadal stanowi ważny problem ekologiczny. Nikiel uważany jest za jeden z najbardziej toksycznych metali ciężkich, wykazując silne właściwości kancerogenne i teratogenne. Toksyczny wpływ Ni na rośliny uprawne przejawia się obniżeniem ilości i jakości ich plonów a akumulacja tego metalu w tkankach roślin niesie za sobą zagrożenie dla ludzi i zwierząt.

Wybrany do badań ogórek jest jednym z najpopularniejszych gatunków warzyw powszechnie uprawianych na całym świecie, w tym również w Polsce. Jednocześnie jest gatunkiem o niskiej tolerancji na Ni wykazującym objawy toksyczności już przy niewielkich dawkach tego metalu. Ze względu na duże znaczenie tego gatunku i jego dużą wrażliwość na Ni bardzo ważne jest poznanie mechanizmów leżących u podstaw toksycznego działania tego metalu ciężkiego na rośliny ogórka.

W związku z powyższym, celem badań niniejszej pracy było:

1. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw fitotoksycznego działania Ni na siewki ogórka poprzez zbadanie jego wpływu na:
 - wybrane parametry wzrostowe,
 - parametry wskazujące na ogólną kondycję roślin (barwniki fotosyntetyczne, wydajność fotosyntetyczna),
 - procesy pro- oraz antyoksydacyjne ze szczególnym uwzględnieniem generowania RFT oraz produktów peroksydacji lipidów, a także zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych uczestniczących w ich usuwaniu,
 - skład i stopień nienasycenia fosfolipidów,
 - profil związków fenolowych,
 - metabolizm podstawowy w aspekcie procesów związanych z metabolizmem azotu.
2. Zbadanie wpływu Ni na badane parametry w zależności od organu rośliny (liść i korzeń) oraz wieku liścia (liść I i II).
3. Zbadanie wpływu Ni na badane parametry w zależności od czasu traktowania.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Materiał badawczy stanowiły siewki ogórka (*Cucumis sativus* L.) odm. Cezar uprawiane metodą hydroponiczną na pożywce Hoaglanda. Nasiona ogórka najpierw kiełkowano, a następnie 6-dniowe siewki przenoszono na rozcieńczoną (1:4) (Tab. 1) pożywkę zawierającą 0 (kontrola) lub 10 μM Ni. Nikiel dodawano w postaci chlorku niklu ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$). Rośliny uprawiano w kontrolowanych warunkach w fitotronie (temperatura: 24°C; fotoperiod: 16 godzin oświetlenia i 8 godzin ciemności; natężenie oświetlenia: 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; względna wilgotność powietrza: 50% - 60%).

Tab. 1. Skład podłoża wg Hoagland i Arnon [1950] z modyfikacjami dla uprawy hydroponicznej ogórka

Składniki podłoża (mg dm^{-3})	
Makroelementy	
KNO₃	126,25
MgSO₄ × 7H₂O	123
KH₂PO₄	34
Ca(NO₃)₂ × 4H₂O	295
FeNa-EDTA	10,075
Mikroelementy	
CuSO₄ × 5H₂O	0,079
H₃BO₄	2,86
MnSO₄ × 5H₂O	2,19
NaMoO₄ × 2H₂O	0,13
ZnSO₄ × 7H₂O	2,2
pH=5,8	

Badania prowadzono na siewkach ogórka zbieranych w dwóch punktach czasowych: po 2 oraz 3 tygodniach traktowania metalem. Do analiz pobierano liść I oraz liść II, a także korzeń roślin kontrolnych i traktowanych Ni chyba, że podano inaczej.

3.2. Metody

3.2.1. Ocena parametrów wzrostowych

Parametry wzrostowe oceniano na podstawie pomiarów pola powierzchni blaszki liściowej, a także świeżej masy badanych organów siewek ogórka.

Pole powierzchni blaszki liściowej mierzono za pomocą komputerowej analizy obrazu. Badane liście najpierw skanowano, a następnie uzyskane skany analizowano za pomocą programu NIS- Elements D (5,01.00, 64-bit). Wyniki pomiarów powierzchni liści wyrażono w mm².

Biomasę określano ważąc świeżą masę liści i korzeni siewek ogórka. Korzenie przed ważeniem płukano wodą wodociągową i starannie osuszano przy użyciu bibuły. Biomasa badanych organów wyrażano w mg.

3.2.2. Oznaczenie zawartości niklu, magnezu, żelaza, manganu, potasu i sodu

Zawartość Ni, magnezu (Mg), żelaza (Fe), manganu (Mn), potasu (K) oraz sodu (Na) w liściach i korzeniu ogórka oznaczano metodą spektrometrii absorpcji atomowej.

Po zbiorze tkankę liści i korzenia suszono. Następnie wysuszoną biomasę (100 mg) poddawano procesowi mineralizacji w 5 cm³ 69% HNO₃ przy użyciu mineralizatora mikrofalowego (UniClever, Plazmatronika, Polska). Proces mineralizacji obejmował następujące trzy etapy różniące się czasem trwania, ciśnieniem i mocą: (1) t=5 min, p=3-2,7 MPa, moc=60%; (2) t=5 min, p=3,5-3,2 MPa, moc=80%; (3) t=10 min, p=4,5-4,2 MPa, moc=100%. Uzyskane mineralizaty rozcieńczano wodą demineralizowaną do objętości 50 cm³, a następnie poddawano analizie przy użyciu spektrometru Varian SpectrAA 300 (Varian Australia Pty. Ltd., Mulgrave, Australia) wyposażonego w lampę deuterową do korekcji tła i płomień powietrze/acetylen. Pierwiastki oznaczano przy następujących długościach fali: Ni - 232 nm; Mg – 285,2 nm; Fe – 248,3 nm; Mn – 279,5 nm; K – 766,5 nm i Na – 589 nm. Zawartość Ni, Fe i Mn wyrażono w µg g⁻¹ suchej masy, natomiast zawartość Mg, K i Na wyrażano w mg g⁻¹ suchej masy.

3.2.3. Oznaczenie zawartości barwników fotosyntetycznych

Zawartość chlorofilu a, chlorofilu b oraz karotenoidów oznaczano na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru stężenia danego barwnika przy odpowiednich długościach fali według Wellburn [1994].

Do analizy zawartości barwników fotosyntetycznych pobierano całą blaszkę liściową I oraz II liścia ogórka, a następnie suszono. Materiał homogenizowano w porcelanowym moździerzu dodając porcjami ($10\text{ cm}^3 + 5\text{ cm}^3$) 80% (v/v) roztwór acetonu. Otrzymany w ten sposób homogenat zlewano do probówek wirówkowych i wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Następnie supernatant zlewano do cylindra miarowego, a do pozostałego w probówce wirówkowej osadu dodawano 5 cm^3 80% roztworu acetonu i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Supernatanty uzyskane podczas pierwszego i drugiego wirowania łączono i uzupełniano w cylindrze miarowym do objętości 20 cm^3 za pomocą 80% roztworu acetonu. Ekstrakt przelewano do kuwet spektrofotometrycznych, a następnie wykonywano pomiar absorbancji (A) przy długościach fali $\lambda=663,2\text{ nm}$ dla chlorofilu a, $\lambda=646,8\text{ nm}$ dla chlorofilu b oraz $\lambda=470\text{ nm}$ dla karotenoidów (Helios Gamma, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Jako próbę odnośnikową użyto 80% (v/v) roztwór acetonu. Stężenie chlorofilu a, chlorofilu b i karotenoidów wyliczono z wykorzystaniem podanych poniżej wzorów (Wellburn, 1994) i wyrażono w $\mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy:

$$C_{\text{chlorofil a}} = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$$

$$C_{\text{chlorofil b}} = 21,5 \times A_{646,8} - 5,1 \times A_{663,2}$$

$$C_{\text{karotenoidy}} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_{\text{chlorofil a}} - 85,02 \times C_{\text{chlorofil b}})/198$$

3.2.4. Oznaczenie wydajności fotosyntetycznej

Wydajność fotosyntetyczną określano na podstawie pomiaru parametru QY (ang. quantum yield), czyli wydajności kwantowej fotoukładu II za pomocą fluorymetru FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Czechy).

Pomiaru QY dokonywano na podstawie fluorescencji chlorofilu a, po 15 minutach adaptacji siewek ogórka do ciemności. Pomiar był przeprowadzany w 4 miejscach na powierzchni liścia. W fazie adaptacji do ciemności fotosystemy w chloroplastach są utlenione (gotowe do absorpcji światła). Wiązka światła niebieskiego ($\lambda=470\text{ nm}$) generowana przez urządzenie wywołuje

absorpcję światła przez anteny energetyczne w chloroplastach, jest to faza inicjacji iluminacji. W następującej po niej fazie pełnej iluminacji dodatkowe światło jest absorbowane przez chlorofil ale nie może być ono użyte przez fotosystem i jest ono re-emitowane jako światło fluorescencyjne. Fluorymetr FluorPen FP100 mierzy to re-emitowane światło i przelicza je na wydajność kwantową fotoukładu II (QY). Wydajność kwantową fotoukładu II w fazie adaptacji do ciemności wylicza się ze wzoru:

$$QY = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

F_m - maksimum fluorescencji w fazie adaptacji do ciemności mierzona podczas nasycenia fragmentu liścia pierwszym błyskiem światła po adaptacji do ciemności

F_0 - minimum fluorescencji w fazie adaptacji do ciemności

$F_v = (F_m - F_0)$ – różnica pomiędzy wartością fluorescencji maksymalnej i minimalnej mierzonej po adaptacji do ciemności

3.2.5. Określenie stopnia przepuszczalności błon plazmatycznych

Stopień przepuszczalności błon plazmatycznych oceniano stosując metodę opartą na konduktometrycznym pomiarze wycieku elektrolitów z komórek.

W celu określenia stopnia przepuszczalności błon plazmatycznych z liści wycinano korkoborem po 10 krążków o średnicy 7 mm. Krążki płukano 3-krotnie w wodzie demineralizowanej, po czym umieszczano je w probówkach dodając 15 cm³ wody demineralizowanej i inkubowano na wstrząsarce przez 2 godziny. Po tym czasie przy użyciu konduktometru (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland) mierzono przewodnictwo właściwe płynu inkubacyjnego (EC_1). Następnie probówki umieszczano w łaźni wodnej i gotowano przez 20 minut w celu całkowitego uszkodzenia błon plazmatycznych, po czym probówki studzono i ponownie mierzono przewodnictwo właściwe (EC_2). Wyciek elektrolitów (EL) wyliczano ze wzoru przedstawionego poniżej i wyrażano w %.

$$EL = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \%$$

EL- wyciek elektrolitów

EC_1 - przewodnictwo płynu w którym inkubowała się tkanka

EC_2 - przewodnictwo płynu po termicznej degradacji tkanki

3.2.6. Histochemiczna detekcja reaktywnych form tlenu

3.2.6.1. Histochemiczna detekcja nadtlenu wodoru (H_2O_2)

Obecność H_2O_2 wykrywano z wykorzystaniem metody opisanej przez Thordal-Christensen i wsp. [1997]. Metoda ta opiera się na wykrywaniu produktów utlenienia 3,3'-diaminobenzyny (DAB) przez H_2O_2 i przy udziale endogennej peroksydazy. W wyniku tej reakcji powstaje produkt, który jest widoczny makroskopowo w postaci brązowego zabarwienia. Aby wykryć H_2O_2 , liście umieszczano w 0,05 M buforze octanowym pH 3,8 zawierającym 3 mM DAB i inkubowano na świetle w temperaturze 24 °C przez 12 godzin. Następnie liście odbarwiano w 96% roztworze alkoholu etylowego, aż do zaniku chlorofilu oraz wykonywano ich skany. Powierzchnie barwnych plam na liściu oraz całkowitą powierzchnię liścia określano w programie NIS-Elements D (5.01.00, 64-bit). Zawartość H_2O_2 wyrażano jako powierzchnię wybrawioną DAB w stosunku do całkowitej powierzchni liścia.

3.2.6.2. Histochemiczna detekcja anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$)

Obecność $O_2^{\cdot-}$ w liściach wykrywano według metody Unger i wsp. [2005]. Metoda ta opiera się na wykrywaniu produktów redukcji NBT przez $O_2^{\cdot-}$. W wyniku tej reakcji powstają barwne formazany widoczne makroskopowo w postaci niebieskiego zabarwienia. W celu wykrycia $O_2^{\cdot-}$ liście zanurzono w buforze fosforanowym (sól sodowo-potasowa) pH 7,8 zawierającym 0,1 mM NBT, 0,1 mM EDTA i 10 mM NaN_3 . Liście zostawiono w roztworze inkubacyjnym w temperaturze pokojowej aż do pojawienia się niebieskiego zabarwienia. Następnie liście odbarwiano w 96% roztworze alkoholu etylowego, aż do zaniku chlorofilu oraz wykonywano ich skany. Powierzchnie barwnych plam na liściu oraz całkowitą powierzchnię liścia określano w programie NIS-Elements D (5.01.00, 64-bit). Zawartość $O_2^{\cdot-}$ wyrażano jako powierzchnię wybrawioną NBT w stosunku do całkowitej powierzchni liścia.

3.2.7. Oznaczanie zawartości aldehydu malonowego (MDA)

Stopień peroksydacji lipidów w ekstraktach z liści i korzeni oznaczano spektrofotometrycznie według Yagi [1982]. Metoda oparta jest na określeniu stężenia związków reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBARS). Podstawą metody jest powstawanie w kwaśnym środowisku i w podwyższonej temperaturze barwnego adduktu pomiędzy kwasem 2-tiobarbiturowym (TBA) i dialdehydami (głównie dialdehydem malonowym – MDA), będącymi produktami rozpadu nadtlenu lipidowych.

Tkankę homogenizowano (1:10 w/v) w mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0, a następnie wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Do otrzymanych supernatantów dodawano po 1 cm³ roztworu TBA (29 mM TBA w 8,75 M kwasie octowym) i wody demineralizowanej. Reakcję barwną wywoływano przez inkubację prób w łaźni wodnej w temperaturze 96°C przez 1 godzinę. Po tym czasie próby schładzano pod bieżącą wodą i zakwaszano mieszaninę poprzez dodanie po 0,025 cm³ 5 M HCl. Następnie barwne addukty ekstrahowano do 3,5 cm³ butanolu o czystości spektralnej i wirowano ($10\,000 \times g$, 10 min). Do pomiarów pobierano warstwę organiczną. Wartość fluorescencji odczytywano przy użyciu spektrofluorymetru Hitachi F- 2500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 535$ nm i długości fali emisji $\lambda = 553$ nm względem próby odczynnikowej.

Stężenie MDA obliczano uwzględniając wartości fluorescencji dla próby wzorcowej zawierającej 1 nmol 1,1,3,3- tetraetoksyprowanu (TEP) i wyrażano w nmol MDA g⁻¹ świeżej masy.

3.2.8. Oznaczenie profilu lipidów

3.2.8.1. Ekstrakcja i analiza lipidów

Próbki zamrożonych liści (100 mg) homogenizowano w homogenizatorze Fast-Prep-24 Instrument (MP Biomedicals) z 1 cm³ jednorodnej mieszaniny chloroformu i metanol (2:1, v/v) zawierającej 0,003% butylowany hydroksytoluen (BHT) i szklane kulki. Homogenaty odwirowano ($4730 \times g$, 5 min). Po dodaniu 0,2 cm³ wody homogenat wytrząsano i ponownie odwirowano ($4730 \times g$, 5 min). Pobierano dolną organiczną warstwę i odparowano ją w wyparce próżniowej. Pozostałość ponownie rozpuszczono w 1 cm³ mieszaniny metanolu i chloroformu (4:1, v/v) i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy.

3.2.8.2. Rozdział klas fosfolipidów metodą HPLC-MS i charakterystyka cząsteczek fosfolipidów

Fosfolipidy oznaczano za pomocą systemu HPLC Agilent 1200 (Santa Clara, CA, USA) i spektrometru masowego 4500 Q-TRAP (Sciex, Framingham, MA, USA) ze źródłem ESI (jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym; ang. electrospray ionization). Analizę chromatograficzną przeprowadzono w układzie odwróconych faz stosując kolumnę Kinetex C18 (50 mm $\times$ 2,1 mm, wielkość ziarna 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Na kolumnę wstrzyknięto 10 mm³ ekstraktu lipidowego. Szybkość przepływu wynosiła 500 mm³ min⁻¹.

Fazy ruchome woda (A) i metanol (B) zawierały 5 mM mrówczan amonu. Gradient rozpuszczalnika rozpoczęto przy 70% B, zwiększono do 95% B w ciągu 1,25 minuty i utrzymywano przy 95% B przez 6 minut, następnie w ciągu 3 minut powrócono do początkowego składu rozpuszczalnika. Temperaturę kolumny utrzymywano na poziomie 40°C. Zastosowano następujące ustawienia spektrometru mas: napięcie pola elektrycznego 4500 V; gaz osłonowy 25; gaz nebulizatora 50; gaz turbo 60 i temperatura źródła jonów 600°C. Analizę danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Analyst™ v1.6.2 (Sciex, Framingham, MA, USA).

Jakościową i ilościową analizę fosfolipidów przeprowadzono techniką tandemowej spektrometrii mas z wykorzystaniem, odpowiednio, trybu skanowania jonów pierwotnych (PIS) oraz trybu monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM) [Bernat i wsp., 2014b].

Do oznaczenia jakościowego fosfolipidów poszczególnych klas zastosowano metodę akwizycji zależną od danych PIS→EPI (wzmocnione skanowanie jonów potomnych). Otrzymano widma w zakresie m/z 100-950. Szybkość skanowania EPI wynosiła 1000 amu s⁻¹. Do wykrycia lipidów z klas PA, PG, PE, i PI wykorzystano skanowanie jonów pierwotnych o m/z 158. Natomiast do identyfikacji lipidów należących do PC przeprowadzono skanowanie jonów pierwotnych o m/z 168. W przypadku fosfolipidów należących do PA, PG, PE, i PI identyfikacja opierała się o widma masowe rejestrowane w trybie jonizacji negatywnej z wytworzeniem deprotonowanego jonu [M-H]⁻. W przypadku fosfolipidów z klasy PC otrzymywano jony [M+HCOO]⁻. Na podstawie analizy głów i łańcuchów acylowych jonów pierwotnych i wtórnych wygenerowano listę tranzykcji MRM a następnie określono skład kwasów tłuszczowych występujących w cząsteczkach lipidów.

Do analizy ilościowej stosowano standardy fosfolipidów dla każdej klasy PL: kwas fosfatydowy (PA 12:0/12:0), fosfatydylocholina (PC 14:0/14:0), fosfatydyloetanolamina (PE 14:0/14:0), fosfatydyloglicerol (PG 14:0/14:0), LPC (16:0) i fosfatydyloinozytol (PI 16:0/16:0).

3.2.8.3. Stopień nienasycenia fosfolipidów

W celu określenia stopnia nienasycenia fosfolipidów obliczono indeks wiązań podwójnych (DBI) korzystając ze wzoru: $DBI = [(\% \text{ trzynienasyconych kwasów tłuszczowych} \times 3) + (\% \text{ dwunienasyconych kwasów tłuszczowych} \times 2) + (\% \text{ jedenienasyconych kwasów tłuszczowych})] / \Sigma \% \text{ nasyconych kwasów tłuszczowych}$ [Gajewska i wsp., 2012]. Procentową zawartość kwasów tłuszczowych z każdej grupy określono na podstawie obecności ich łańcuchów acylowych

w poszczególnych cząsteczkach zidentyfikowanych fosfolipidów. Wartości DBI wyznaczono dla całej frakcji fosfolipidów a także dla poszczególnych klas: PA, PC, PE, PG i PI.

3.2.8.4. Ekstrakcja i analiza oksylipin metodą LC – MS

Oksylipiny ekstrahowano z liści w sposób opisany przez Ludovici i wsp. [2014] z niewielkimi modyfikacjami. Próbkę liści po 100 mg wytrząsano z 1 cm³ mieszaniny heksanu i alkoholu izopropylowego, (3:2, v/v), zawierającej 0,003% BHT. Następnie dodawano 0,5 cm³ 6,7% roztworu siarczanu potasu. Pobierano górną warstwę i odparowano ją w wyparce próżniowej. Oksylipiny oznaczano przy użyciu tego samego systemu LC-MS/MS jak opisano powyżej. Na kolumnę Kinetex C8 (150 mm × 2,1 mm, wielkość ziarna 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) wstrzykiwano 10 mm³ ekstraktu. Faza ruchoma składała się z 5 mM mrówczanu amonu w wodzie (A) i 5 mM mrówczanu amonu oraz 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu (B) z szybkością przepływu 500 mm³ min⁻¹. Gradient rozpuszczalnika rozpoczęto przy 30% B, zwiększono do 90% B w ciągu 4 minut i utrzymywano przy 90% B przez 3 minuty, następnie w ciągu 3 minut powrócono do początkowego składu rozpuszczalnika. Temperaturę kolumny utrzymywano na poziomie 40°C. Przejścia MRM uzyskano przy użyciu autentycznych standardów [Ludovici i in., 2014].

3.2.9. Oznaczenie aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym

3.2.9.1. Przygotowanie ekstraktów enzymatycznych

W celu przygotowania supernatantów do oznaczenia enzymów takich jak: CAT, SOD, APX, POX, GSH-Px oraz GST tkankę roślinną umieszczano w zmrożonych mózdzierzach, a następnie homogenizowano w 0,05 M buforze fosforanowym (sól sodowa) o pH 7,0 (1:10 w/v). Bufor zawierał 1 mM askorbinian sodu, 1 mM kwas wersenowy (EDTA) oraz 1% poliwinylpirolidon (PVP).

Do oznaczenia aktywności PAL tkankę homogenizowano w zmrożonym mózdzierzu w 0,1 M buforze boranowym o pH 8,8 (1:5 w/v) z dodatkiem 0,5 mM EDTA oraz 3 mM ditiotretolu (DTT).

Homogenaty poddawano wirowaniu (33 987 × g, 15 min, 4°C). Uzyskane w ten sposób supernatanty użyto do analiz enzymatycznych.

3.2.9.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Zasada metody

Aktywność SOD (EC 1.15.1.1) oznaczano według metody Beauchamp i Fridovich [1971]. Analiza aktywności SOD opierała się na monitorowaniu jej zdolności do hamowania fotochemicznej redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT).

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina inkubacyjna zawierała 50 mM bufor fosforanowy (sól sodowa) o pH 7,8, 13 mM metioninę, 75 μ M NBT, 0,1 mM EDTA, 2 μ M ryboflawinę oraz ekstrakt enzymatyczny. Reakcję rozpoczęto przez włączenie lampy UV. Równocześnie przygotowano również próbę odczynnikową pozbawioną ekstraktu enzymatycznego. Absorbancję mierzono po 10 min przy długości fali $\lambda=560$ nm (Helios Gamma, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Za jednostkę aktywności SOD (U) przyjęto zdolność enzymu do 50% hamowania fotochemicznej redukcji NBT. Aktywność enzymu SOD wyrażono w $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka.

3.2.9.3. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Zasada metody

Aktywność CAT (EC 1.11.1.6) oznaczano według metody Dhindsa i wsp. [1981]. Aktywność mierzono spektrofotometrycznie na podstawie szybkości reakcji redukcji H_2O_2 do O_2 i H_2O .

Wykonanie oznaczenia

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 50 mM bufor fosforanowy (sól sodowa) pH 7,0, ekstrakt enzymatyczny oraz 15 mM H_2O_2 , którego dodanie do mieszaniny reakcyjnej rozpoczynało reakcję. Przygotowano także próbę odczynnikową, do której nie dodano ekstraktu enzymatycznego. Rozkład H_2O_2 mierzono przy długości fali $\lambda=240$ nm przez 4 minuty. W celu obliczenia aktywności CAT zastosowano molowy współczynnik absorpcji dla H_2O_2 o wartości $\epsilon=45,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności CAT (U) przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje redukcję 1 nmola H_2O_2 w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.9.4. Oznaczanie aktywności peroksydazy askorbinianowej (APX)

Zasada metody

Aktywność APX (EC 1.11.1.11) oznaczano według zmodyfikowanej metody Nakano i Asada [1981]. Aktywność APX oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie jej zdolności do utleniania kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego.

Wykonanie oznaczenia

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 0,05 M bufor fosforanowy (sól sodowa) o pH 7,0 zawierający 1 mM EDTA, 0,25 mM askorbinian sodu, ekstrakt enzymatyczny oraz 25 μ M H_2O_2 , którego dodanie rozpoczynało reakcję. Jednocześnie przeprowadzono próbę odczynnikową, pozbawioną ekstraktu enzymatycznego. Absorbancję mierzono w ciągu 4 minut przy długości fali $\lambda = 265$ nm. W celu obliczenia aktywności APX zastosowano molowy współczynnik absorpcji dla askorbinianu $\epsilon = 13,7$ $mM^{-1}cm^{-1}$. Za jednostkę aktywności APX (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje utlenienie 1 nmola askorbinianu w 1 ciągu minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.9.5. Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec substratów fenolowych

3.2.9.5.1. Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec guajakolu (GPOX)

Zasada metody

Aktywność GPOX (EC 1.11.1.7) oznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody Maehly i Chance [1954]. Metoda ta opiera się na reakcji utlenienia przez peroksydazę guajakolu do tetraguajakolu w obecności H_2O_2 .

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM bufor octanowy pH 5,6, 5,4 mM guajakol, ekstrakt enzymatyczny, a także 15 mM H_2O_2 , którego dodanie zapoczątkowywało reakcję. Oprócz prób badanych wykonano próby odnośnikowe, w których zamiast H_2O_2 dodano H_2O . Wzrost absorbancji w wyniku utleniania guajakolu do tetraguajakolu był mierzony przy długości fali $\lambda = 470$ nm przez 4 minuty. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla tetraguajakolu $\epsilon = 26,6$ $mM^{-1}cm^{-1}$. Za jednostkę aktywności GPX (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola tetraguajakolu w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.9.5.2 Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec syringaldazyny (SPOX)

Zasada metody

Aktywność SPOX (EC 1.11.1.7) oznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody Imberty i wsp. [1985]. Metoda polega na oznaczeniu barwnego produktu który powstaje w wyniku utlenienia syringaldazyny w obecności H_2O_2 .

Wykonanie oznaczenia

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 50 mM bufor fosforanowy (sól sodowa) pH 6,0, H_2O_2 , ekstrakt enzymatyczny oraz syringaldazyna, której dodanie rozpoczynało reakcję. Jednocześnie przygotowano próby odnośnikowe pozbawione H_2O_2 . Przyrost absorbancji oznaczano przy długości fali $\lambda=530$ nm, w czasie 4 minut. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla produktu utleniania syringaldazyny $\varepsilon = 27 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności SPX (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje utlenienie 1 nmola syringaldazyny w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w $U \text{ mg}^{-1}$ białka.

3.2.9.6. Oznaczenie aktywności S - transferazy glutationowej (GST)

Zasada metody

Aktywność GST (EC.2.5.1.18) oznaczano według metody Habig i wsp. [1974]. Aktywność mierzono spektrofotometrycznie na podstawie szybkości reakcji powstawania koniugatu (2,4- dinitrofenylo-S-glutationu) między egzogennie wprowadzonymi składnikami mieszaniny reakcyjnej: glutationem (GSH) i 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB).

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna zawierała 100 mM bufor fosforanowy (sól potasowa) pH 6,25, ekstrakt enzymatyczny, 0,75 mM CDNB oraz 30 mM GSH, którego dodanie rozpoczynało reakcję. Dodatkowo przygotowano próbę odczynnikową pozbawioną ekstraktu enzymatycznego. Zmianę absorbancji spowodowaną tworzeniem koniugatu pomiędzy CDNB i GSH mierzono przy długości fali $\lambda= 340$ nm. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla powstającego koniugatu o wartości $\varepsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności GST (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola 2,4-dinitrofenylo-S-glutationu w 1 ciągu minuty. Aktywność enzymu wyrażono w $U \text{ mg}^{-1}$ białka.

3.2.9.7. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px)

Zasada metody

Aktywność GSH-Px (EC 1.11.1.9) mierzono spektrofotometrycznie za pomocą metody Hopkins i Tudhope [1973]. Metoda ta oparta jest na ciągłej regeneracji utlenionego glutationu wytworzonego przez działanie GSH-Px. Reakcja jest katalizowana przez reduktazę glutationową kosztem NADPH.

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM bufor fosforanowy (sól potasowa) o pH 7,0, 2 mM EDTA, 150 mM GSH, 4,2 mM NADPH, 0,5 jednostki reduktazy glutationowej i 2,2 mM nadtlenuk t-butyłu, który rozpoczynał reakcję. Utlenianie NADPH śledzono spektrofotometrycznie mierząc spadek absorbancji przy $\lambda = 340$ nm przez 4 minuty. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla NADPH $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności GSH-Px (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje utlenienie 1 nmola NADPH w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.9.8. Oznaczenie aktywności amoniakolizazy L-fenylalaniny (PAL)

Zasada metody

Aktywność PAL (EC 4.3.1.5) oznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody Kolupaev i wsp. [2018]. W metodzie tej oznaczano ilość kwasu *trans*-cynamonowego powstającego z L-fenylalaniny w czasie reakcji katalizowanej przez PAL.

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna zawierała bufor boranowy pH 8,8, ekstrakt enzymatyczny oraz 50 mM L-fenylalaninę. Dokonano pomiaru aktywności enzymu przy długości fali $\lambda = 290$ nm, a następnie próbki inkubowano w temperaturze 37 °C. Po godzinie dodawano 5 M HCl i oznaczano ponownie absorbancję. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla powstającego produktu $\epsilon = 9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności PAL (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola kwasu *trans*-cynamonowego w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.10. Oznaczenie stężenia białka

Stężenie białka w ekstraktach oznaczano zgodnie z metodą Bradford [1976] polegającą na zmianie barwy błękitu kumazyny G-250 z brunatnej na niebieską w środowisku kwaśnym pod wpływem wiązania z białkami za pomocą wiązań jonowych i hydrofobowych. Intensywność niebieskiego zabarwienia kompleksu białko-błękit kumazyny jest wprost proporcjonalna do zawartości białka w mieszaninie reakcyjnej.

Próbkę badaną zawierającą ekstrakt enzymatyczny oraz odczynnik Bradford inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej a następnie mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 595 \text{ nm}$ względem wody. Wartość stężenia białka odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej dla albuminy surowicy bydlęcej w 0,9% NaCl w zakresie stężeń 0 - 500 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i wyrażano w mg cm^{-3} .

3.2.11. Oznaczenie stężenia fenoli całkowitych

Zawartość fenoli całkowitych oznaczano spektrofotometrycznie według Singleton i Rossi [1965]. Metoda ta opiera się na utlenianiu fenoli przez układ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ i H_3PO_4 . W wyniku tej reakcji w środowisku zasadowym obecne w odczynniku Folina-Ciocalteu sole kwasów fosfowolframowego i fosfomolibdenowego ulegają redukcji tworząc niebieskie produkty tetrapolianionu wolframu i molibdenu.

W celu przygotowania ekstraktu roślinnego do oznaczenia zawartości fenoli całkowitych tkankę homogenizowano w 80% roztworze metanolu. Następnie homogenat wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Otrzymane supernatanty uzupełniano do objętości 5 cm^3 i wykorzystywano do oznaczeń.

Aby oznaczyć stężenie fenoli całkowitych do 0,5 cm^3 ekstraktu dodawano 3,4 cm^3 wody demineralizowanej oraz 0,1 cm^3 odczynnika Folina-Ciocalteu. Po 3 minutach inkubacji dodawano 1 cm^3 10% węglanu sodu (Na_2CO_3) i inkubowano przez kolejne 30 minut w ciemności. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda = 725 \text{ nm}$. Jednocześnie przygotowano próbę odnośną do której zamiast ekstraktu enzymatycznego dodano 80% metanol. Zawartość fenoli w próbach wyliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla kwasu chlorogenowego wykonanej w zakresie 25-200 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i wyrażono w mg g^{-1} świeżej masy.

3.2.12. Oznaczenie zawartości związków fenolowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

3.2.12.1. Przygotowanie ekstraktów

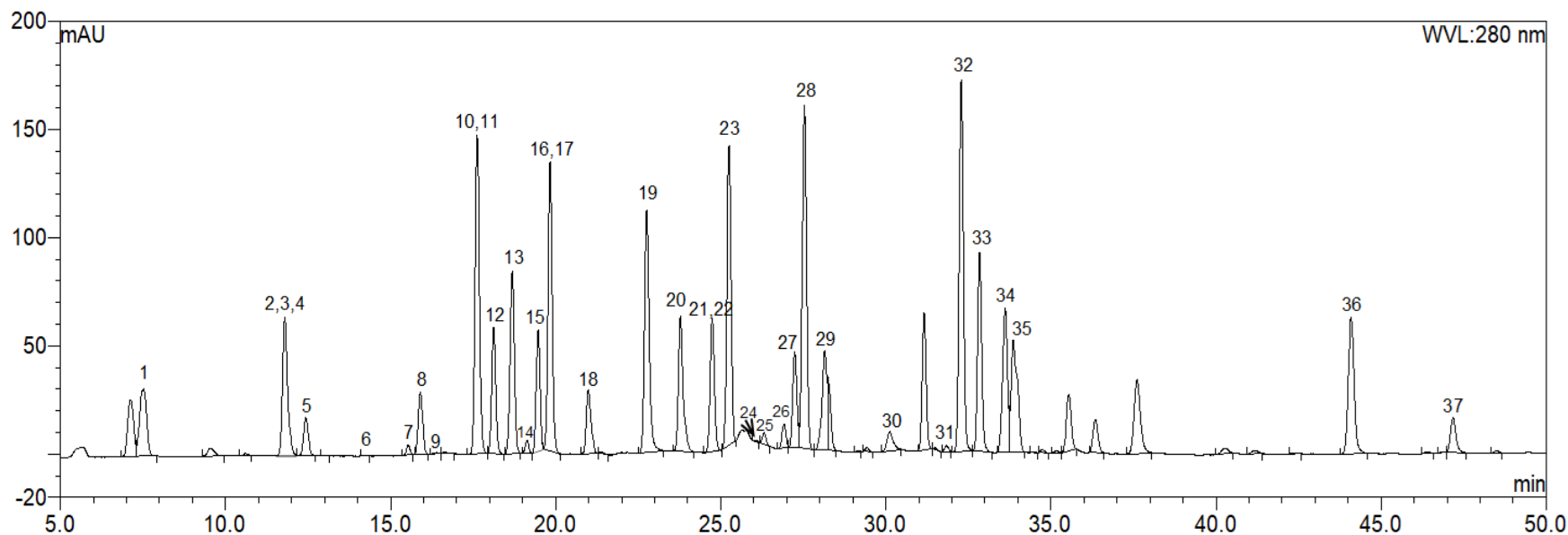
Tkaninę roślinną homogenizowano w moździerzu w 80% roztworze metanolu (1:5 w/v), następnie homogenat odwirowywano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Otrzymany supernatant zlewano i osad ekstrahowano 90% roztworem metanolu i ponownie wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Po zlanie supernatantu osad ekstrahowano 100% metanolem i odwirowywano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Mieszaninę 3 uzyskanych supernatantów zlewano do kolb okrągłodennych i odparowywano na wyparce próżniowej w temperaturze 65°C. Powstały osad rozpuszczano we wrzącej wodzie destylowanej i zlewano do probówek wirówkowych. Procedurę powtarzano 3 razy, po czym supernatanty wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C). Uzyskane ekstrakty uzupełniano wodą do takiej samej objętości (6 cm³) i dzielono na dwie części: do oznaczenia wolnych związków fenolowych oraz zglikozyłowanych związków fenolowych. W celu oznaczenia puli wolnych związków fenolowych pobierano 0,5 cm³ ekstraktu, przelewano do probówki typu Eppendorf i dodawano 1 cm³ metanolu czystości HPLC. Do czasu oznaczenia próby przechowywano w zamrażarce w temperaturze -18°C.

W celu uwolnienia związków fenolowych z formy zglikozyłowanej ekstrakt poddawano kwaśnej hydrolizie. Ekstrakt (3 cm³) poddawano hydrolizie w 4 M HCl w temperaturze 80°C przez 1,5 godziny. Następnie próbki studzono i doprowadzano do pH~2 za pomocą 30% NaOH, przelewano do probówek wirowniczych z korkiem i odwirowywano. W celu oznaczenia zawartości związków fenolowych uwolnionych z formy zglikozyłowanej pobierano 0,5 cm³ zhydrolizowanego ekstraktu, przelewano do probówki typu Eppendorf i dodawano 1 cm³ metanolu (czystości HPLC). Do czasu oznaczenia próby przechowywano w zamrażarce w temperaturze -18°C.

3.2.12.2 Oznaczenie zawartości związków fenolowych metodą HPLC

Układ HPLC do oznaczenia związków fenolowych (Summit ×2 Dual-Gradient System, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) wyposażony był w detektor fotodiodowy (PDA100 DAD) oraz detektor fluorescencyjny (RF-2000). Związki fenolowe obecne w ekstraktach rozdzielano na kolumnie RP-C18 (aQ Hypersil GOLD, 250 nm × 4,6 mm, 5 μm) połączonej z kolumną ochronną (GOLD aQ Drop-In guards, 10 × 4 mm, 5 μm) w temperaturze 25 °C. Objętość nastrzyku analizowanych próbek wynosiła 20 mm³. Rozdział prowadzono przy użyciu

gradientu wody (A) oraz metanolu (B) z dodatkiem 0,1 % kwasu mrówkowego. Szybkość przepływu wynosiła $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Gradient liniowy rozpoczęto po 2 minutach elucji izokratycznej 5% B, zwiększając powoli w ciągu 30 minut do 55% B, po czym nastąpiło 5 minut elucji izokratycznej. Pomiędzy 35 a 45 minutą stężenie fazy B wzrosło do 70%, po czym nastąpiła 5-minutowa elucja izokratyczna. Następnie między 50 a 52 minutą gradient przywrócono do początkowego 5% B i kolumnę ponownie kalibrowano przez następne 3 minuty. Absorbancję mierzono przy 235, 280, 325 i 375 nm, a fluorescencję przy 420 nm (wzbudzenie 270 nm, emisja 420 nm). Związki fenolowe w ekstraktach zidentyfikowano porównując czasy retencji i widma absorpcji UV analizowanych próbek z odpowiednimi danymi uzyskanymi z wzorców referencyjnych. Optymalne długości fali stosowane do sporządzenia krzywej kalibracyjnej i oznaczenia ilościowego poszczególnych związków fenolowych podane zostały na Rys. 8. Oznaczenie ilościowe oparto na krzywych kalibracyjnych dla wzorców związków fenolowych obejmujących zakres 5 - 200 mg cm^{-3} , liniowość krzywej kalibracyjnej zweryfikowano współczynnikiem korelacji ($r^2 \geq 0,9994$). Przed analizą całkowitej zawartości fenoli otrzymane ekstrakty wodne odwirowano ($36\,670 \times g$, 20 min, 4°C), dodatkowo przed analizą HPLC supernatanty przesączono przez filtr strzykawkowy $45 \mu\text{m}$. Zawartość poszczególnych związków fenolowych wyrażono w $\mu\text{g g}^{-1}$ świeżej masy.



- | | | |
|---|--|--|
| 1. kwas galusowy (280 nm) | 14. (-)-epikatechina (235 nm) | 27. hesperydyna (280 nm) |
| 2. kwas α -rezorcynowy (420 nm) | 15. kwas syringowy (420 nm) | 28. kwas <i>o</i> -kumarowy (420 nm) |
| 3. benzochinon (235 nm) | 16. cyjanidyna (280 nm) | 29. kwas rozmarynowy (420 nm) |
| 4. kwas protokatechowy (210 nm) | 17. kwas 1,3-dikawoilochinowy (325 nm) | 30. myricetyna (375 nm) |
| 5. pirokatechol (280 nm) | 18. aldehyd syringowy (280 nm) | 31. kwercetyna (375 nm) |
| 6. (-)-epigallokatechina (235 nm) | 19. kwas <i>p</i> -kumarowy (325 nm) | 32. kwas <i>trans</i> -cynamonowy (280 nm) |
| 7. (+)-katechina (235 nm) | 20. kwas ferulowy (420 nm) | 33. naryngenina (280 nm) |
| 8. kwas 4-hydroksybenzoesowy (235 nm) | 21. kumaryna (280 nm) | 34. luteolina (325 nm) |
| 9. procyanidyna B2 (280 nm) | 22. kwas synapinowy (420 nm) | 35. hesperytyna (280 nm) |
| 10. aldehyd 4-hydroksybenzoesowy (280 nm) | 23. kwas <i>trans</i> -3-hydroksycynamonowy (280nm) | 36. flawon (280 nm) |
| 11. kwas chlorogenowy (325 nm) | 24. glikozyd 7- <i>O</i> - β -D-luteoliny (325 nm) | 37. 3-hydroksyflawon (235 nm) |
| 12. kwas wanilinowy (420 nm) | 25. rutyna (375 nm) | |
| 13. kwas β -rezorcynowy (420 nm) | 26. kwas elagowy (235 nm) | |

Rys. 8. Chromatogram oraz długości fali stosowane do oznaczenia zawartości związków fenolowych metodą HPLC

3.2.13. Oznaczenie aktywności enzymów związanych z metabolizmem azotu

3.2.13.1. Przygotowanie ekstraktów enzymatycznych

W celu oznaczenia aktywności NR oraz NiR tkankę roślinną umieszczano w zmrożonym mózdzierzu i homogenizowano (1:5 w/v) w 0,1 M buforze fosforanowym (sól potasowa) o pH 7,5 zawierającym 1 mM EDTA, 5 mM cysteinę oraz 0,5% PVP.

W celu oznaczenia aktywności GS, GDH, AlaAT oraz AspAT tkankę roślinną homogenizowano (1:5 w/v) w zmrożonym mózdzierzu w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 7,6 z dodatkiem 1 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM β -merkaptioetanolu, 1 mM DTT oraz 0,5% PVP.

W celu oznaczenia aktywności GOGAT tkankę roślinną homogenizowano (1:5 w/v) w zmrożonym mózdzierzu w 0,05 M buforze fosforanowym (sól potasowa) o pH 7,5 zawierającym 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,1% β -merkaptioetanol, 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) oraz 20% glikol etylenowy.

Homogenaty wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min, 4°C) a otrzymane supernatanty wykorzystywano do oznaczania aktywności enzymów.

3.2.13.2. Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej (NR)

Zasada metody

Aktywność NR oznaczano zgodnie ze zmodyfikowaną metodą opisaną przez Debouba i wsp. [2006a]. Metoda opiera się na oznaczeniu ilości jonów NO_2^- powstających w wyniku reakcji katalizowanej przez obecny w ekstrakcie enzym.

Wykonanie oznaczenia

W celu oznaczenia aktywności NR, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,1 M bufor fosforanowy (sól potasowa) o pH 7,5 zawierający 5 mM EDTA, a także 7 mM KNO_3 , ekstrakt enzymatyczny oraz 0,14 mM NADH, którego aplikacja rozpoczynała reakcję. Po 60 minutach inkubacji w temperaturze 27 °C, reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 M octanu cynku, a następnie próbki odwirowano ($3000 \times g$, 10 min). Oprócz prób badanych przygotowano próby odnośnikowe, które nie zawierały NADH. Ilość powstałych jonów azotynowych oznaczano kolorymetrycznie po diazowaniu 1% sulfanilamidem (SA) i 0,01% chlorowodorkiem N- (1- naftylo)-etylenodiaminy (NEA). Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej,

mierzone absorbancję przy $\lambda = 540$ nm. Ilość utworzonego azotynu obliczono przy użyciu przygotowanej dla NaNO_2 krzywej kalibracyjnej. Za jednostkę aktywności NR (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola NO_2^- w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.13.3. Oznaczenie aktywności reduktazy azotynowej (NiR)

Zasada metody

Aktywność NiR oznaczano według zmodyfikowanej metody Debouba i wsp. [2006a]. Metoda ta opiera się na oznaczeniu ubytku ilości jonów NO_2^- w mieszaninie reakcyjnej na skutek działania enzymu obecnego w ekstrakcie.

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna składała się z 0,1 M buforu fosforanowego (sól potasowa) o pH 6,8, 0,4 mM NaNO_2 , 2,3 mM wiologenu metylowego, ekstraktu enzymatycznego i 4,3 mM ditioninu sodu w 100 mM NaHCO_3 , którego dodanie rozpoczynało reakcję. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 27°C , reakcję zatrzymywano przez wytrząsanie mieszaniny reakcyjnej do utraty barwy. Jednocześnie wykonywano próby odnośnikowe, do których zamiast ditioninu sodu dodawano wodę destylowaną. Ilość jonów NO_2^- pozostałych w mieszaninie reakcyjnej oznaczano po dodaniu 1% SA oraz 0,01% NEA przy długości fali $\lambda = 540$ nm. Za jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje rozkład 1 nmola NO_2^- w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.13.4. Oznaczenie aktywności syntetazy glutaminowej (GS)

Zasada metody

Aktywność GS oznacza się mierząc aktywność transferazową tego enzymu wg metody opisanej przez Agbaria i wsp. [1998]. W reakcji tej enzym katalizuje przeniesienie reszty glutamylowej glutaminy na hydroksylaminę, co prowadzi do powstania γ -glutamylhydroksamianu i uwolnienia amoniaku. Miara aktywności GS jest stężenie γ -glutamylhydroksamianu, który oznacza się kolorymetrycznie poprzez reakcję z jonami Fe^{3+} w środowisku kwaśnym prowadzącą do powstania kompleksu o barwie brązowo-czerwonej.

Wykonanie oznaczenia

Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM bufor Tris-HCl pH 7,2, 1 mM ADP, 50 mM glutaminę, 20 mM MgCl_2 , 20 mM arsenian sodu, ekstrakt enzymatyczny i 13 mM hydroksyloaminę, której dodanie zapoczątkowywało reakcję. Jednocześnie dla każdego ekstraktu przygotowano próbę odnośnikową niezawierającą glutaminy. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 30°C reakcję kończono poprzez dodanie mieszaniny składającej się z 0,5 M HCl, 0,2 M FeCl_3 oraz 0,24 M kwasu trichlorooctowego. Dodatkowo przygotowano próbę odczynnikową składającą się z wody destylowanej oraz mieszaniny 0,5 M HCl, 0,2 M FeCl_3 i 0,24 M kwasu trichlorooctowego. Próbkę wirowano ($33\,987 \times g$, 15 min) i mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 540\text{ nm}$. Za jednostkę aktywności GS (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola γ -glutamylhydroksamianu w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.13.5. Oznaczenie aktywności dehydrogenazy glutaminianowej (GDH)

Zasada metody

Aktywność GDH oznaczano spektrofotometrycznie według metody opisanej przez Groat i Vance [1981]. Metoda opiera się na oznaczeniu szybkości utlenienia NADH (aktywność aminująca GDH, NADH-GDH) lub redukcji NAD (aktywność deaminująca GDH, NAD-GDH).

Wykonanie oznaczenia

Dla aktywności NADH-GDH mieszanina reakcyjna składała się z 0,1 M buforu Tris-HCl pH 8,0, ekstraktu enzymatycznego, 11 mM kwasu 2-oksoglutazarowego, 0,1 M NH_4Cl i 0,2 mM NADH, którego dodanie rozpoczynało reakcję. Przygotowano również próbę odnośną pozbawioną NH_4Cl .

Mieszanina reakcyjna do oznaczenia aktywności NAD-GDH składała się z 0,1 M buforu Tris-HCl pH 8,8, ekstraktu enzymatycznego, 80 mM kwasu glutaminowego i 0,7 mM NAD, którego dodanie rozpoczynało reakcję. Próba bez dodatku kwasu glutaminowego stanowiła próbę odnośną. Absorbancję prób badanych i odnośnikowych mierzono przy długości fali $\lambda = 340\text{ nm}$ przez 6 minut.

Aktywność GDH obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla NADH $\varepsilon = 6,22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności GDH (U) przyjęto taką ilość enzymu, która

katalizuje utlenianie/redukcję 1 nmola NADH/NAD w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg⁻¹ białka.

3.2.13.6. Oznaczenie aktywności syntazy glutaminianowej (GOGAT)

Zasada metody

Aktywność NADH-GOGAT oznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody opisanej przez Groat i Vance [1981], natomiast aktywność Fd-GOGAT oznaczano zgodnie z metodą Debouba i wsp. [2006b].

Wykonanie oznaczenia

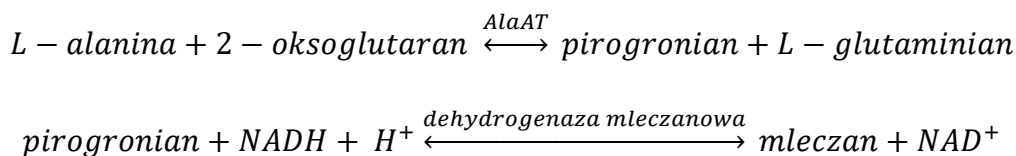
Mieszanina reakcyjna do oznaczenia aktywności NADH-GOGAT zawierała 0,1 M bufor fosforanowy (sól potasowa) o pH 7,5, ekstrakt enzymatyczny, 5 mM kwas 2- oksoglutarowy, 10 mM glutaminę oraz 0,15 mM NADH, którego dodanie rozpoczynało reakcję. Równolegle wykonano próby odnośne pozbawione glutaminy. Zmiany absorbancji oznaczano przy długości fali $\lambda = 340$ nm przez 4 minuty. Aktywność enzymu obliczano stosując molowy współczynnik absorpcji dla NADH $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Za jednostkę aktywności NADH-GOGAT (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje utlenienie 1 nmola NADH w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg⁻¹ białka.

Mieszanina reakcyjna do oznaczenia aktywności Fd-GOGAT zawierała 0,1 M bufor fosforanowy (sól potasowa) o pH 7,5, ekstrakt enzymatyczny, 5 mM kwas 2-oksoglutarowy, 10 mM glutaminę, 2,5 mM wiologen metylowy oraz 5 mM ditionin sodu w 190 mM NaHCO₃, którego dodanie rozpoczynało reakcję. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze 30 °C reakcja była zatrzymywana poprzez intensywne mieszanie do utraty barwy i gotowanie przez 10 minut. Zawartość glutaminianu w mieszaninie reakcyjnej oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do oznaczania metodą enzymatyczną jak opisano w punkcie 3.2.16. Za jednostkę aktywności Fd-GOGAT (U) przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje powstanie 1 nmola glutaminianu w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg⁻¹ białka.

3.2.13.7. Oznaczenie aktywności aminotransferazy alaninowej (AlaAT)

Aktywność AlaAT oznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do oznaczania.

Metoda opiera się na dwóch reakcjach:

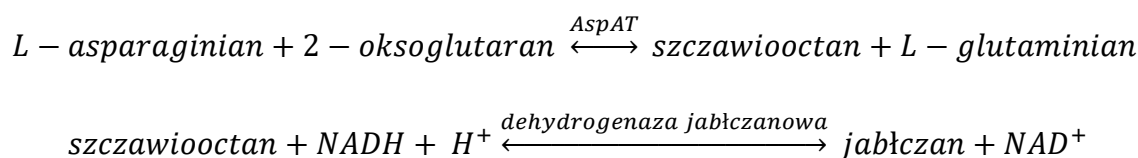


Aminotransferaza alaninowa katalizuje przeniesienie grupy aminowej z alaniny na 2- oksoglutaran tworząc pirogronian i glutaminian. Pirogronian jest redukowany przez NADH, w wyniku czego powstaje mleczan i NAD. Szybkość zmian absorbancji, mierzona przy długości fali $\lambda=340$ nm, jest proporcjonalna do aktywności aminotransferazy alaninowej. Za jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje utlenienie 1nmola NADH w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.13.8. Oznaczenie aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT)

Aktywność AspAT oznaczano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do oznaczania.

Metoda opiera się na dwóch reakcjach:



Aminotransferaza asparaginianowa katalizuje przeniesienie grupy aminowej z asparaginianu na 2-oksoglutaran tworząc szczawiooctan i glutaminian. Szczawiooctan jest redukowany przez NADH, w wyniku czego powstaje jabłczan i NAD. Szybkość zmian absorbancji, mierzona przy długości fali $\lambda=340$ nm, jest proporcjonalna do aktywności aminotransferazy asparaginianowej. Za jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje utlenienie 1nmola NADH w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu wyrażono w U mg^{-1} białka.

3.2.14. Oznaczenie ilości jonów azotanowych (NO_3^-) oraz jonów amonowych (NH_4^+)

3.2.14.1. Przygotowanie homogenatów

Tkaninę siewek ogórka homogenizowano w moździerzu w wodzie demineralizowanej (1:10 w/v). Następnie homogenaty umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 100 °C na 15 minut, chłodzono i przesączano przez bibułę filtracyjną.

3.2.14.2. Oznaczenie ilości jonów NO_3^-

Zawartość NO_3^- oznaczano kolorymetrycznie według metody Cataldo i wsp. [1975]. Metoda ta opiera się na nitrowaniu kwasu salicylowego w kwaśnym środowisku reakcji. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 cm³ filtratu, 0,4 cm³ 5% kwasu salicylowego w stężonym H_2SO_4 . Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 9,5 cm³ 2 M NaOH, chłodzono i mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 410$ nm. Zawartość jonów azotanowych obliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla NO_3^- i wyrażano w mg g⁻¹ świeżej masy.

3.2.14.3. Oznaczanie ilości jonów NH_4^+

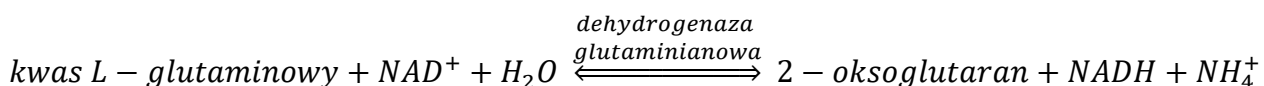
Zawartość NH_4^+ oznaczano kolorymetrycznie według metody opisanej przez Molins-Legua i wsp. [2006]. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 cm³ filtratu, 0,01 cm³ 10% winianu sodowo-potasowego, 2,4 cm³ wody destylowanej oraz 0,1 cm³ odczynnika Nesslera. Po 5 minutach inkubacji mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 425$ nm. Zawartość jonów amonowych obliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla NH_4^+ i wyrażano w mg g⁻¹ świeżej masy.

3.2.15. Oznaczenie zawartości kwasu L - glutaminowego

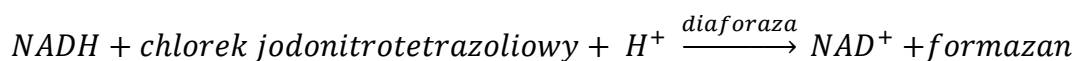
Zawartość kwasu glutaminowego oznaczano kolorymetrycznie z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do oznaczania.

Metoda opiera się na dwóch reakcjach:

1. Kwas L-glutaminowy utleniany jest przez dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD) do 2-oksoglutaranu w obecności enzymu dehydrogenazy glutaminianowej.



2. W reakcji katalizowanej przez diaforazę utworzony NADH bierze udział w przekształceniu chlorku jodonitrotetrazoliowego w formazan, którego zawartość mierzona jest kolorymetrycznie przy długości fali $\lambda=492$ nm.



Zawartość kwasu glutaminowego wyrażono w $\mu\text{mol g}^{-1}$ świeżej masy.

3.2.16. Analiza profilu ekspresji genów dla białek NR, NiR, GS, GOGAT i GDH

Profil ekspresji genów analizowano w liściu I siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni.

3.2.16.1. Izolacja RNA

Próby z liścia I homogenizowano w ciekłym azocie, przenoszono do probówek typu Eppendorf i dodawano roztwór do izolacji RNA- BlueZol (Serva) w ilości 1 cm^3 na 100 mg tkanki. Próby inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym dodawano 0,3 cm^3 chloroformu i wytrząsano przez 15 sekund. Próby inkubowano przez 10 minut, a następnie wirowano ($12\,000 \times g$, 15 min, 4°C).

Próby rozdzieliły się na bladożółtą fazę organiczną, interfazę (obie zawierają DNA i białka) oraz bezbarwną górną fazę wodną zawierającą RNA. Uzyskaną fazę wodną przenoszono do czystych próbek typu Eppendorf i dodano 0,25 cm^3 izopropanolu i 0,25 cm^3 mieszaniny 0,8 M cytrynianu sodu i 1,2M NaCl w celu precypitacji RNA. Próby inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano ($12\,000 \times g$, 10 min, 4°C). Otrzymany osad płukano 75% etanolem, wytrząsano i wirowano ($7500 \times g$, 5 min, 4°C). Etanol usuwano, osad osuszano pozostawiając probówki otwarte w temperaturze pokojowej przez ok. 5 minut. Osad rozpuszczano w 0,3 cm^3 sterylnej wody z dodatkiem pirowęglań dietylowego, inkubowano w łaźni wodnej przez 10 minut w temperaturze 60°C , a następnie przechowywano w temperaturze -80°C .

3.2.16.2. Pomiar stężenia i ocena czystości RNA

Stężenie RNA w próbach oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=260$ nm Chomczyński [1993]. Przyjmuje się, że absorbancja przy tej długości fali jest równa 1 dla RNA o stężeniu $40 \mu\text{g cm}^{-3}$. Aby ocenić czystość RNA zmierzono również absorbancję przy długości

fali $\lambda=230$ nm i $\lambda=280$ nm, a także wyliczono stosunki wartości A_{260}/A_{280} i A_{230}/A_{260} . Wartość stosunków absorbancji w przedziale 1,8-2,2 świadczy o wysokiej czystości RNA [Green i Sambrook, 2012].

Ponadto wybrane próby poddano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 2,2 M formaldehydu. W celu przygotowania próbek do rozdziału elektroforetycznego zmieszano ze sobą 10 mm³ RNA, 2 mm³ 10× stężonego buforu do elektroforezy MOPS (kwas 3-(N- morfolino)propanosulfonowy), 4 mm³ 38% formaldehydu, 10 mm³ 70% formamidu, a także 1 mm³ bromku etydyny. Próby inkubowano w temperaturze 55°C przez 1 godzinę, a następnie po schłodzeniu prób dodano 2 mm³ buforu obciążającego, który zawierał 40% sacharozę, 0,17% cyjanol ksylenowy i 0,17% błękit bromofenolowy. Do każdej studzienki nanoszono 20 mm³ próby zawierającej 1 µg RNA. Żele poddawano analizie w świetle UV o długości fali $\lambda=300$ nm.

3.2.16.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Przeprowadzono syntezę nici komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy RNA przy użyciu zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). Mieszanina reakcyjna zawierała 2 mm³ 10× stężonego buforu do odwrotnej transkrypcji, 0,8 mm³ 100 nM mieszaniny deoksynukleotydów, 2 mm³ 10× stężonych losowych starterów, 1 mm³ odwrotnej transkryptazy (MultiScribe), 1 mm³ inhibitora RNaz i 3,2 mm³ wody wolnej od nukleaz. W celu sprawdzenia czy w próbce obecne jest DNA przygotowano reakcję kontrolną z użyciem wyżej wymienionej mieszaniny reakcyjnej bez dodatku odwrotnej transkryptazy. RNA rozcieńczono w taki sposób, aby w 10 mm³ próby wykorzystywanej do reakcji był 1 µg RNA. 10 mm³ RNA oraz 10 mm³ mieszaniny reakcyjnej dodawano do probówek do PCR i umieszczano w termocyklerze. Termocykler zaprogramowano według zaleconego przez producenta schematu: 25 °C- 10 minut, 37 °C- 120 minut, 85 °C- 5 minut, 4 °C- przechowywanie. Po reakcji próby rozcieńczano do stężenia końcowego 1 ng mm⁻³.

3.2.16.4. Reakcja RT-qPCR

Łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR, RT-qPCR) przeprowadzono na urządzeniu 7500 Real Time PCR. Reakcje prowadziło dla genów reduktazy azotanowej (NR-2), reduktazy azotynowej (NiR), syntetazy glutaminowej (GS-1 oraz GS-4), syntazy glutaminianowej zależnej od ferredoksyny (GOGAT-1-1), syntazy

glutaminianowej zależnej od NADH (GOGAT-2-1) oraz dehydrogenazy glutaminianowej (GDH-1 oraz GDH-2) oraz 2 genów referencyjnych - białek ubikwitynopochoodnych u ogórka: UBI-1 oraz UBI-ep.

Metoda RT-qPCR opiera się na analizie kinetyki reakcji PCR w czasie jej trwania. Jest to możliwe poprzez zastosowanie barwników fluorescencyjnych, które wiążą się do DNA. Ocena poziomu emitowanej przez barwniki fluorescencji, który zależy od stężenia amplikonu, daje możliwość monitorowania przyrostu produktu reakcji. Pomiar wykonywany jest w fazie wykładniczej reakcji, gdzie każda cząsteczka matrycy daje w wyniku amplifikacji dwie cząsteczki potomne. Do reakcji RT-qPCR jako detektor wykorzystano barwnik SYBR Green, który interkaluje pomiędzy zasady DNA. Z uwagi na fakt, że barwnik ten może się również wiązać z niespecyficznymi produktami PCR, wykonano analizy krzywej topnienia otrzymanych produktów.

Po zoptymalizowaniu reakcji tj. temperatury przyłączania, ilości matrycy oraz liczby cykli reakcję prowadzono w następujących warunkach: aktywacja 95°C przez 5 min, amplifikacja (40 cykli) 95°C przez 10 s, 60°C przez 1 min, 72°C przez 30 s. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 10 mm³ wchodziło 3 mm³ cDNA, 5 mm³ Real-Time 2xHS-PCR Master Mix SYBR A/LoROX, 0,5 mm³ odpowiednich starterów oraz 1,5 mm³ wody dejonizowanej. Uzyskane wyniki normalizowano względem genów referencyjnych UBI-1 oraz UBI-ep, czyli genów, których ekspresja jest stała bez względu na warunki doświadczenia, we wszystkich analizowanych próbach. Względną ekspresję genów obliczano z wykorzystaniem oprogramowania REST.

3.2.17. Analiza statystyczna wyników

Przedstawione wyniki są średnią arytmetyczną z n pomiarów, z roślin pochodzących z co najmniej 3 niezależnie przeprowadzonych hodowli. Ze względu na różnice w liczbie pomiarów wartość „n” została przedstawiona przy opisie wyników, dla każdego analizowanego parametru oddzielnie. Analizy statystyczne wykonano w oparciu o pakiet Statistica, wersja 13.1. Ze względu na charakter uzyskanych danych, istotność statystyczną wyników oceniano przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Badano hipotezę zerową (H_0) o braku wpływu danego czynnika, wobec hipotezy alternatywnej (H_1) o jego istotnym wpływie. Szczegółowe zróżnicowanie istotności między wariantami (wariantem traktowanym N_i i odpowiadającą mu kontrolą) określano na podstawie testu NIR, przy poziomie istotności

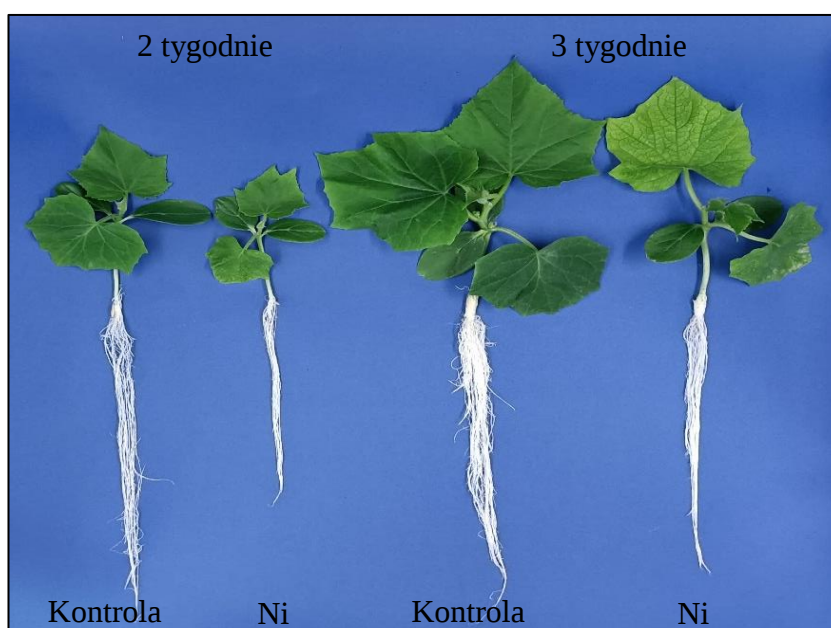
$p \leq 0,05$. Wartości podano w postaci średnich $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Przedstawione w tabelach i na rycinach wyniki dla wariantu Ni różniące się istotnie (przy poziomie istotności $p \leq 0,05$) od odpowiedniego wariantu kontrolnego oznaczano *.

4. Wyniki

4.1. Parametry wzrostowe

Wpływ Ni na wzrost siewek ogórka oceniano na podstawie pomiarów parametrów wzrostowych tj. biomasy liści i korzenia oraz powierzchni liści. Zwrócono także uwagę na wizualne objawy toksyczności Ni u roślin traktowanych.

Nikiel spowodował wyraźne zahamowanie wzrostu zarówno części nadziemnej jak i podziemnej siewek ogórka (Rys. 9). Obserwowano znaczne skrócenie długości korzeni oraz zmniejszenie liczby korzeni w wiązce w porównaniu do kontroli. Na liściach oprócz zmniejszonej powierzchni blaszki liściowej zaobserwowano obszary nekrotyczne widoczne na brzegu blaszki 3-tygodniowych siewek ogórka traktowanych Ni. Dodatkowo w obu punktach czasowych obserwowano rozproszone na całej blaszce liściowej chlorozy.

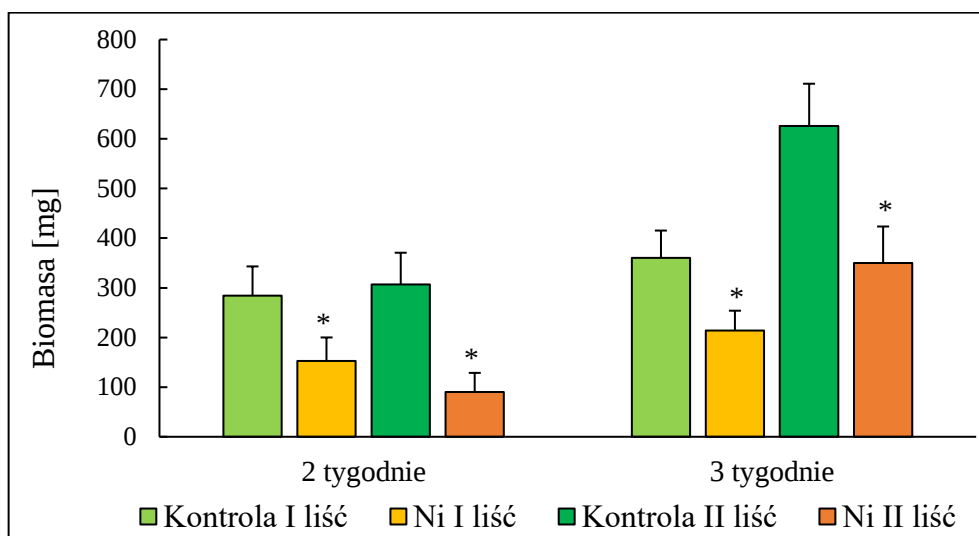


Rys. 9. Pokrój 2- i 3-tygodniowych siewek ogórka kontrolnych i traktowanych Ni

4.1.1. Biomasa

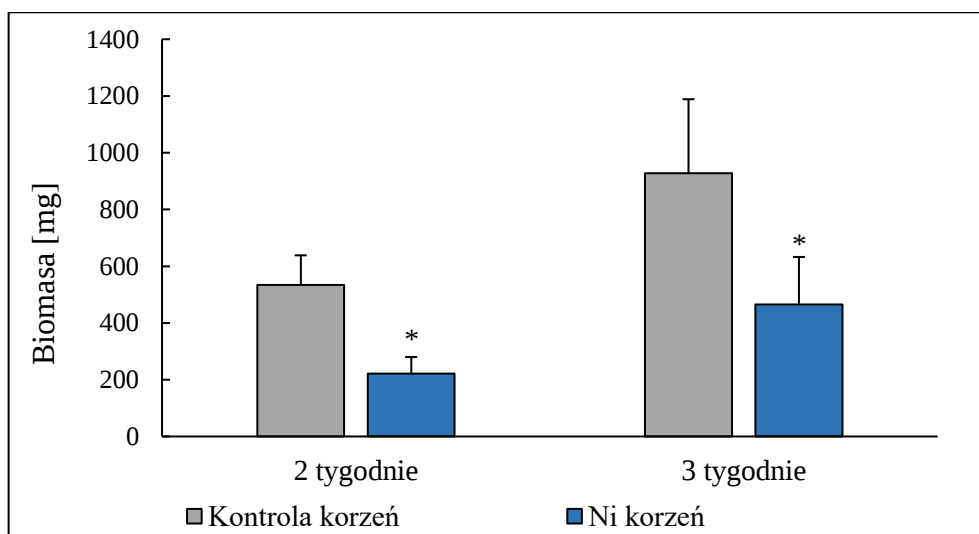
Na Rys. 10 i Rys. 11 przedstawiono biomasę badanych organów siewek ogórka. Aplikacja Ni do pożywki spowodowała istotny spadek biomasy we wszystkich badanych wariantach, jednak obserwowane zmiany były większe po 2 tygodniach uprawy. Najwyższy spadek biomasy (70%) dotyczył II liścia siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania metalem. Biomasa I liścia zmniejszyła się o 46% i 40%, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni, natomiast

biomasa II liścia po 3 tygodniach była niższa o 44%. Biomasa korzenia siewek traktowanych Ni po 2 i 3 tygodniach spadła odpowiednio o 58% i 50% w porównaniu z kontrolą.



Rys. 10. Biomasa I oraz II liścia siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 10-20)



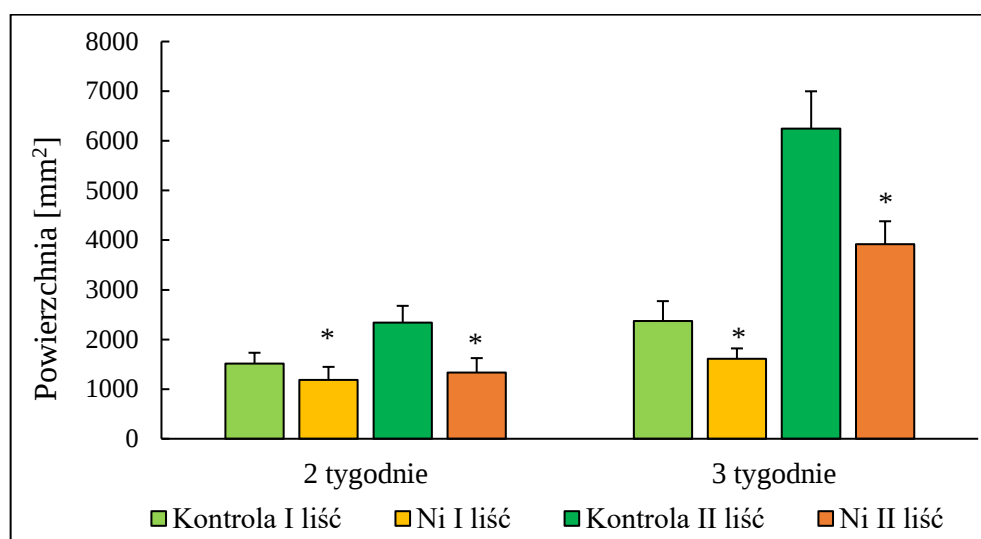
Rys. 11. Biomasa korzenia siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 17-20)

4.1.2. Powierzchnia blaszki liściowej

Na Rys. 12 przedstawiono wpływ niklu na pole powierzchni blaszki liściowej I i II liścia siewek ogórka. Po 2 tygodniach traktowania Ni powierzchnia I i II liścia zmniejszyła się odpowiednio

o 22% i 43% w stosunku do kontroli. Trzytygodniowe traktowanie siewek ogórka Ni spowodowało 32% oraz 37% zmniejszenie powierzchni blaszki, odpowiednio I i II liścia.

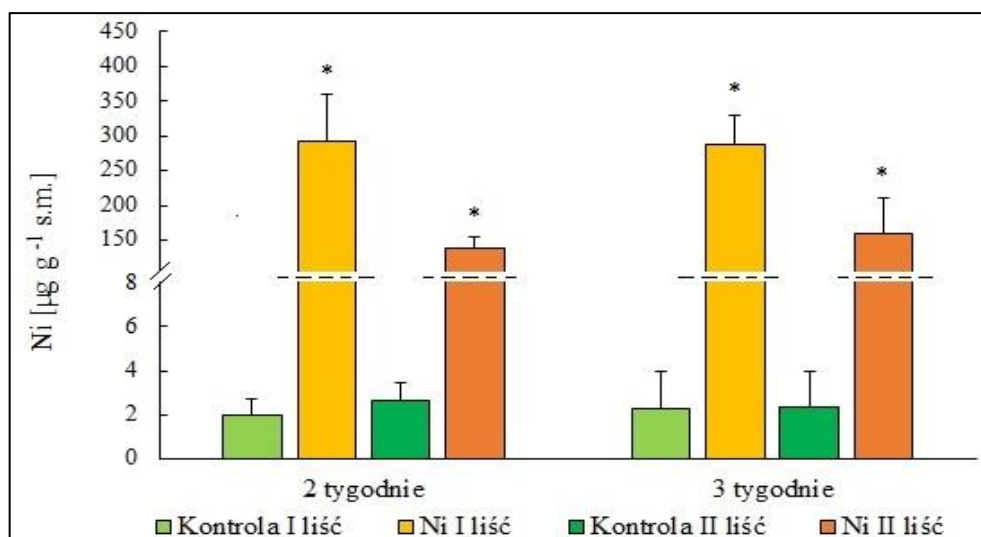


Rys. 12. Powierzchnia I oraz II liścia po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 5-8)

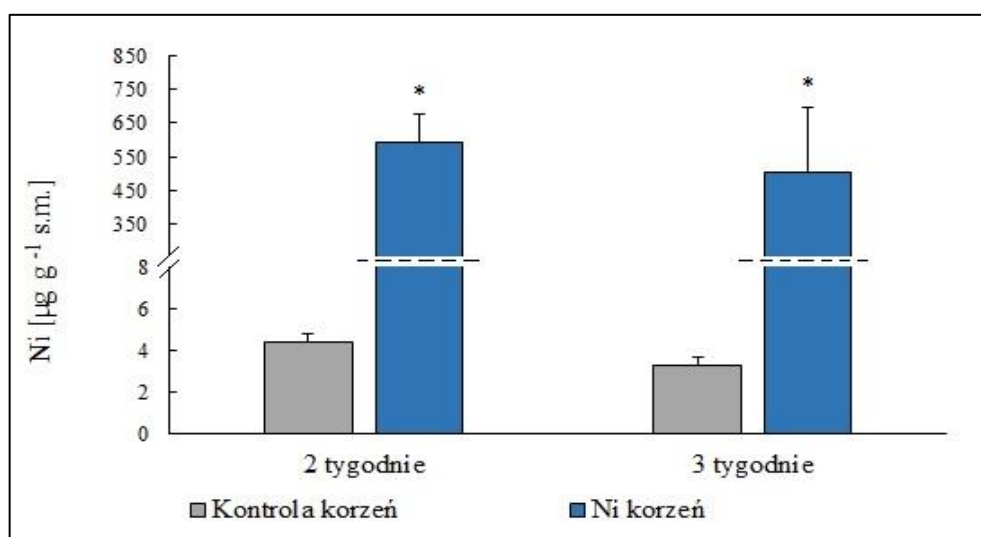
4.2. Zawartość niklu, magnezu, żelaza, manganu, potasu i sodu

Aplikacja Ni do podłoża spowodowała znaczny wzrost stężenia Ni we wszystkich badanych organach (Rys. 13, Rys. 14). Po 2 tygodniach traktowania metalem obserwowano 148-krotny wzrost stężenia Ni w liściu I, 51-krotny w liściu II oraz 135-krotny w korzeniu. Po 3 tygodniach traktowania największy wzrost stężenia Ni (155-krotny) obserwowano w korzeniu, w liściu I nastąpił 125-krotny, a w liściu II 68-krotny wzrost stężenia Ni w porównaniu z kontrolą. W obu punktach czasowych najmniejszą akumulację Ni obserwowano w liściu II siewek ogórka.



Rys. 13. Zawartość Ni w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 5-7)

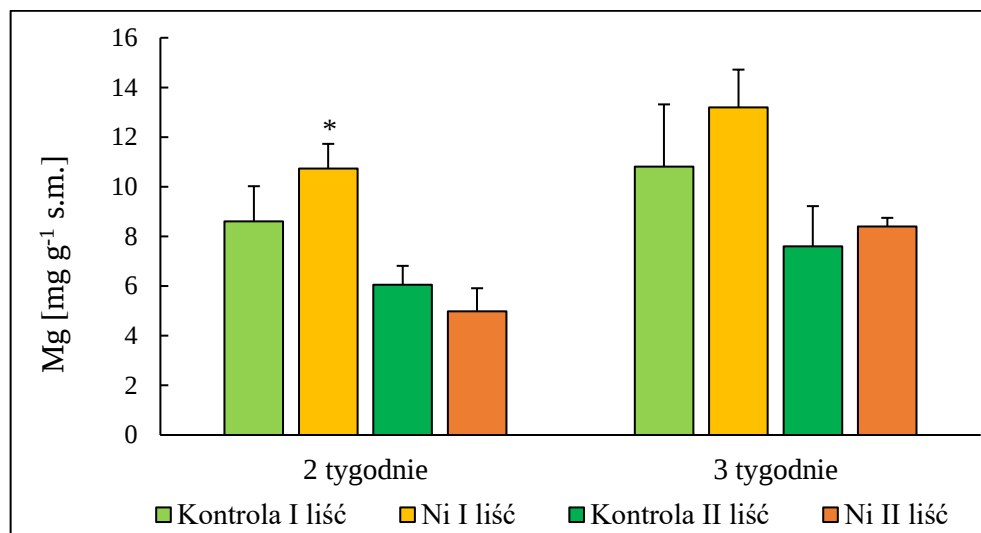


Rys. 14. Zawartość niklu w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-4)

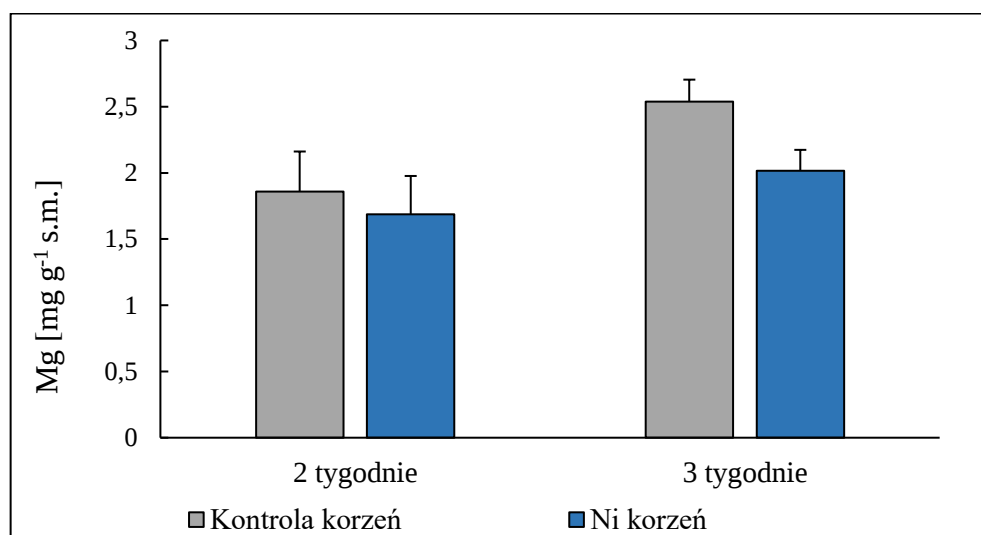
Na Rys. 15 - Rys. 24 przedstawiono wpływ Ni na zawartość magnezu, żelaza, manganu potasu oraz sodu w siewkach ogórka. Dodanie Ni do podłoża spowodowało 25% wzrost zawartości Mg w liściu I siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania. Zaobserwowano również 18% wzrost zawartości Fe w tym liściu po 2 tygodniach traktowania metalem. W korzeniu stwierdzono 37% i 108% wzrost stężenia Fe, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni. Po dłuższym czasie ekspozycji na Ni odnotowano 41% i 37 % spadek zawartości Mn, odpowiednio w liściu I oraz II. Aplikacja Ni spowodowała wzrost zawartości K po 3 tygodniach

traktowania Ni, odpowiednio w liście I i II wynosił on 42% i 28%, natomiast w korzeniu odnotowano 9% spadek zawartości K w obu badanych punktach czasowych. Stwierdzono również 33% spadek zawartości Na w korzeniu siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni.



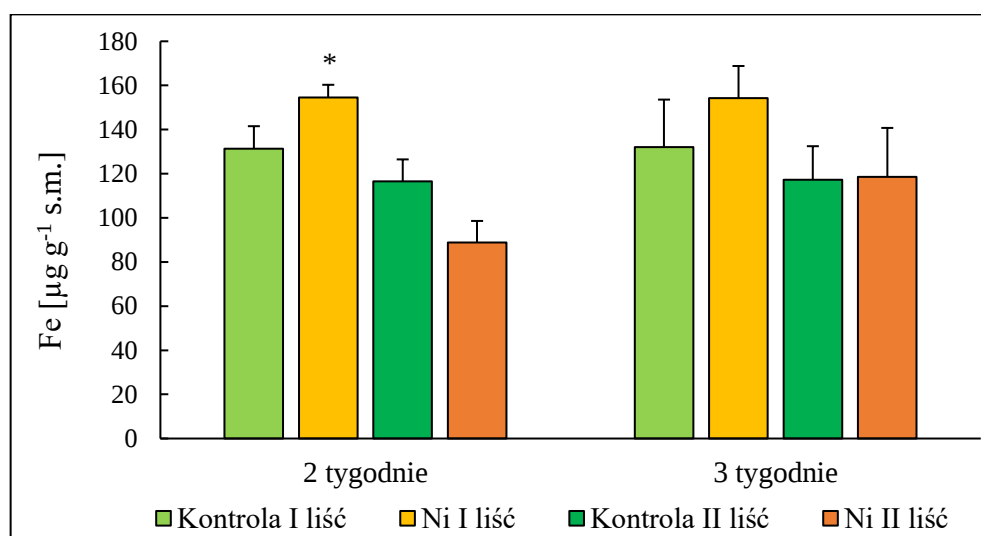
Rys. 15. Zawartość magnezu w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-5)

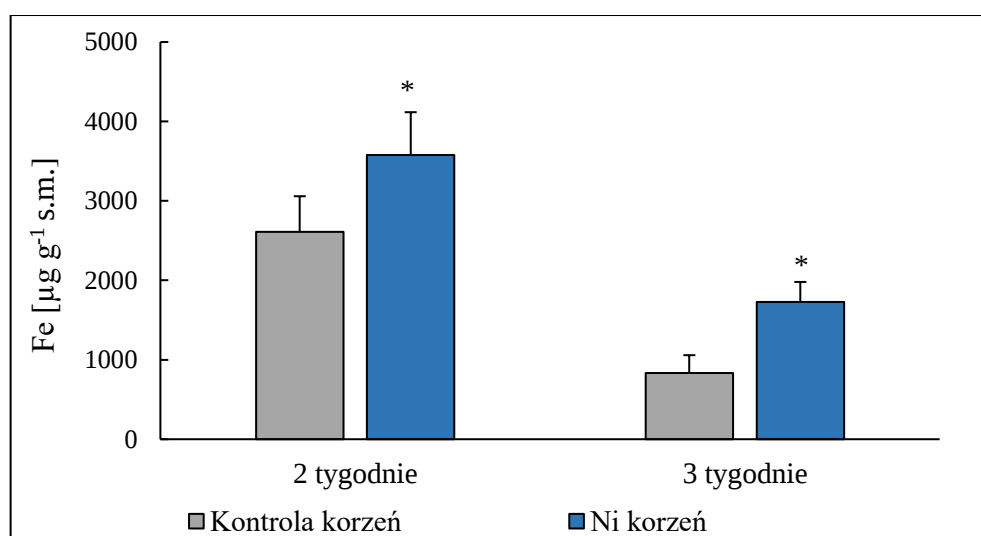


Rys. 16. Zawartość magnezu w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

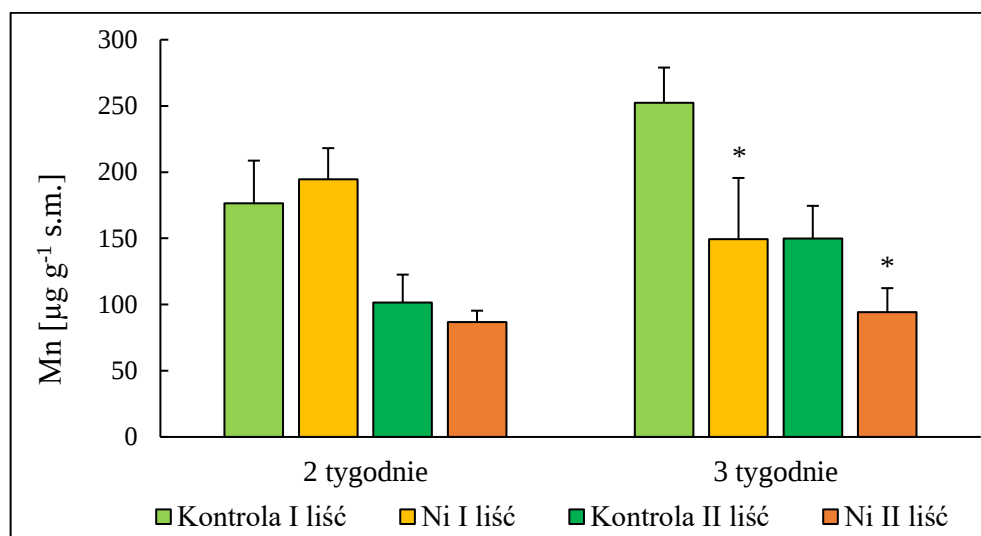
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-6)



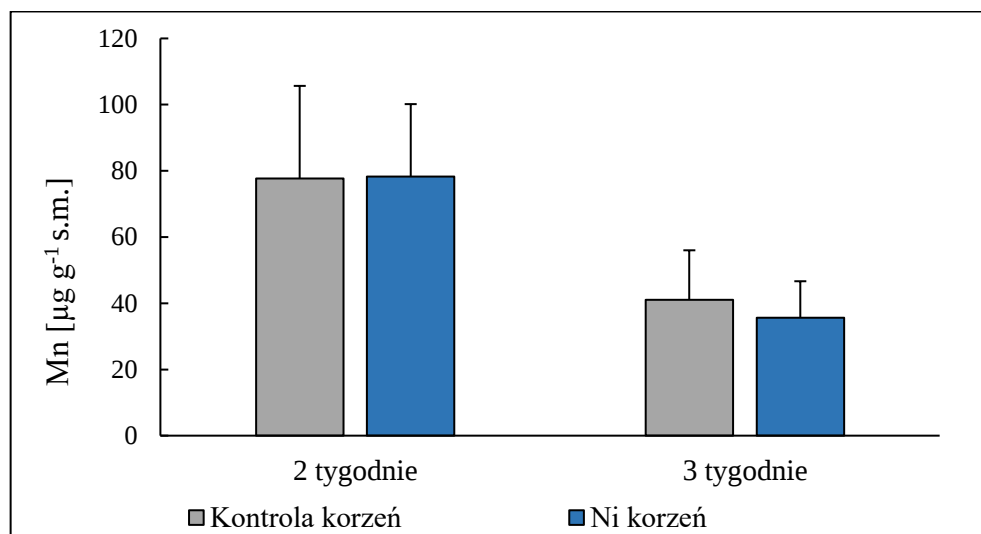
Rys. 17. Zawartość żelaza w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-5)



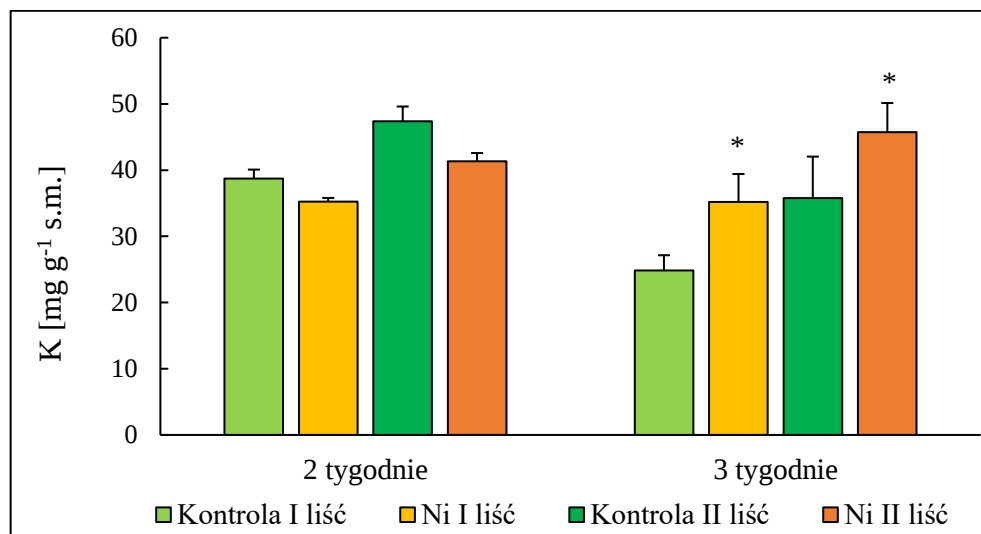
Rys. 18. Zawartość żelaza w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-6)



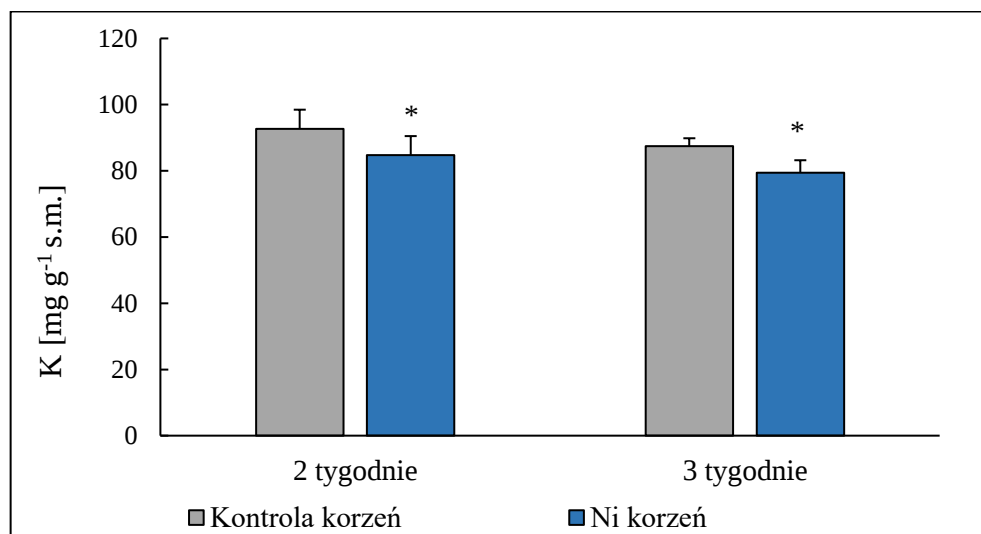
Rys. 19. Zawartość manganu w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-5)



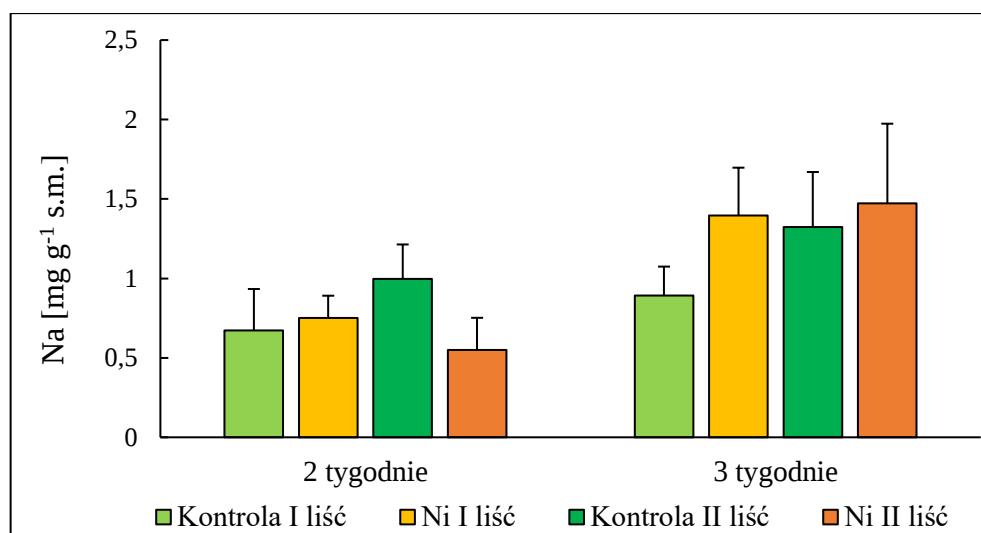
Rys. 20. Zawartość manganu w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-6)



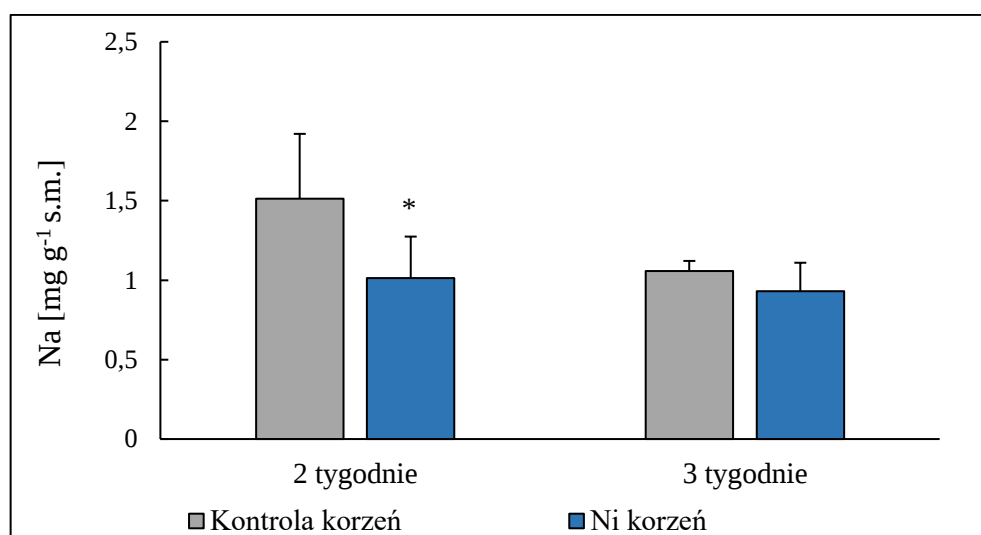
Rys. 21. Zawartość potasu w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-4)



Rys.22. Zawartość potasu w korzeniu liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-6)



Rys. 23. Zawartość sodu w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

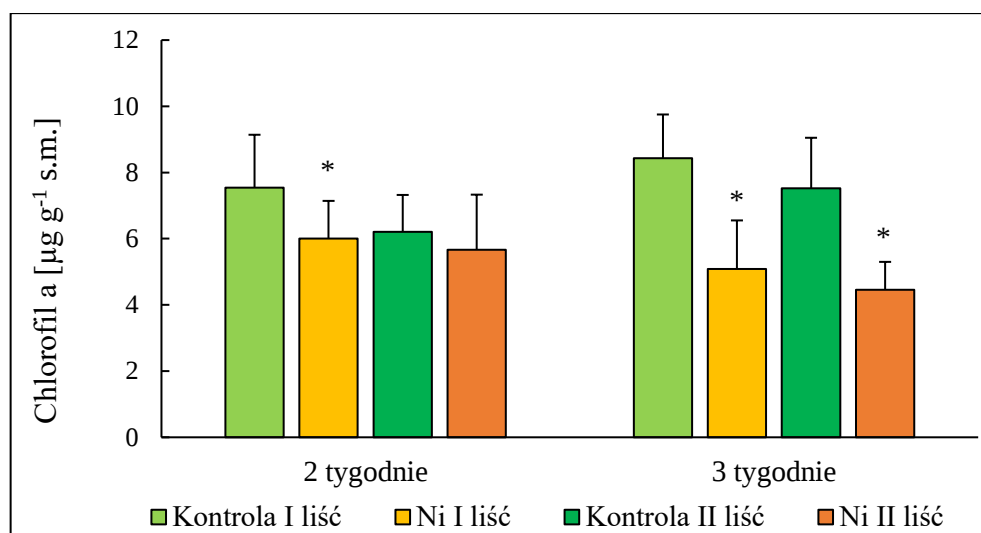


Rys. 24. Zawartość sodu w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

4.3. Zawartość barwników fotosyntetycznych

4.3.1. Zawartość chlorofilu a

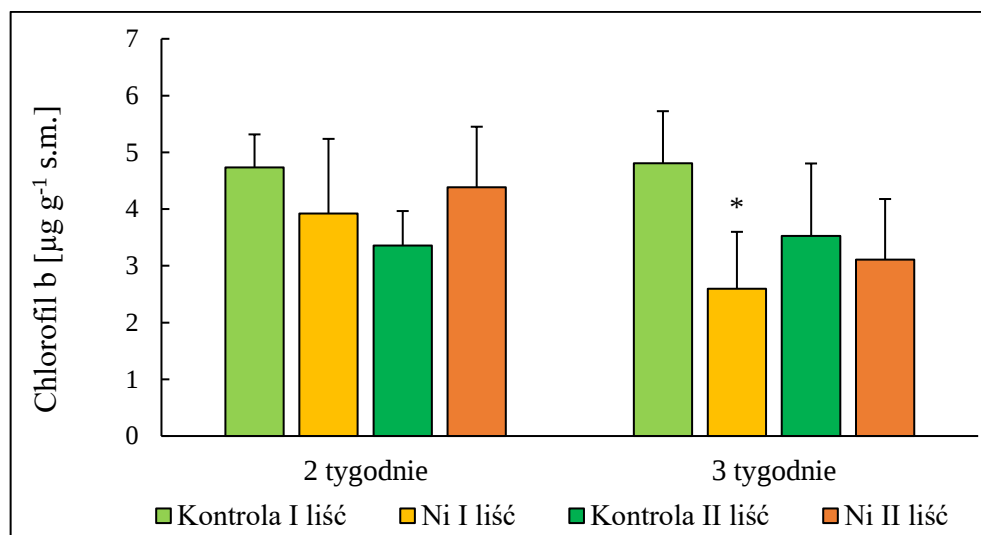
Po 2 tygodniach ekspozycji siewek ogórka na Ni w liściu I stwierdzono spadek zawartości chlorofilu a o 20% w porównaniu z kontrolą (Rys. 25). Po 3 tygodniach od aplikacji Ni odnotowano 40% spadek zawartości tego barwnika w obu liściach.



Rys. 25. Stężenie chlorofilu a w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6-9)

4.3.2. Zawartość chlorofilu b

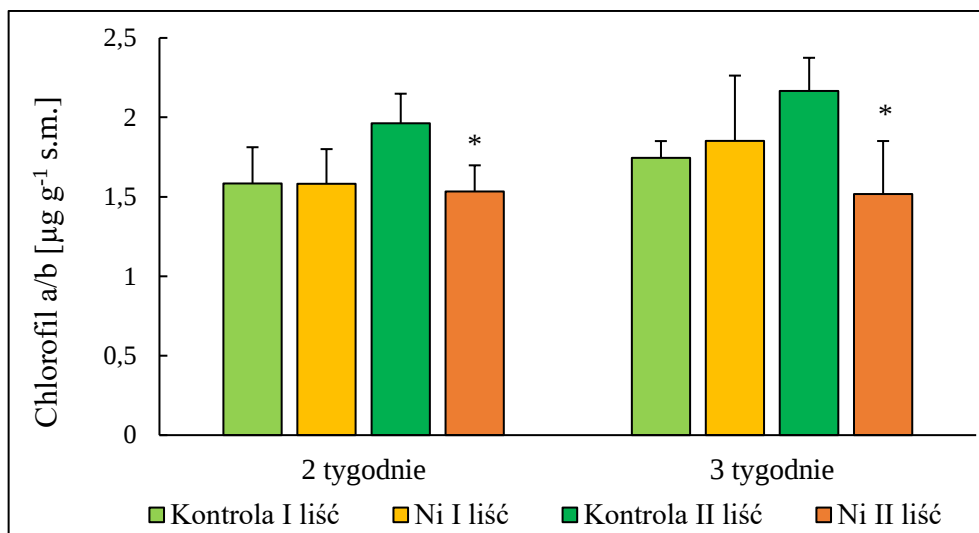
Na Rys. 26 przedstawiono zmiany zawartości chlorofilu b w liściach siewek ogórka traktowanych Ni. Istotny spadek zawartości, o 46% poniżej kontroli, stwierdzono w liściu I po 3 tygodniach traktowania metalem.



Rys. 26. Stężenie chlorofilu b w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6-9)

4.3.3. Stosunek chlorofilu a/b

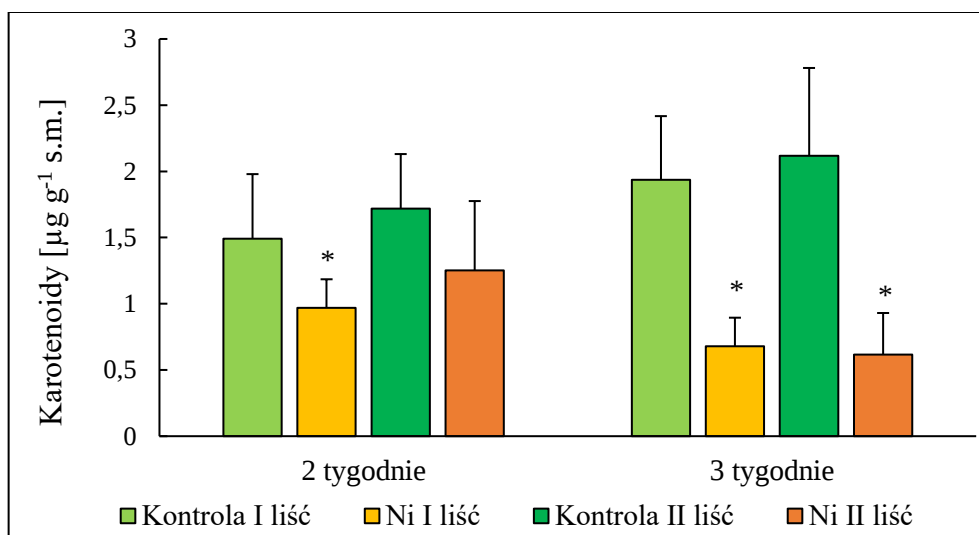
Istotny spadek stosunku chlorofilu a/b odnotowano jedynie w liściu II po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni i wynosił on odpowiednio 22% i 30% (Rys. 27).



Rys. 27. Chlorofil a/b w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6-9)

4.3.4. Zawartość karotenoidów



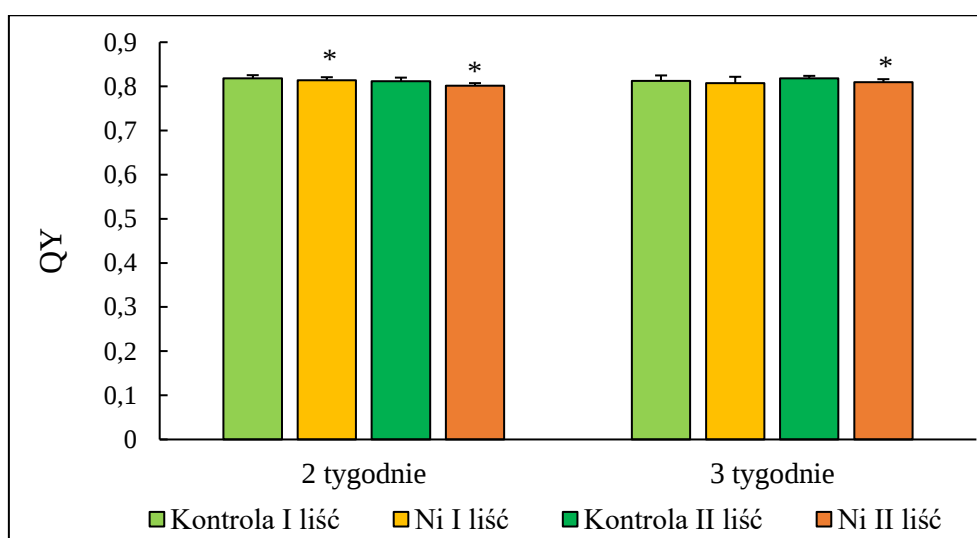
Rys. 28. Stężenie karotenoidów w I oraz II liściu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6-10)

Aplikacja Ni do podłoża spowodowała 35% spadek zawartości karotenoidów w liściu I siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania metalem (Rys. 28). Po dłuższym czasie traktowania Ni odnotowano 65% i 71% spadek zawartości badanych barwników fotosyntetycznych, odpowiednio w liściu I i II siewek ogórka.

4.4. Wydajność kwantowa fotoukładu II

Na Rys. 29 przedstawiono wpływ Ni na wydajność kwantową fotoukładu II w liściach siewek ogórka. Potraktowanie siewek ogórka Ni spowodowało 0,51% oraz 1,2% spadek wartości parametru QY, odpowiednio w liściu I i II po 2 tygodniach traktowania Ni, natomiast w liściu II 3-tygodniowych siewek ogórka odnotowano 1,1% spadek QY.

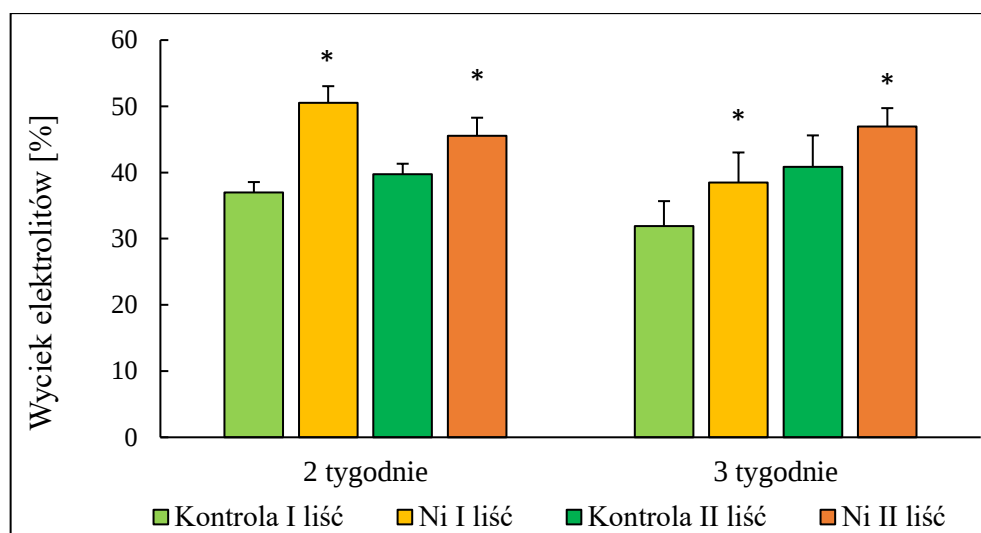


Rys. 29. Wydajność kwantowa fotoukładu II w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6)

4.5. Przepuszczalność błon plazmatycznych liści siewek ogórka

Na Rys. 30 przedstawiono zmiany w przepuszczalności błon plazmatycznych w liściu I i II siewek ogórka. We wszystkich badanych parametrach nastąpił wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych pod wpływem działania Ni. W liściu I zaobserwowano 37 % oraz 21 % wzrost przepuszczalności błon odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni. W liściu I nastąpił 15 % wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych w obu punktach czasowych.



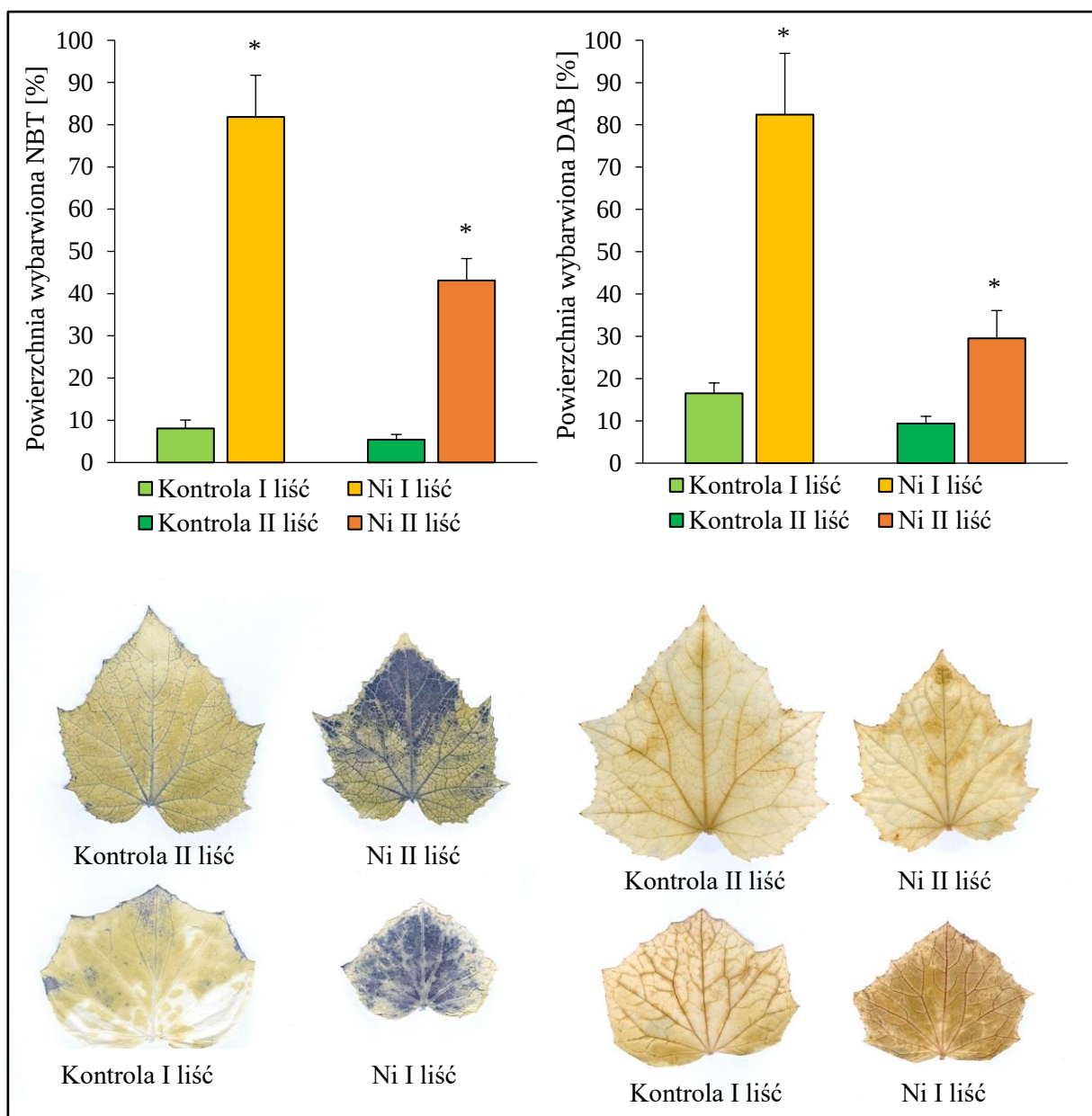
Rys. 30. Przepuszczalność błon plazmatycznych w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 5$)

4.6. Histochemiczna detekcja anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu wodoru w liściach ogórka

Histochemiczną detekcję O_2^- i H_2O_2 w liściach ogórka przeprowadzono odpowiednio przy użyciu barwienia NBT i DAB.

Po 2 tygodniach wzrostu roślin w podłożu zawierającym Ni odnotowano znaczną akumulację O_2^- w I i II liściu (Rys. 31). W liściach siewek kontrolnych niebieski osad formazanu obserwowano głównie w nerwach i na brzegach liści. W liściach siewek poddanych stresowi Ni osady te były widoczne również w obszarach międzyżyłkowych. Na podstawie analizy obrazu zeskanowanych liści stwierdzono, że obszar wybarwiony NBT na I i II liściu siewek traktowanych Ni stanowił odpowiednio około 82% i 43% całkowitej powierzchni liścia, podczas gdy u siewek kontrolnych powierzchnia wybarwiona stanowiła, odpowiednio 8,1% i 5,4%. Obszar wybarwiony metodą DAB wskazujący na akumulację H_2O_2 w I i II liściu siewek kontrolnych stanowił odpowiednio, około 16% i 9% całkowitej powierzchni liścia. W odpowiedzi na potraktowanie Ni powierzchnia brązowych osadów wzrosła odpowiednio do 82% i 29% całkowitej powierzchni liścia. Podsumowując, w liściach roślin traktowanych Ni wykazano kilkakrotnie wyższą niż w roślinach kontrolnych akumulację O_2^- i H_2O_2 . Porównując intensywność zmian w obu badanych liściach stwierdzono, że wywołana działaniem Ni akumulacja O_2^- i H_2O_2 była, odpowiednio, 2-krotnie i 2,8-krotnie wyższa w liściu I niż w liściu II.



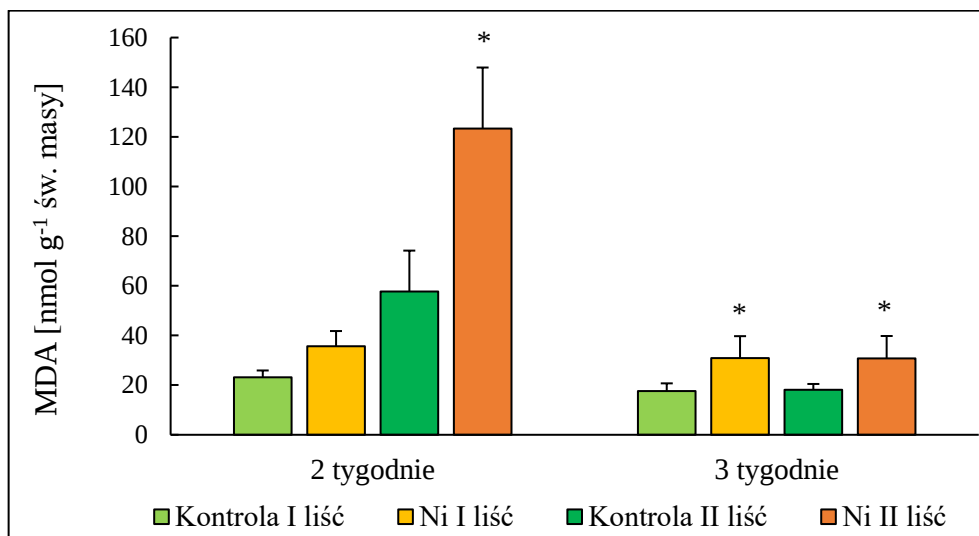
Rys. 31. Zawartość O_2^- oraz H_2O_2 w liściach siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n= 3$)

4.7. Peroksydacja lipidów

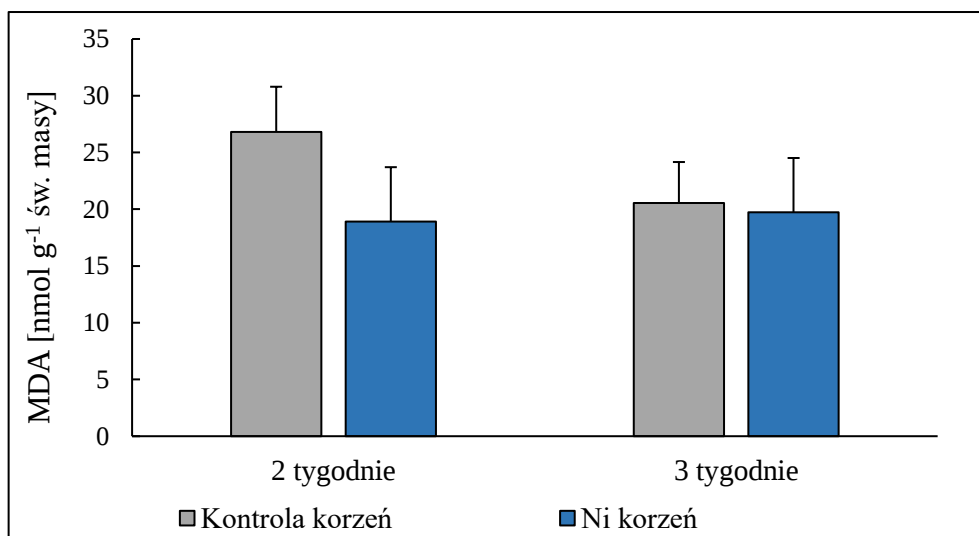
Parametrem powszechnie stosowanym do oceny procesu peroksydacji lipidów jest zawartość MDA, który jest końcowym produktem tego procesu. Dla lepszego poznania procesów peroksydacji lipidów powodowanej toksycznym wpływem Ni po 2 tygodniach traktowania oznaczono także profil fosfolipidów występujących w liściach ogórka oraz profil produktów peroksydacji lipidów. Zastosowanie techniki LC-MS pozwoliła na detekcję i określenie zmian w zawartości wczesnych produktów peroksydacji lipidów.

4.7.1. Zawartość MDA

Na Rys. 32 oraz Rys. 33 przedstawiono zmiany zawartości MDA w liściach i korzeniu siewek ogórka. Po 2 tygodniach traktowania siewek ogórka Ni nastąpił 114% wzrost stężenia MDA w liściu II w porównaniu do kontroli. Wzrost stężenia MDA zaobserwowano również po 3 tygodniach traktowania metalem o 76% i 69%, odpowiednio w liściu I i II. W korzeniu nie zaobserwowano istotnych zmian zawartości MDA.



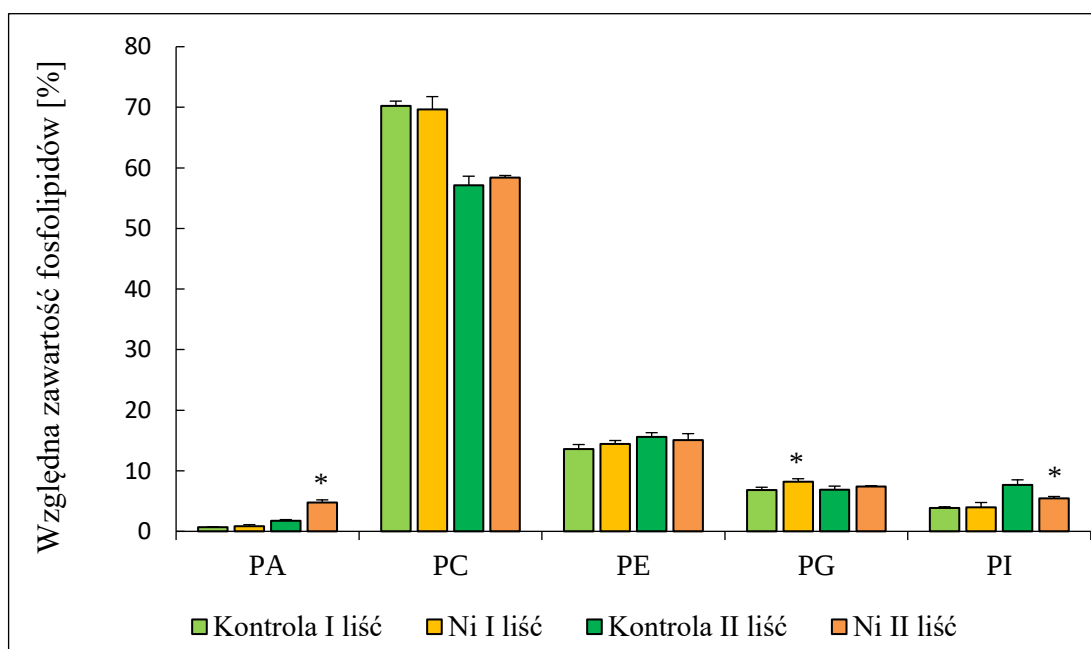
Rys. 32. Zawartość MDA w liściu I oraz liściu II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 4-8$)



Rys. 33. Zawartość MDA w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 6$)

4.7.2. Skład fosfolipidów

Główną klasą fosfolipidów obecną w liściach ogórka była fosfatydylocholina (PC), stanowiąca około 70% i 57% wszystkich wykrytych fosfolipidów odpowiednio w I i II liściu (Rys. 34). Pozostałe klasy fosfolipidów to fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloglicerol (PG), fosfatydyloinozytol (PI) i kwas fosfatydowy (PA) stanowiące, odpowiednio, około 13,5 - 15,5%, 6%, 3,9 - 7,6% i 0,7 - 1,8% (w zależności od liścia) wszystkich fosfolipidów. Potraktowanie siewek ogórka Ni nie miało wpływu na zawartość klasy PC i PE. Istotny wzrost zawartości PG, o 20% w stosunku do poziomu kontrolnego, zaobserwowano w I liściu, natomiast zawartość PI obniżyła się o 30% w II liściu. Najbardziej wyraźną zmianę w odpowiedzi na stres Ni stwierdzono w najmniej licznej klasie fosfolipidów, PA, której zawartość w II liściu wzrosła 2,7-krotnie w porównaniu z kontrolą.

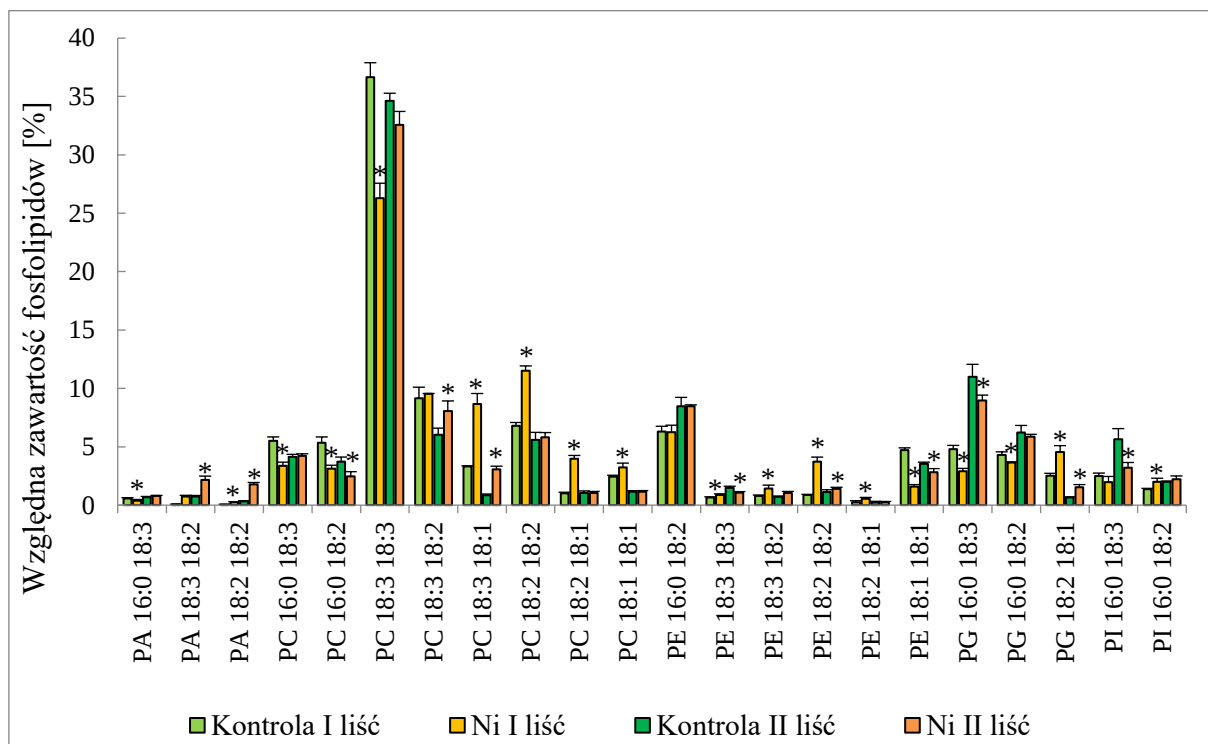


Rys. 34. Względna zawartość klas fosfolipidów w liściach siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 3$)

Szczegółowy skład fosfolipidów liści ogórka przedstawiono na Rys. 35. Dominującym lipidem był PC 18:3;18:3, stanowiący około 35% całkowitej puli fosfolipidów. Traktowanie Ni w różny sposób wpływało na zawartość poszczególnych rodzajów fosfolipidów. Jedynym fosfolipidem, którego zawartość nie zmieniała się w żadnym z badanych liści siewek poddanych działaniu Ni był PE 16:0;18:2. Najbardziej wyraźne wzrosty zawartości w odpowiedzi na potraktowanie Ni stwierdzono dla PA 18:2;18:2, PC 18:3;18:1 i PE 18:2;18:2, podczas gdy PC

16:0;18:2, PE 18:1;18:1 i PG 16:0;18:3 wykazały największe spadki. Wystąpiły również różnice między reakcją pierwszego i drugiego liścia. Na przykład względna zawartość PC 18:3;18:3 zmniejszyła się o około 30% w I liściu, podczas gdy w II liściu nie zmieniła się istotnie. Względna zawartość PE 18:3;18:3 w I liściu wzrosła o 36%, natomiast w II liściu zmniejszyła się o 28%. Warto zauważyć, że liście I i II znacznie różniły się konstytutywną ilością niektórych gatunków fosfolipidów. Najbardziej wyraźne różnice wystąpiły w przypadku PA 18:3;18:2, PA 18:2;18:2, PC 18:3;18:1 i PG 16:0;18:3.



Rys. 35. Skład fosfolipidów w liściu I i II siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3$)

4.7.3. Skład i poziom nienasycenia kwasów tłuszczowych fosfolipidów

Dominującym kwasem tłuszczowym, stanowiącym około 50% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych występujących w fosfolipidach ekstrahowanych z liści ogórka był 18:3. W odpowiedzi na traktowanie Ni zawartość 18:3 w I liściu zmniejszyła się o 18% (Tab. 2). Wywołane działaniem Ni obniżenie zawartości stwierdzono również w przypadku 16:0, jedyne wykrytego nasyconego kwasu tłuszczowego. W zależności od liścia wynosiło ono 14-23% w porównaniu z kontrolą. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych kwasów, zawartość 18:2 wzrosła w I i II liściu roślin traktowanych Ni, odpowiednio o 42% i 16%. Zawartości 18:1 zwiększyła się o 28% w I liściu. Ogólnie, poziom nienasycenia fosfolipidowych kwasów tłuszczowych, określony jako indeks wiązań podwójnych (DBI), był

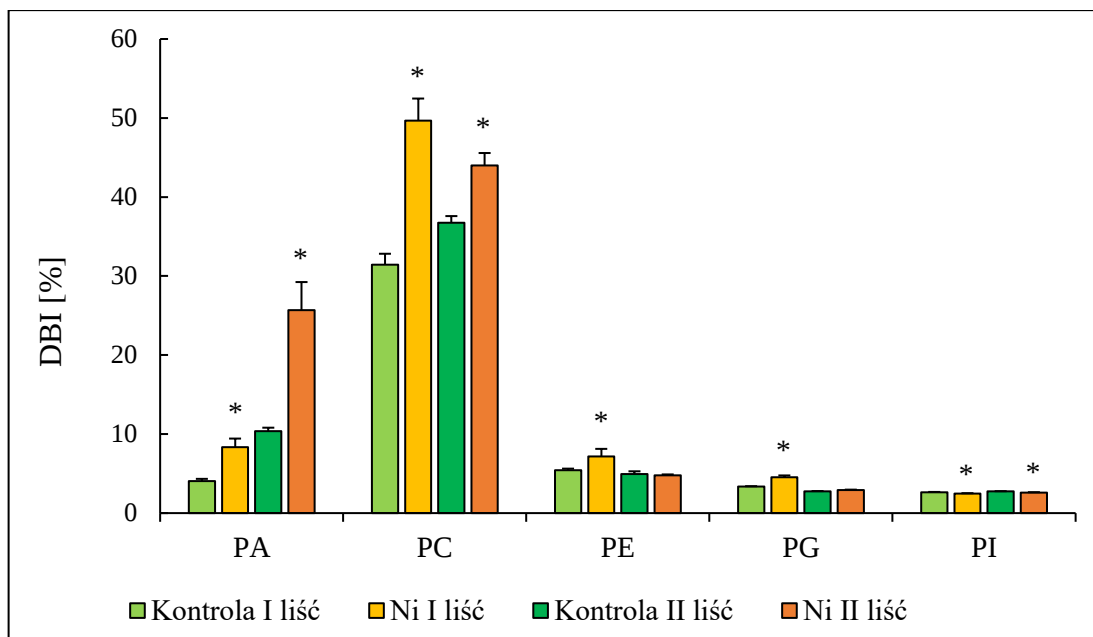
podwyższony w liściach ogórka poddanych stresowi Ni. W porównaniu z kontrolą był on o 27% i 18% wyższy, odpowiednio w I i II liściu.

Tab. 2. Wpływ traktowania Ni na skład fosfolipidowych kwasów tłuszczowych i indeks wiązań podwójnych (DBI) w liściach ogórka

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3$)

	Zawartość kwasów tłuszczowych [%]				DBI
	16:0	18:1	18:2	18:3	
Kontrola I liść	15,36 ± 0,46	10,68 ± 0,12	23,30 ± 0,45	50,66 ± 0,81	13,63 ± 0,52
Ni I liść	11,83 ± 0,35 *	13,68 ± 0,91 *	33,10 ± 1,25 *	41,39 ± 1,07*	17,26 ± 0,53 *
Kontrola II liść	20,94 ± 0,55	6,09 ± 0,22	21,98 ± 0,89	50,99 ± 0,87	9,69 ± 0,29
Ni II liść	18,11 ± 0,39 *	6,91 ± 0,27 *	25,57 ± 1,06 *	49,41 ± 0,87	11,39 ± 0,23 *

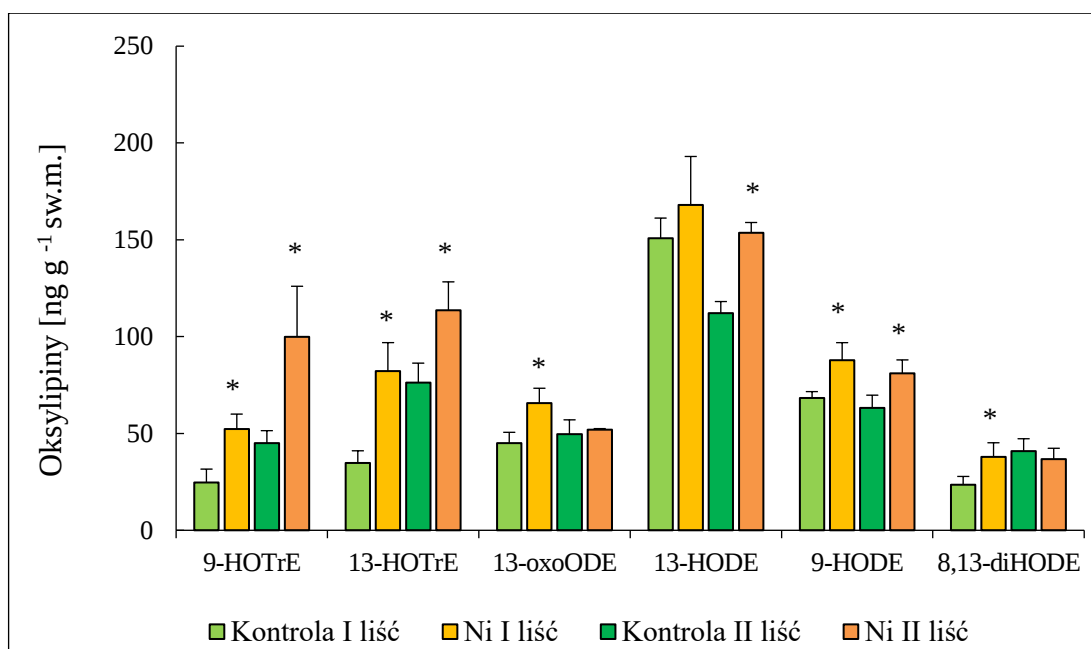
Aby uzyskać lepszy wgląd w wpływ Ni na stopień nienasycenia fosfolipidów, obliczono również indeksy wiązań podwójnych dla określonych klas fosfolipidów. Jak pokazano na Rys. 36, stres Ni w różny sposób wpływał na poziom nienasycenia klas fosfolipidów. Najbardziej wyraźny wzrost nienasycenia stwierdzono w PA, którego DBI było około 2-krotnie i 2,5-krotnie większe niż w kontroli, odpowiednio w I i II liściu. W pierwszych liściach PC, PE i PG również wykazywały zwiększone nienasycenie, na co wskazują ich wartości DBI, które były odpowiednio o 58%, 33% i 32% wyższe w porównaniu z kontrolą. W II liściu traktowanie Ni zwiększyło nienasycenie PC o 19%, ale nie wpłynęło na stopień nienasycenia PE i PG. W przeciwieństwie do innych klas fosfolipidów PI wykazał nieznaczny spadek DBI, o 4% w obu liściach.



Rys. 36. Poziom nienasycenia klas fosfolipidów w liściach ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3$)

4.7.4. Zawartość wczesnych produktów peroksydacji lipidów

Oksylipiny wykryte w ekstraktach z liści ogórka to kwas 9-hydroksyoktadekatrienowy (9- HOTrE), kwas 13-hydroksyoktadekatrienowy (13-HOTrE), kwas 13-okso-oktadekadienowy (13-oksoODE), kwas 13-hydroksyoktadekadienowy (13-HODE), kwas 9- hydroksyoktadekadienowy (9-HODE) i kwas 8,13-dihydroksyoktadekadienowy (8,13-diHODE) (Rys. 37). Pierwsze dwa rodzaje to pochodne kwasu α -linolenowego (18:3), a pozostałe pochodzą z kwasu linolowego (18:2). W największej ilości występował 13-HODE, który stanowił około 43% i 30% wszystkich wykrytych wczesnych produktów peroksydacji lipidów, odpowiednio w I i II liściu roślin kontrolnych. Traktowanie Ni istotnie wpłynęło na całkowitą zawartość oksylipin w obu liściach, prowadząc do jej około 40% wzrostu. Najbardziej wyraźne zmiany stwierdzono w zawartości 9-HOTrE i 13-HOTrE. Zawartość 9-HOTrE ponad 2-krotnie wzrosła w obu liściach, podczas gdy zawartość 13-HOTrE wzrosła o 136% i 47%, odpowiednio w I i II liściu. W obu liściach nastąpił prawie 30% wzrost zawartości 9-HODE. Wywołany działaniem Ni wzrost 13-oksoODE i 8,13-diHODE odpowiednio o 45% i 61% zaobserwowano tylko w I liściu. Przeciwnie, zawartość 13-HODE była podwyższona o 36% tylko w II liściu.



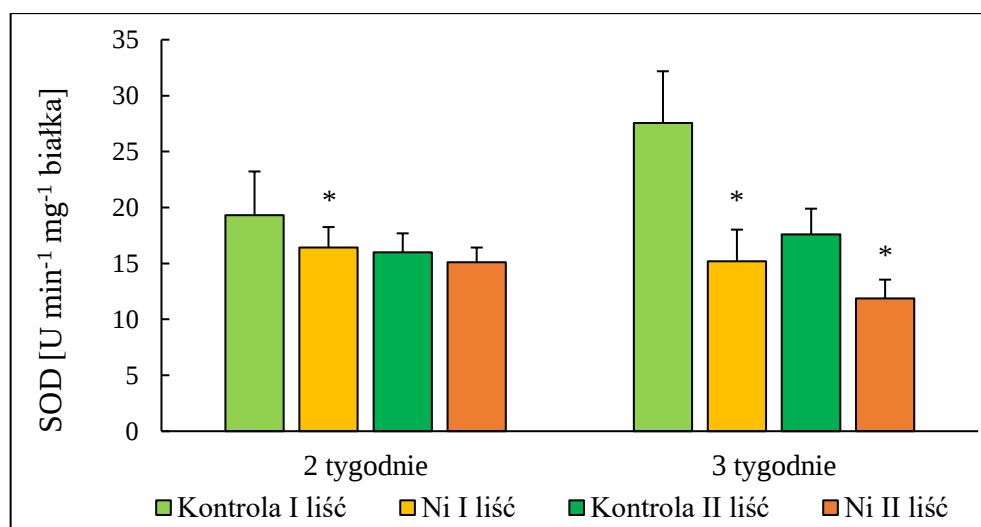
Rys. 37. Zawartość wczesnych produktów peroksydacji lipidów w liściu I i II siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3$)

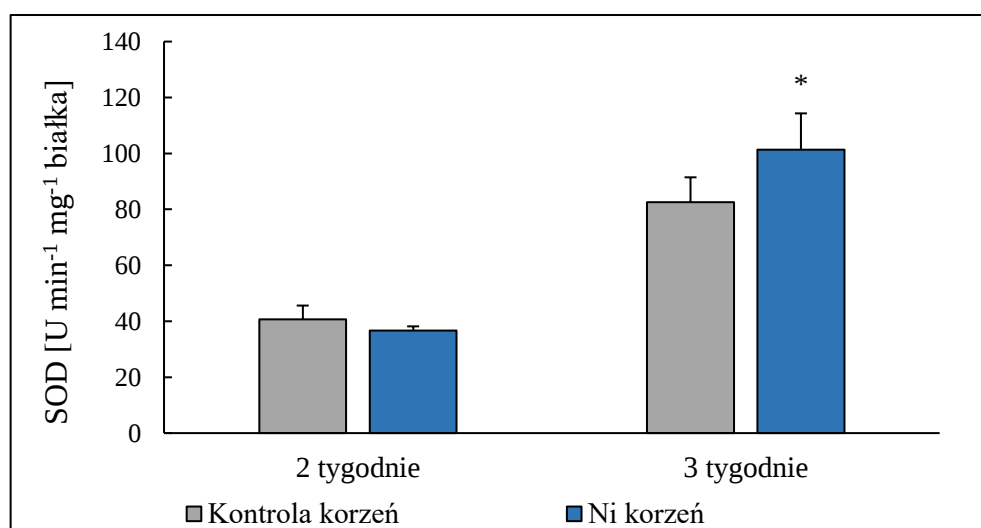
4.8. Aktywność enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym

4.8.1. Aktywność dysmutazy ponadtlencowej

Na Rys. 38 oraz Rys. 39 przedstawiono zmiany aktywności SOD w siewkach ogórka. Potraktowanie siewek ogórka Ni spowodowało istotne zmiany aktywności SOD. Po 2 tygodniach traktowania nastąpił spadek aktywności SOD w liściu I o 15%. Po 3 tygodniach od aplikacji Ni obserwowano spadek aktywności badanego enzymu o 45% i 33%, odpowiednio w liściu I oraz II. Istotne zmiany aktywności SOD w korzeniu wystąpiły jedynie po 3 tygodniach traktowania. W przeciwieństwie do liści w korzeniu obserwowano wzrost aktywności SOD i wynosił on 23%.



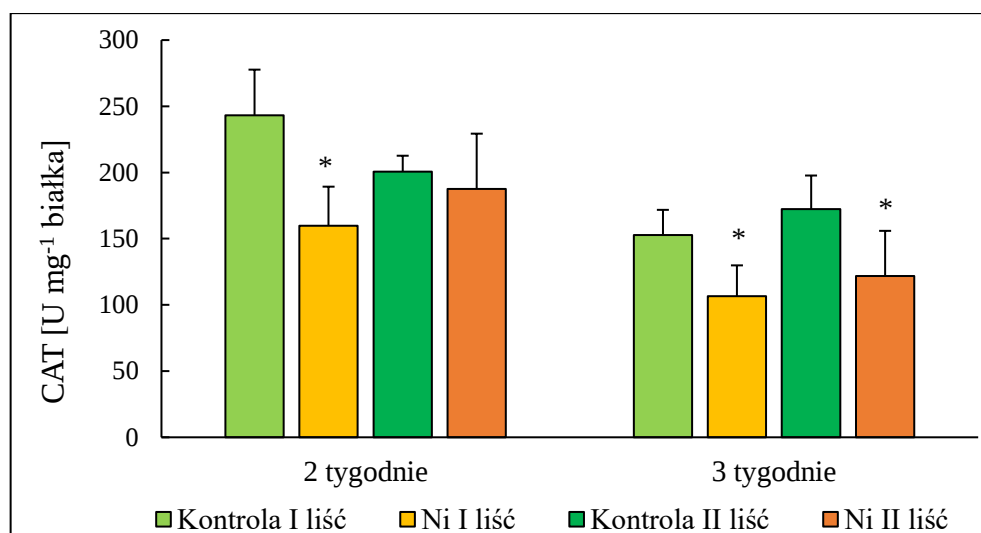
Rys. 38. Aktywność SOD w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)



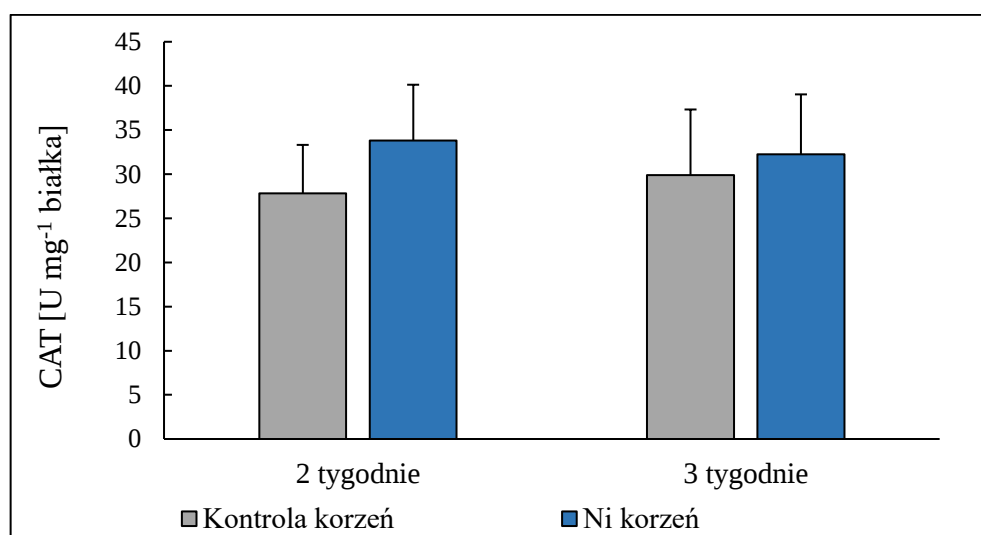
Rys. 39. Aktywność SOD w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=6$)

4.8.2. Aktywność katalazy

Na Rys. 40 oraz Rys. 41 przedstawiono aktywność CAT w badanych organach siewek ogórka. W wyniku aplikacji Ni do pożywki nastąpił istotny spadek aktywności Ni w liściach siewek ogórka. W liściu I obserwowano spadek aktywności CAT o 34% i 30%, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni w porównaniu do siewek kontrolnych. W liściu II 3 tygodniowych siewek ogórka nastąpiło 29% zmniejszenie aktywności badanego enzymu. Nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności CAT w korzeniu siewek ogórka.



Rys. 40. Aktywność CAT w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)

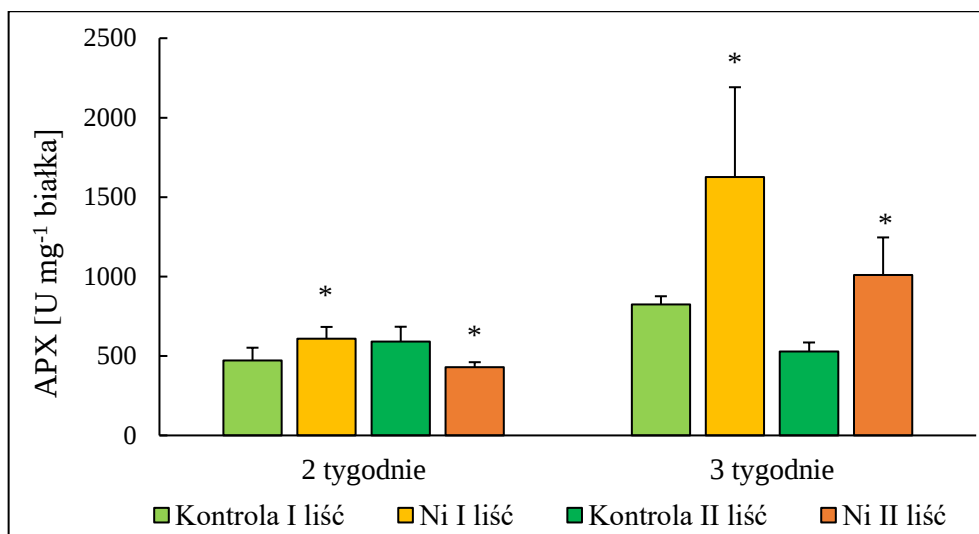


Rys. 41. Aktywność CAT w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6)

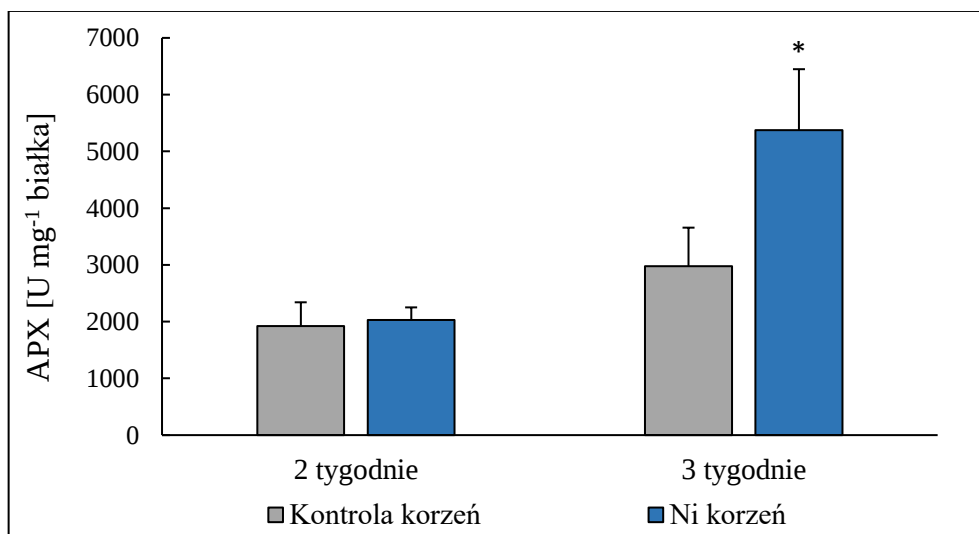
4.8.3. Aktywność peroksydazy askorbinianowej

Na Rys. 42 oraz Rys. 43 przedstawiono zmiany aktywności APX w badanych organach siewek ogórka. Dwutygodniowe traktowanie siewek ogórka Ni spowodowało 29% wzrost aktywności APX w liściu I oraz 27% spadek aktywności w liściu II w porównaniu do siewek nietraktowanych. Po 3 tygodniach traktowania obserwowano 97% i 91% wzrost aktywności APX, odpowiednio w liściu I i II. Istotne zmiany aktywności APX w korzeniu siewek ogórka

obserwowano jedynie po 3 tygodniach traktowania Ni, był to 80% wzrost aktywności tego enzymu.



Rys. 42. Aktywność APX w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)

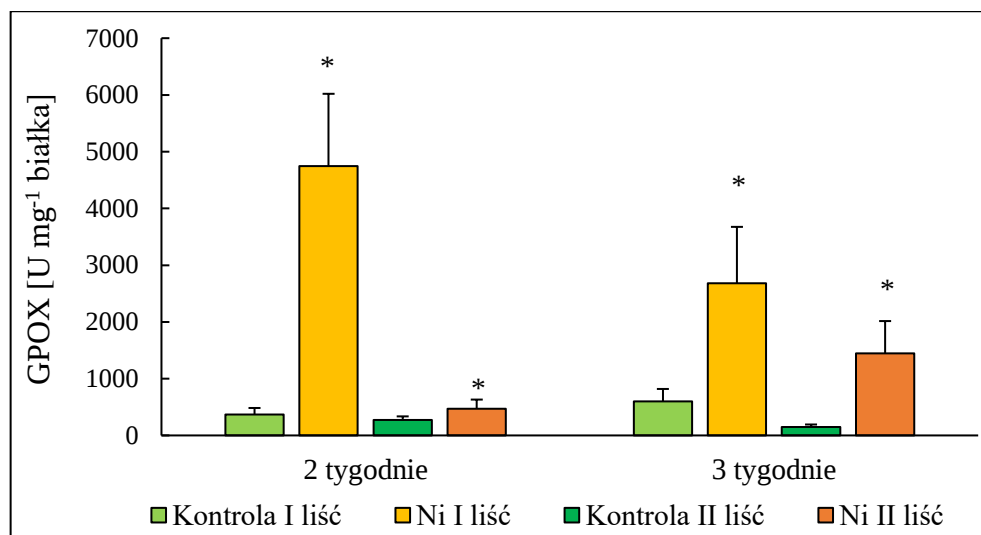


Rys. 43. Aktywność APX w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 6)

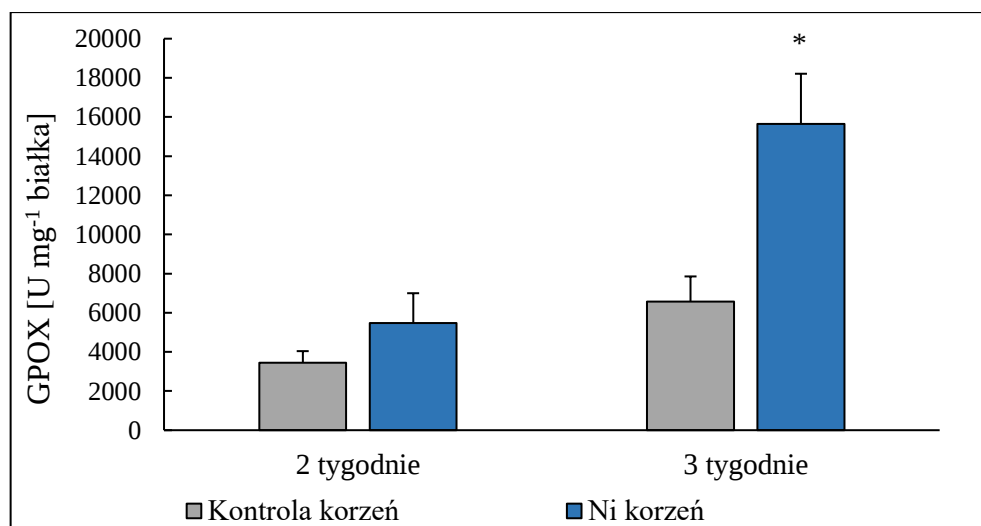
4.8.4. Aktywność peroksydazy oznaczanej wobec guajakolu

Na Rys. 44 oraz Rys. 45 przedstawiono zmiany aktywności GPOX. We wszystkich badanych organach zaobserwowano wzrost aktywności GPOX. Największy wzrost badanego enzymu (13-krotny) w stosunku do kontroli wystąpił po 2 tygodniach traktowania w liściu I siewek

ogórka. Natomiast w liściu II aktywność wzrosła ponad 1,7-krotnie. Po 3 tygodniach traktowania metalem aktywność peroksydazy wzrosła 4,5-krotnie oraz 9,6-krotnie, odpowiednio w liściu I i II. Istotny wzrost aktywności w korzeniu siewek ogórka odnotowano jedynie po 3 tygodniach traktowania. Było to około 2,5-krotne zwiększenie aktywności badanego enzymu.



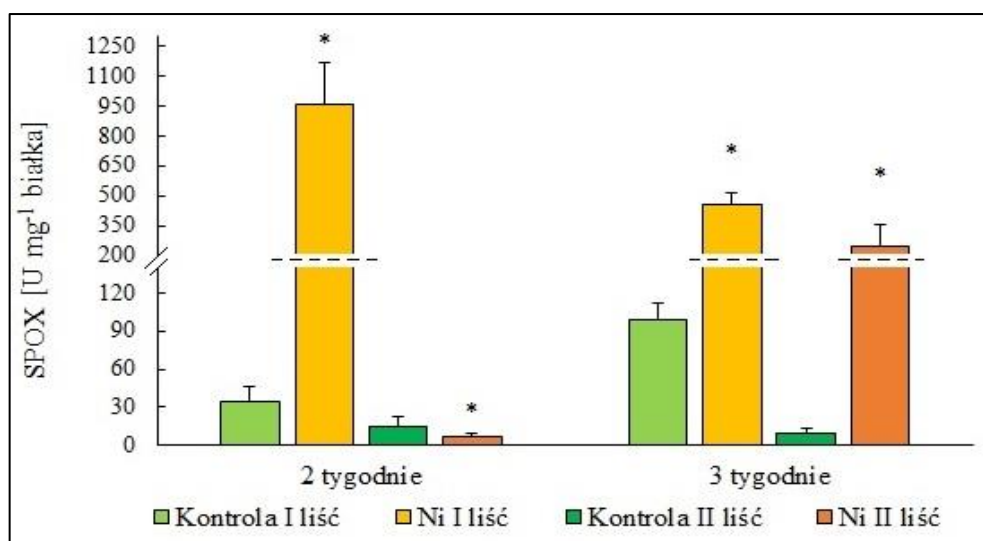
Rys. 44. Aktywność GPOX w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 4-6$)



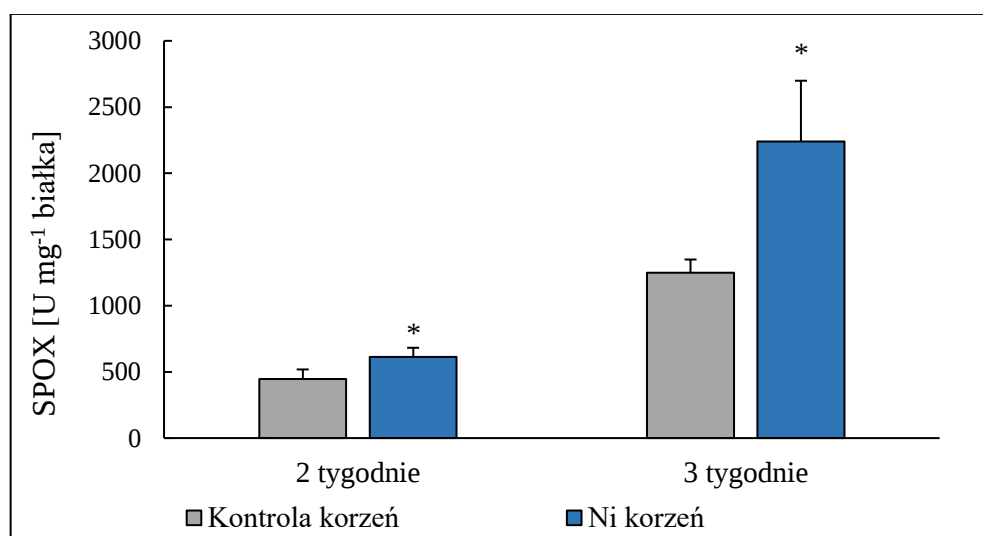
Rys. 45. Aktywność GPOX w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 4-6$)

4.8.5. Aktywność peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazyny

Na Rys. 46 oraz Rys. 47 przedstawiono zmiany aktywności SPOX w liściu I, II oraz korzeniu siewek ogórka. Potraktowanie siewek ogórka Ni spowodowało 28-krotny wzrost aktywności SPX w liściu I po 2 tygodniach traktowania, a także około 5-krotny i 27-krotny wzrost odpowiednio w liściu I i II po 3 tygodniach traktowania. Natomiast w 2-tygodniowym liściu II odnotowano 57% spadek aktywności badanego enzymu. W korzeniu siewek ogórka aplikacja Ni spowodowała 37% i 80% wzrost aktywności SPOX, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania.



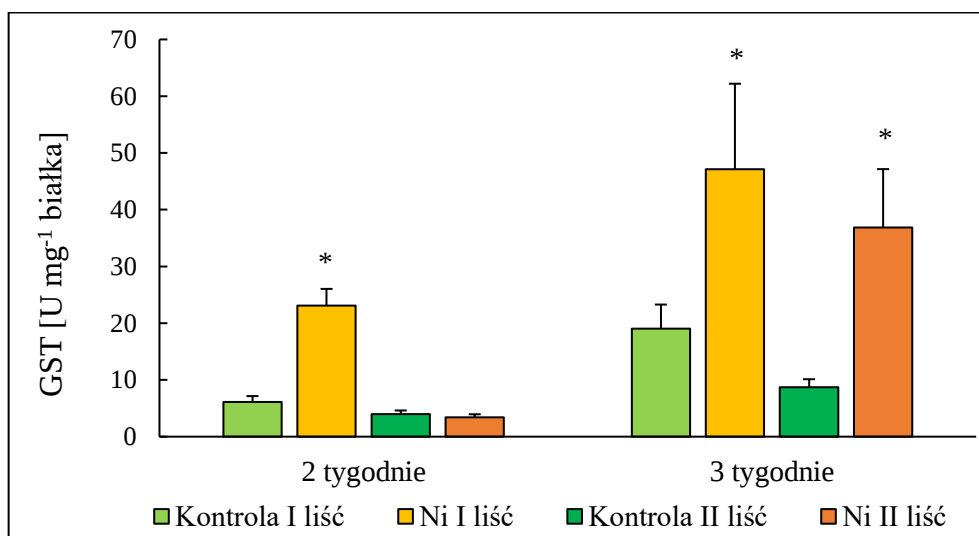
Rys. 46. Aktywność SPOX w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)



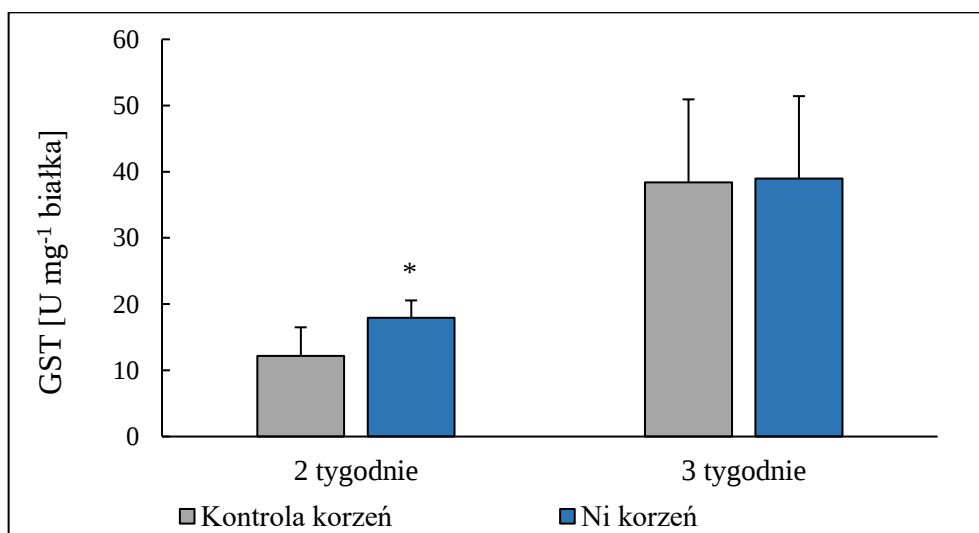
Rys. 47. Aktywność SPOX w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)

4.8.6. Aktywność S-transferazy glutationowej

Na Rys. 48 oraz Rys. 49 przedstawiono zmiany aktywności GST w badanych organach siewek ogórka. W liściu I aktywność GST wzrosła około 4-krotnie oraz 2,5-krotnie, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania metalem. W liściu II nastąpiło ponad 4-krotne zwiększenie aktywności tego enzymu po 21 dniach traktowania. Natomiast w korzeniu istotny wzrost aktywności GST obserwowano jedynie w liściu I w odniesieniu do kontroli. Zmiana ta wynosiła 47%.



Rys. 48. Aktywność GST w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)

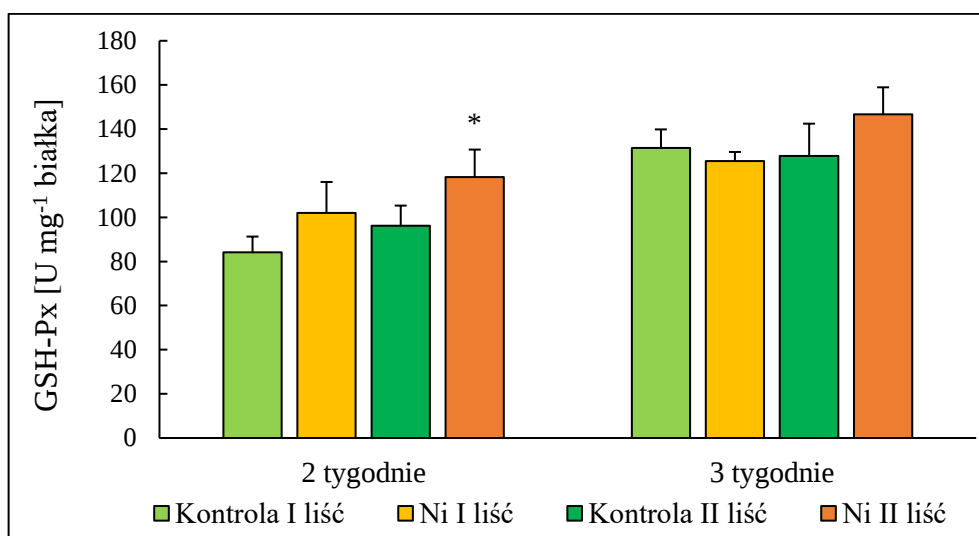


Rys. 49. Aktywność GST w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

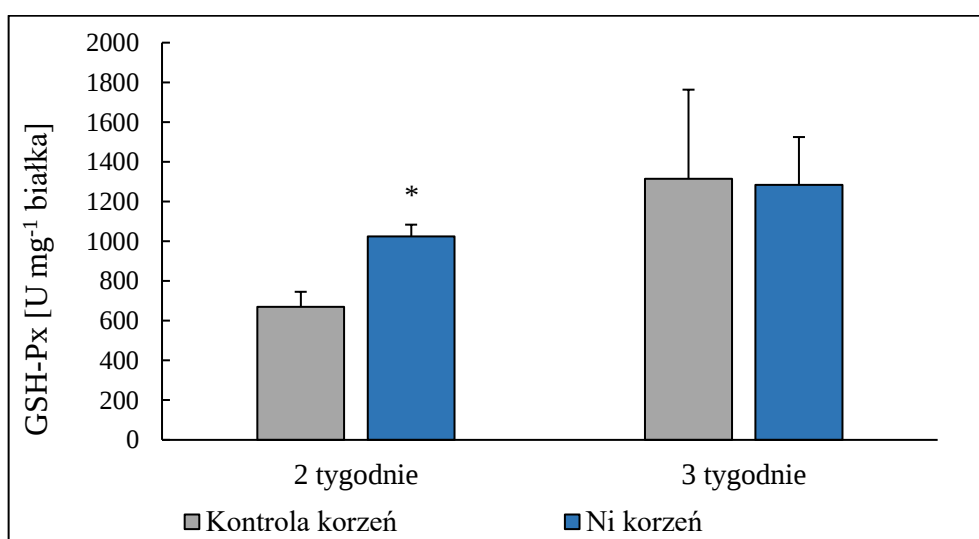
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=6$)

4.8.7. Aktywność peroksydazy glutationowej

Na Rys. 50 oraz Rys. 51 przedstawiono zmiany aktywności peroksydazy glutationowej w siewkach ogórka. Istotne zmiany aktywności GSH-Px badanych organów nadziemnych obserwowano jedynie w liściu II po 2 tygodniach traktowania. Aplikacja Ni do podłoża spowodowała 23% wzrost aktywności GSH-Px w liściu II. W korzeniu natomiast stwierdzono 53% wzrost aktywności badanego enzymu w 2-tygodniowych siewkach ogórka traktowanych Ni.



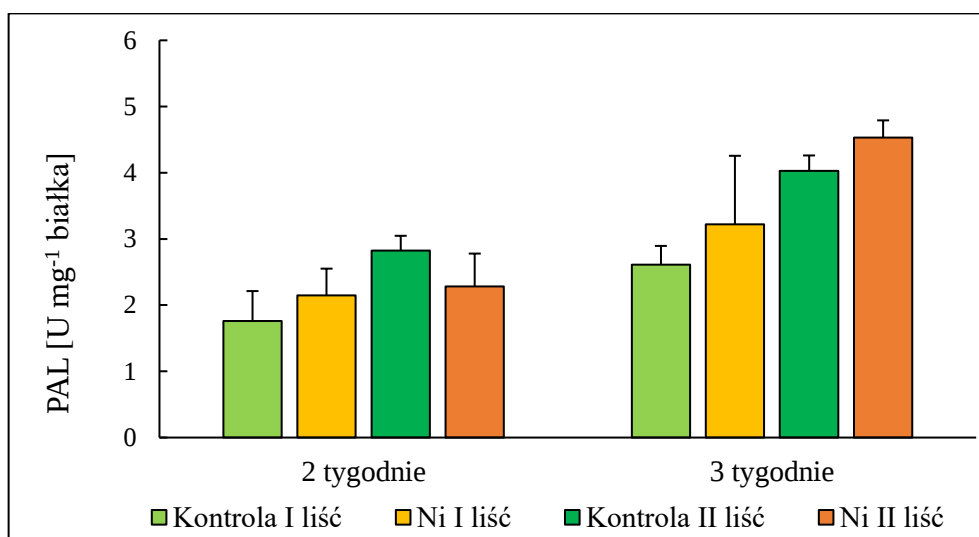
Rys. 50. Aktywność GSH-Px w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 3$)



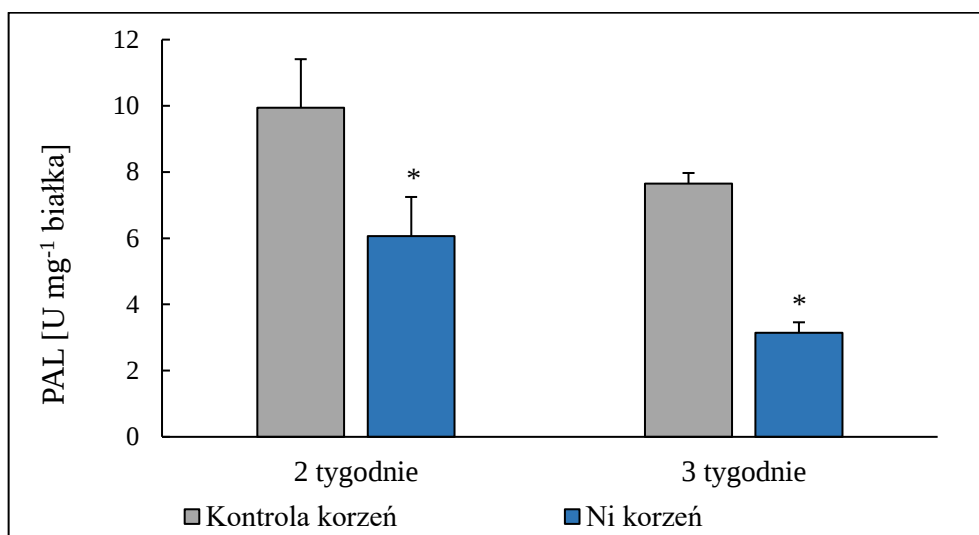
Rys. 51. Aktywność GSH-Px w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 5$)

4.8.8. Aktywność amoniakolizacji L-fenyloalaniny

Na Rys. 52 oraz Rys. 53 przedstawiono zmiany aktywności amoniakolizacji L-fenyloalaniny w siewkach ogórka. Istotne zmiany aktywności tego enzymu stwierdzono w korzeniu siewek ogórka. Aplikacja Ni do podłoża spowodowała 39% i 59% spadek aktywności PAL, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania.



Rys. 52. Aktywność PAL w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3$)

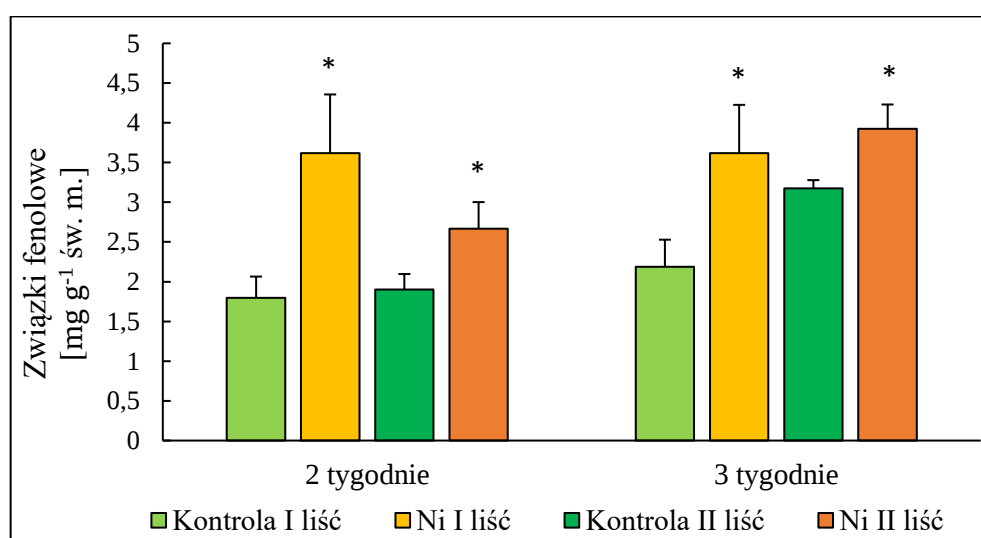


Rys.53. Aktywność PAL w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4$)

4.9. Analiza zawartości i profilu związków fenolowych

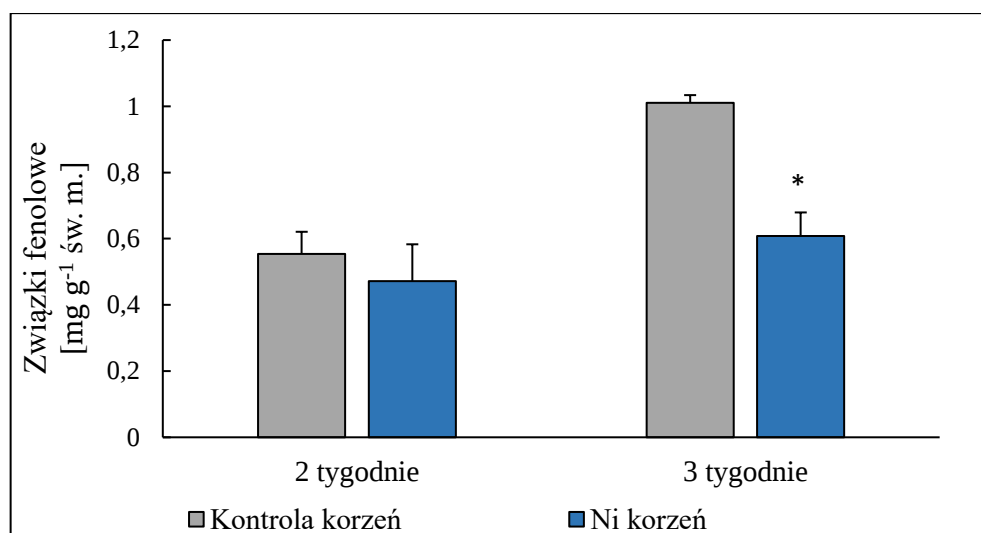
4.9.1. Zmiany zawartości fenoli całkowitych

Na Rys. 54 oraz Rys. 55 przedstawiono zmiany zawartości związków fenolowych w liściach i korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni. Po 2 tygodniach traktowania Ni odnotowano 2- krotny oraz 40 % wzrost zawartości fenoli całkowitych, odpowiednio w liściu I i II. Po 3 tygodniach traktowania metalem nastąpił wzrost badanego parametru w liściu I i II, odpowiednio o 65 % oraz 24 %. W korzeniu natomiast nastąpił spadek ilości związków fenolowych po 3 tygodniach traktowania Ni i wynosił on 40 %.



Rys. 54. Zawartość związków fenolowych w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3-4$)



Rys. 55. Zawartość związków fenolowych w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3-4$)

4.9.2. Profil związków fenolowych uzyskany metodą HPLC

W Tab. 3 oraz Tab. 4 przedstawiono zawartość analizowanych związków fenolowych w liściu I oraz korzeniu 2-tygodniowych siewek ogórka kontrolnych i traktowanych Ni. Aby uwzględnić całkowitą zawartość badanych związków, także tych występujących w formie zglikozyłowanej przeprowadzono ich hydrolizę.

W liściu siewek ogórka zidentyfikowano mniej związków fenolowych niż w korzeniu. Spośród 37 analizowanych metabolitów w liściu I wykryto obecność 21 i 23 związków fenolowych występujących w formie wolnej odpowiednio w liściu kontrolnym i traktowanym. W korzeniu natomiast zidentyfikowano 32 związki, zarówno w siewkach kontrolnych jak i traktowanych Ni. W odpowiedzi na aplikację Ni w liściu I pojawiły się 2 nowe nieobecne w kontroli związki tj.: kwas galusowy oraz kwas *trans*-3-hydroksycynamonowy, natomiast w korzeniu jeden związek – hesperetyna.

W siewkach kontrolnych największy udział w puli wolnych kwasów fenolowych ma kwas elagowy i p-kumarowy w liściu I, natomiast kwas synapinowy oraz kwas galusowy w korzeniu. Najmniejszy udział ma aldehyd 4-hydroksybenzoesowy i kwas *trans*-cynamonowy w liściu I siewek kontrolnych, a także kwas β -rezorcynowy i kwas chlorogenowy w korzeniu.

Spośród oznaczanych wolnych związków fenolowych w liściu I siewek traktowanych Ni odnotowano największy 2,7- krotny wzrost zawartości flawonu, a także 2,2- krotny wzrost zawartości procyanidyny B2. Odnotowano również 73% wzrost stężenia (-)-epikatechiny, 59% wzrost zawartości aldehydu syringowego oraz 32% kwasu *p*-kumarowego. Przeciwnie odnotowano także spadek wolnych związków fenolowych takich jak naryngenina (81%), cyjanidyna (57%), rutyna (44%), (+)-katechina (44%) oraz kumaryna (36%).

Biorąc pod uwagę całkowitą zawartość związków fenolowych w liściu I stwierdzono 5,2- krotny wzrost zawartości (-)-epikatechiny oraz 2,6-krotny wzrost flawonu, a także wzrost zawartości aldehydu syringowego (52%), kwasu *p*-kumarowego (48%) oraz hesperetyny (22%). Odnotowano także spadek zawartości naryngeniny (80%), cyjanidyny (58%), kwasu 4- hydroksybenzoesowego (57%), (+)-katechiny (36%), kwasu elagowego (34%), kwasu chlorogenowego (16%) oraz aldehydu 4-hydroksybenzoesowego (12%).

Spośród oznaczanych wolnych związków fenolowych w korzeniu siewek traktowanych Ni odnotowano największy, 10-krotny wzrost stężenia kwasu ferulowego oraz około 8-krotny wzrost kwasu *p*-kumarowego. Zaobserwowano również wzrost zawartości kwasu syringowego (4,4- krotny), kwasu chlorogenowego (3,7-krotny), rutyny (2,8-krotny), kwasu *trans*- cynamonowego (2,7-krotny), kwasu *o*-kumarowego (2,6-krotny), kwasu protokatechowego (2,5-krotny), cyjanidyny (2,1-krotny), pirokatecholu (2,1-krotny) oraz aldehydu syringowego (2- krotny). W mniejszym stopniu zwiększyła się zawartość kwasu α - rezorcynowego (77%), kwasu 1,3-dikawoilochinowego (55%), aldehydu 4- hydroksybenzoesowego (53%), kumaryny (36%), kwasu elagowego (35%) oraz kwasu synapinowego (29%). Odnotowano także spadek wolnych związków fenolowych w korzeniu siewek ogórka. Stwierdzono największy 89% spadek zawartości kwasu galusowego, a także spadek (-)-epigallokatechiny (70%), kwasu *trans*-3- hydroksycynamonowego (55%), naryngeniny (50%), glikozydu luteoliny (31%) oraz kwasu β - rezorcynowego (30%) w porównaniu do kontroli.

Biorąc pod uwagę całkowitą zawartość związków fenolowych w korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni stwierdzono 5,2-krotny wzrost zawartości kwasu *o*-kumarowego oraz 4,3- krotny wzrost kwasu chlorogenowego. Zaobserwowano również wzrost zawartości kwasu *p*-kumarowego (3,7-krotny), kwasu syringowego (2,9-krotny), kwercetyny (2,7-krotny) oraz kwasu protokatechowego (2,1-krotny). Mniejsze wzrosty zawartości dotyczyły kwasu 4- hydroksybenzoesowego (82%), aldehydu syringowego (82%), kwasu α -rezorcynowego (73%), (-)-epikatechiny (66%), aldehydu 4-hydroksybenzoesowego (47%), kwasu

1,3- dikawoilochinowego (41%), (-)-epigallokatechiny (21%), kwasu ferulowego (19%). Odnotowano również spadek zawartości kwasu galusowego (84%), *p*-benzochinonu (50%), kwasu β -rezorcynowego (44%), kwasu elagowego (41%), luteoliny (41%), naryngeniny (37%), (+)-katechiny (32%), kwasu *trans*-3-hydroksycynamonowego (31%), myrycetyny (24%), oraz pirokatecholu (23%).

Tab. 3. Stężenie związków fenolowych w liściu i siewek ogórka traktowanych Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

Metabolit [$\mu\text{g g}^{-1}$ św.m.]	Wolne		Całkowita zawartość	
	Kontrola	Ni	Kontrola	Ni
Kwas galusowy	0	0,27 $\pm$ 0,05 *	0	1,70 $\pm$ 0,34 *
Kwas protokatechowy	0	0	0	0
Kwas α - rezorcynowy	0	0	0	0
Kwas β - rezorcynowy	0	0	0	0
Kwas chlorogenowy	16,64 $\pm$ 2,20	13,88 $\pm$ 1,74	20,07 $\pm$ 2,79	16,84 $\pm$ 2,46 *
Kwas wanilinowy	0	0	0	0
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy	4,64 $\pm$ 0,49	4,67 $\pm$ 0,47	5,68 $\pm$ 1,06	5,20 $\pm$ 0,71
Kwas <i>trans</i> -3-hydroksy- cynamonowy	0	33,75 $\pm$ 8,72*	0	37,08 $\pm$ 11,13*
Kwas 1,3 – dikawoilochinowy	6,68 $\pm$ 1,15	5,42 $\pm$ 0,65	7,66 $\pm$ 0,96	6,39 $\pm$ 0,81
Kwas <i>p</i> – kumarowy	18,62 $\pm$ 2,42	24,60 $\pm$ 2,65 *	27,94 $\pm$ 3,97	41,27 $\pm$ 9,25 *
Kwas <i>o</i> – kumarowy	0	0	0	0
Kwas synapinowy	0	0	0	0
Kwas ferulowy	4,81 $\pm$ 0,41	4,82 $\pm$ 0,67	11,24 $\pm$ 0,87	10,63 $\pm$ 1,31
Kwas elagowy	37,06 $\pm$ 2,97	36,34 $\pm$ 4,80	101,55 $\pm$ 7,97	67,08 $\pm$ 5,70 *
Kwas rozmarynowy	0	0	0	0
Kwas syringowy	0	0	0	0
Kwas 4 – hydroksybenzoesowy	13,91 $\pm$ 1,41	12,52 $\pm$ 1,07	87,53 $\pm$ 8,04	37,66 $\pm$ 3,77 *
Aldehyd 4 – hydroksybenzoesowy	0,92 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,19	1,29 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,04 *
Aldehyd syringowy	4,31 $\pm$ 0,91	6,84 $\pm$ 1,05 *	5,34 $\pm$ 0,18	8,10 $\pm$ 0,15 *

Tab. 3. Stężenie związków fenolowych w liściu I siewek ogórka traktowanych Ni (c.d.)

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

Metabolit [μg g ⁻¹ św.m.]	Wolne		Całkowita zawartość	
	Kontrola	Ni	Kontrola	Ni
Naryngenina	0,89 ± 0,22	0,17 ± 0,04 *	1,01 ± 0,24	0,20 ± 0,04 *
Hesperetyna	2,39 ± 0,48	1,93 ± 0,36	17,63 ± 1,68	21,49 ± 1,28 *
Hesperydyna	11,22 ± 1,46	10,84 ± 1,42	0	0
Myrycetyna	0	0	0	0
Kwercetyna	0	0	15,19 ± 1,99	13,44 ± 1,91
Rutyna	14,65 ± 0,28	8,21 ± 0,80 *	0	0
Flawon	6,99 ± 0,94	19,17 ± 1,71 *	15,99 ± 1,60	42,19 ± 3,19 *
3-hydroksyflawon	56,26 ± 4,58	56,28 ± 4,35	117,06 ± 8,81	118,87 ± 12,03
Luteolina	0	0	33,37 ± 1,63	31,65 ± 3,34
7-glikozyd luteoliny	25,25 ± 2,39	22,01 ± 2,10	0	0
(+)-katechina	59,93 ± 5,76	33,41 ± 2,65 *	162,53 ± 10,39	103,86 ± 5,37 *
(-)-epikatechina	21,39 ± 3,08	36,92 ± 4,66 *	22,16 ± 3,64	115,33 ± 10,40 *
(-)-epigallokatechina	0	0	0	0
Procyjanidyna B2	19,35 ± 3,65	43,05 ± 2,35 *	55,83 ± 5,18	46,16 ± 2,43
Cyjanidyna	22,54 ± 4,66	9,75 ± 1,37 *	26,90 ± 1,11	11,24 ± 1,94 *
p-benzochinon	0	0	0	0
Pirokatechol	0	0	0	0
Kumaryna	0,75 ± 0,14	0,48 ± 0,08 *	0	0

Tab. 4. Stężenie związków fenolowych w korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

Metabolit [μg g ⁻¹ św.m.]	Wolne		Całkowita zawartość	
	Kontrola	Ni	Kontrola	Ni
Kwas galusowy	59,90 ± 3,84	6,36 ± 1,17 *	60,43 ± 2,91	9,83 ± 1,03 *
Kwas protokatechowy	21,92 ± 2,99	54,81 ± 4,99 *	26,24 ± 2,24	56,51 ± 5,35 *
Kwas α - rezorcynowy	4,56 ± 0,47	8,07 ± 0,84 *	5,01 ± 0,50	8,68 ± 0,41 *
Kwas β - rezorcynowy	0,1 ± 0,01	0,07 ± 0,004 *	0,91 ± 0,01	0,51 ± 0,03 *
Kwas chlorogenowy	0,2 ± 0,75	0,75 ± 0,04 *	0,19 ± 0,005	0,82 ± 0,02 *
Kwas wanilinowy	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,12	0,53 ± 0,07	0,50 ± 0,09
Kwas <i>trans</i> - cynamonowy	0,32 ± 0,02	0,88 ± 0,06 *	1,83 ± 0,05	1,88 ± 0,11
Kwas <i>trans</i> - 3-hydroksy- cynamonowy	51,02 ± 2,60	22,73 ± 0,33 *	74,41 ± 4,48	50,92 ± 1,21 *
Kwas 1,3 – dikawoilochinowy	0,71 ± 0,04	1,10 ± 0,08 *	0,68 ± 0,05	0,96 ± 0,11 *
Kwas <i>p</i> – kumarowy	0,27 ± 0,05	2,14 ± 0,17 *	0,75 ± 0,05	2,76 ± 0,05 *
Kwas <i>o</i> – kumarowy	0,50 ± 0,02	1,29 ± 0,11 *	0,56 ± 0,04	2,94 ± 0,30 *
Kwas synapinowy	147,37 ± 2,98	189,9 ± 4,36 *	227,8 ± 6,37	238,02 ± 9,02
Kwas ferulowy	1,15 ± 0,17	11,52 ± 0,54 *	32,65 ± 1,07	38,99 ± 1,05 *
Kwas elagowy	15,67 ± 0,86	21,18 ± 2,11 *	139,82 ± 4,5	82,06 ± 3,36 *
Kwas rozmarynowy	24,91 ± 1,93	24,84 ± 1,13	50,80 ± 3,47	43,36 ± 3,18
Kwas syringowy	0,67 ± 0,007	2,93 ± 0,26 *	0,88 ± 0,02	2,56 ± 0,38 *
Kwas 4 – hydroksybenzoesowy	5,46 ± 1,11	6,70 ± 1,06	26,92 ± 1,86	48,91 ± 3,80 *
Aldehyd 4 – hydroksybenzoesowy	5,61 ± 0,48	8,60 ± 1,24 *	8,77 ± 0,38	12,90 ± 1,36 *
Aldehyd syringowy	0,78 ± 0,07	1,53 ± 0,13 *	0,85 ± 0,08	1,55 ± 0,33 *

Tab. 4. Stężenie związków fenolowych w korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni (c.d.)

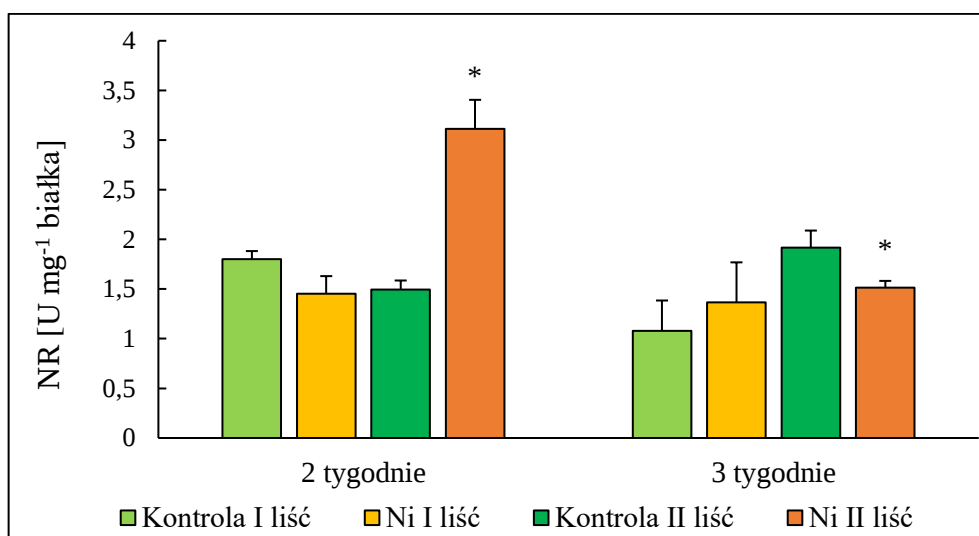
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3)

Metabolit [$\mu\text{g g}^{-1}$ św.m.]	Wolne		Całkowita zawartość	
	Kontrola	Ni	Kontrola	Ni
Naryngenina	$2,86 \pm 0,08$	$1,43 \pm 0,11 *$	$4,98 \pm 0,12$	$3,14 \pm 0,26 *$
Hesperetyna	0	$1,57 \pm 0,32 *$	0	$1,55 \pm 0,30 *$
Hesperydyna	0	0	0	0
Myrycetyna	$21,48 \pm 2,39$	$17,03 \pm 2,32$	$25,81 \pm 2,45$	$19,51 \pm 1,43 *$
Kwercetyna	0	0	$1,94 \pm 0,1$	$5,24 \pm 0,15 *$
Rutyna	$4,12 \pm 0,2$	$11,59 \pm 1,30 *$	0	0
Flawon	0	0	0	0
3-hydroksyflawon	$25,26 \pm 2,25$	$22,95 \pm 2,22$	$58,16 \pm 4,33$	$53,53 \pm 3,50$
Luteolina	$1,59 \pm 0,31$	0	$10,81 \pm 1,004$	$6,38 \pm 0,93 *$
7-glikozyd luteoliny	$14,66 \pm 1,09$	$10,14 \pm 1,45 *$	0	0
(+)-katechina	$40,21 \pm 3,07$	$45,65 \pm 4,18$	$138,24 \pm 3,26$	$94,01 \pm 4,67 *$
(-)-epikatechina	$24,74 \pm 1,59$	$20,06 \pm 2,71$	$45,44 \pm 2,07$	$75,32 \pm 5,68 *$
(-)-epigallokatechina	$53,08 \pm 3,57$	$15,75 \pm 1,60 *$	$53,79 \pm 3,57$	$65,20 \pm 3,38 *$
Procyjanidyna B2	0	0	0	0
Cyjanidyna	$5,75 \pm 0,38$	$12,36 \pm 1,89 *$	$31,27 \pm 1,76$	$33,32 \pm 1,75$
p-benzochinon	$4,80 \pm 0,24$	$4,91 \pm 0,68$	$27,79 \pm 4,12$	$13,95 \pm 1,08 *$
Pirokatechol	$4,39 \pm 0,55$	$9,25 \pm 0,72 *$	$25,35 \pm 2,55$	$19,54 \pm 2,38 *$
Kumaryna	$1,35 \pm 0,12$	$1,84 \pm 0,13 *$	0	0

4.10. Aktywność enzymów związanych z metabolizmem azotu

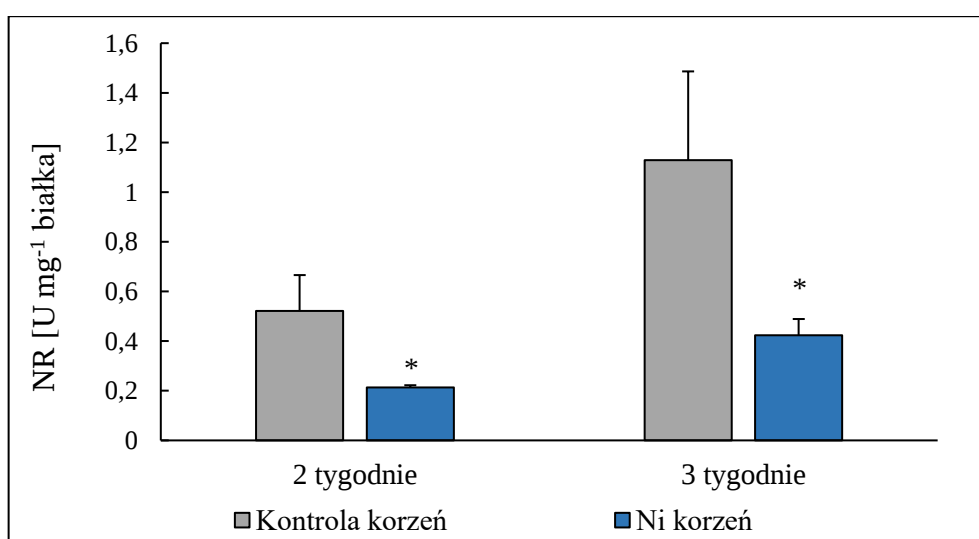
4.10.1. Aktywność reduktazy azotanowej

Na Rys. 56 oraz Rys. 57 przedstawiono zmiany aktywności reduktazy azotanowej w siewkach ogórka. W wyniku aplikacji Ni do podłoża w liściu II po 2 tygodniach stwierdzono ponad 2-krotny wzrost a po 3 tygodniach 21% spadek aktywności NR. W korzeniu siewek traktowanych Ni aktywność tego enzymu po 2 i 3 tygodniach była, odpowiednio, o 59% i 63% niższa niż w kontroli.



Rys. 56. Aktywność NR w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)

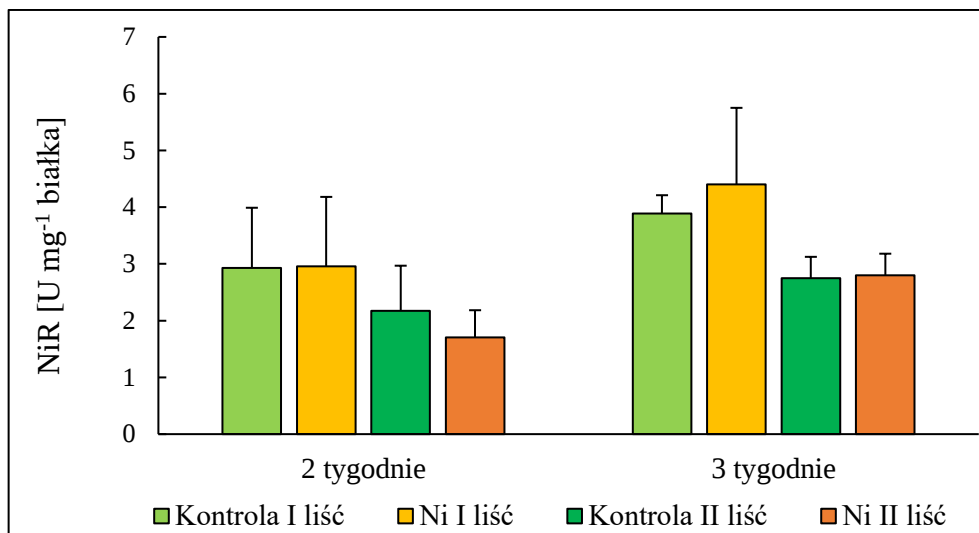


Rys. 57. Aktywność NR w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3-5$)

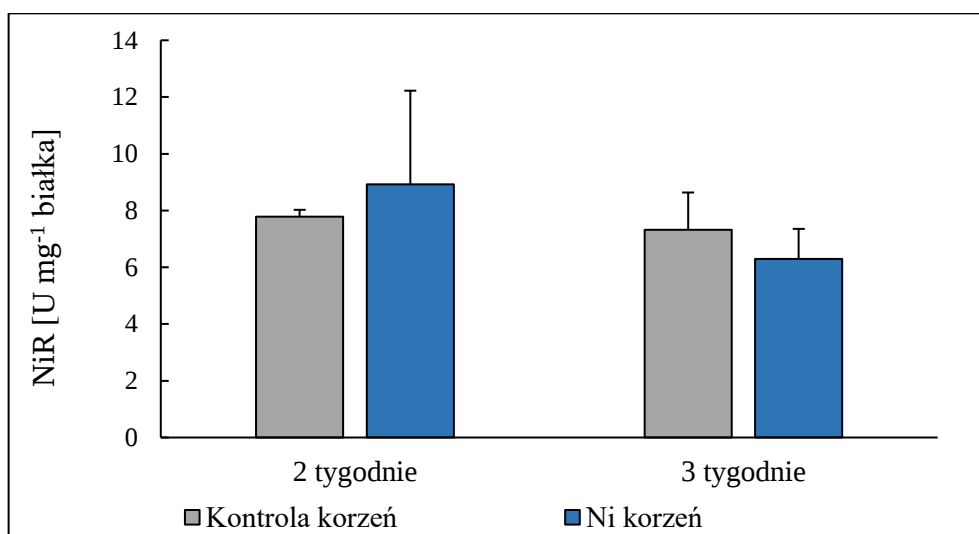
4.10.2. Aktywność reduktazy azotynowej

Obecność Ni w pożywce nie wpłynęła istotnie na aktywność NiR zarówno w liściach jak i korzeniach siewek ogórka (Rys. 58 i Rys. 59)



Rys. 58. Aktywność NiR w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)

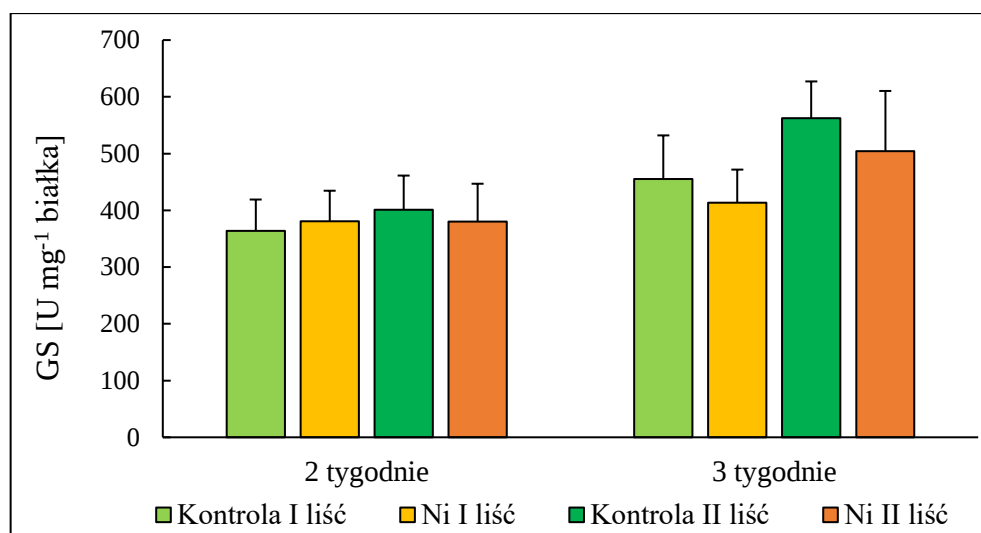


Rys. 59. Aktywność NiR w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

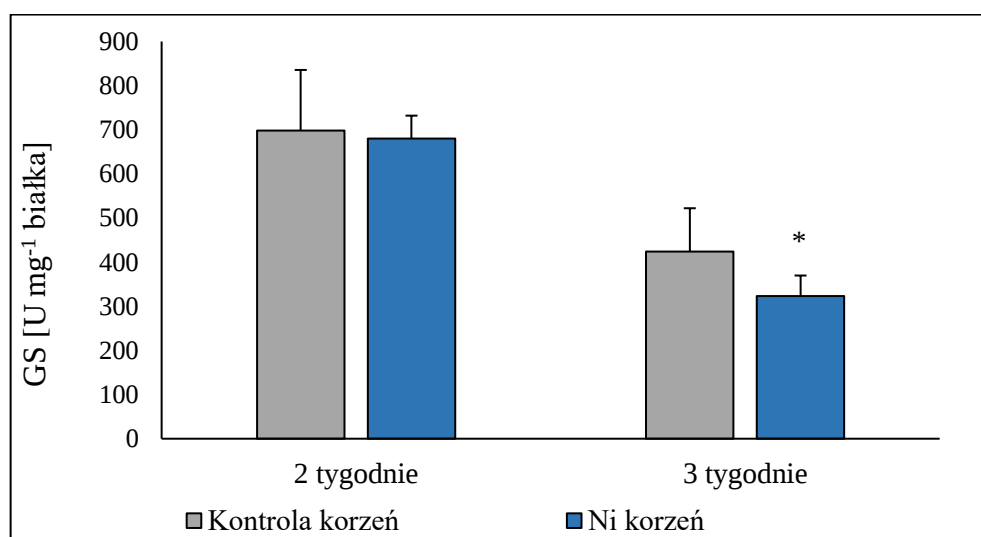
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-5)

4.10.3. Aktywność syntetazy glutaminowej

W liściu I i II siewek ogórka traktowanych Ni nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności GS (Rys. 60). W korzeniu po 3 tygodniach ekspozycji roślin na działanie metalu odnotowano 24 % spadek aktywności tego enzymu (Rys. 61).



Rys. 60. Aktywność GS w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n= 6$)

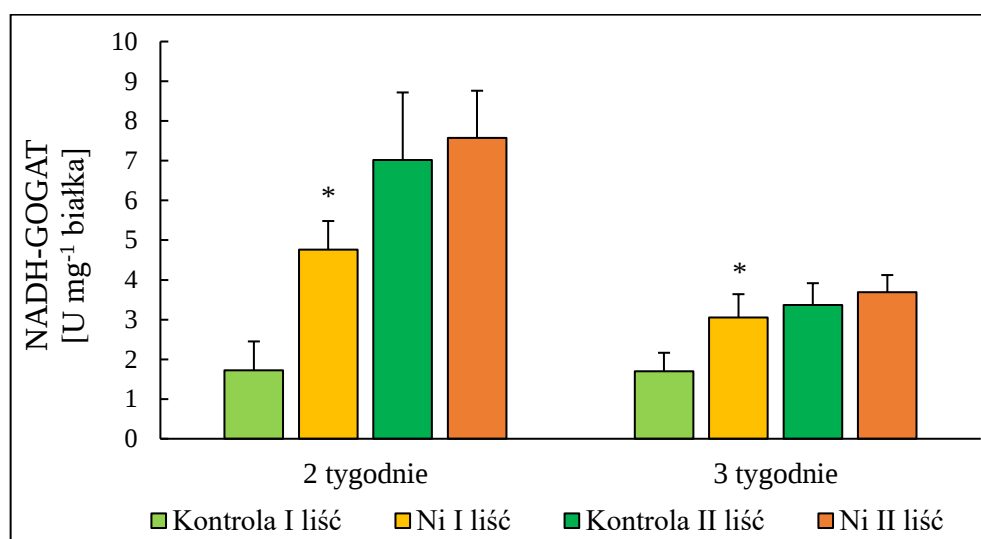


Rys. 61. Aktywność GS w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n= 4-6$)

4.10.4. Aktywność syntazy glutaminianowej

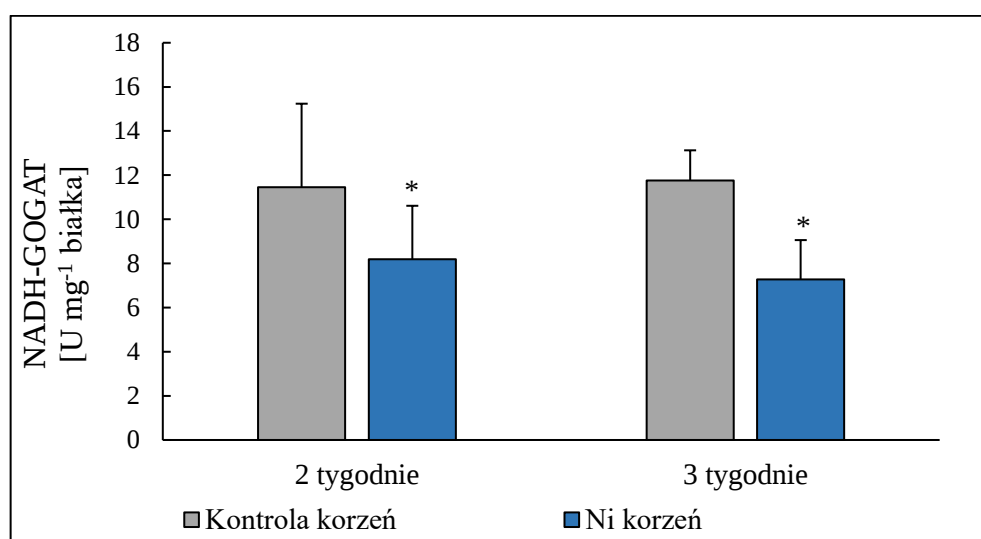
Na Rys. 62 oraz Rys. 63 przedstawiono zmiany aktywności syntazy glutaminianowej zależnej od NADH w badanych organach siewek ogórka. W wyniku aplikacji Ni do podłoża nastąpił 2,8-krotny oraz 1,8-krotny wzrost aktywności NADH-GOGAT w liściu I, odpowiednio, po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni. Nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności tego enzymu w liściu II. W korzeniu natomiast nastąpił spadek aktywności NADH-GOGAT pod wpływem Ni i wynosił on 28 % i 38 %, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania metalem.

W porównaniu z liśćmi, zwłaszcza liściem I, korzenie charakteryzowały się znacznie wyższym konstytutywnym poziomem aktywności NADH-GOGAT.



Rys. 62. Aktywność NADH-GOGAT w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

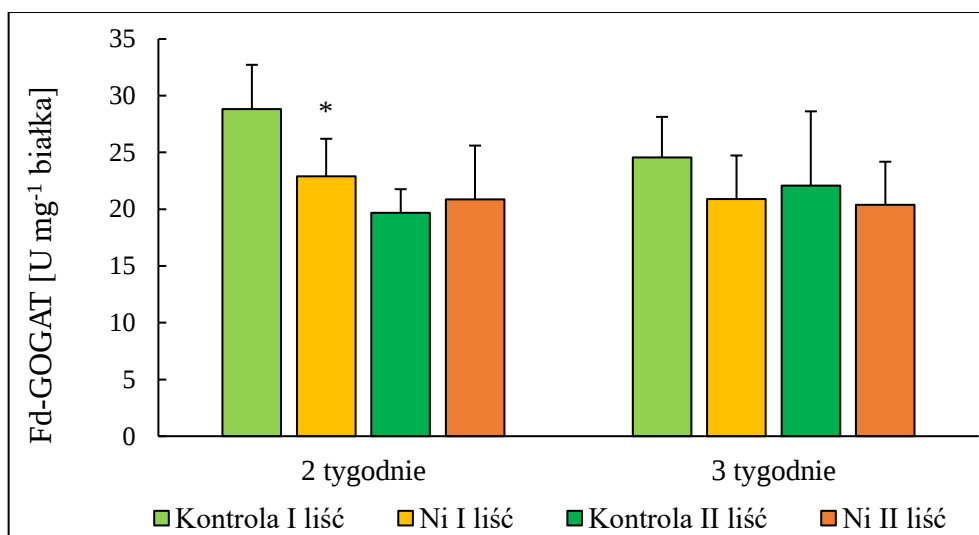
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)



Rys. 63. Aktywność NADH-GOGAT w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 3-5)

Istotne zmiany aktywności syntazy glutaminianowej zależnej od ferredoksyny zaobserwowano jedynie w liściu I siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni (Rys. 64). Nastąpił wtedy spadek aktywności tego enzymu o 21 % w porównaniu z kontrolą. W korzeniu siewek ogórka nie wykryto aktywności Fd-GOGAT.



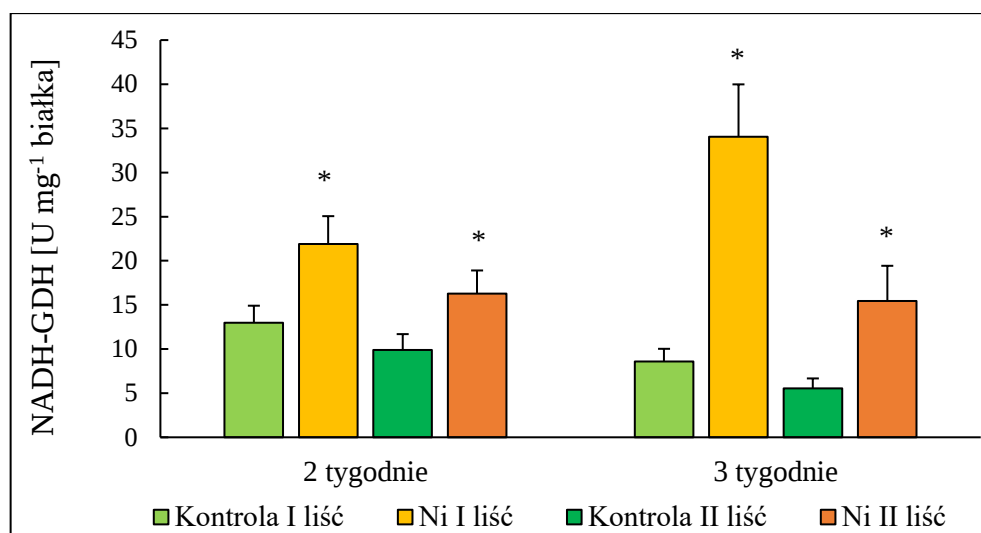
Rys. 64. Aktywność Fd-GOGAT w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=5-6$)

4.10.5. Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej

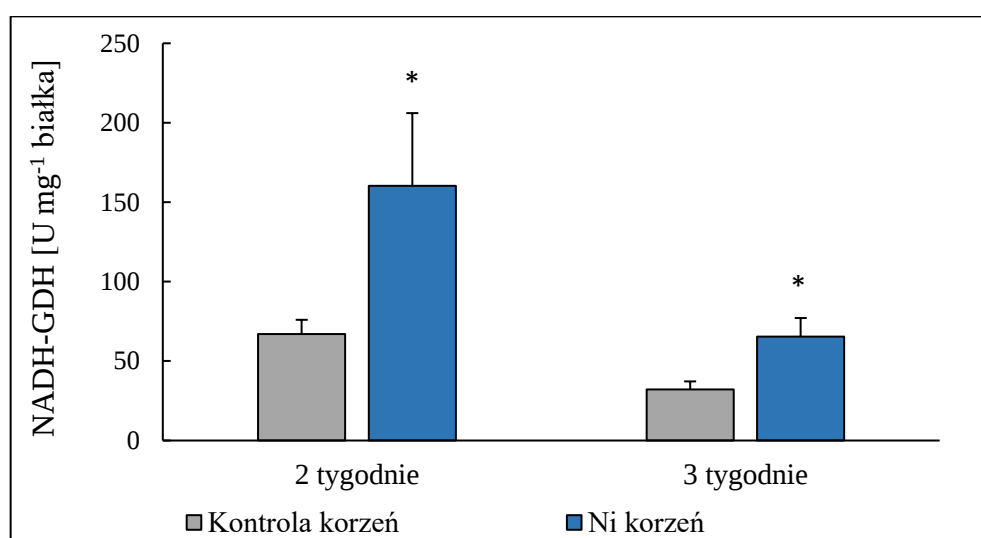
4.10.5.1. Aktywność NADH-GDH

Na Rys. 65 oraz Rys. 66 przedstawiono wpływ Ni na aktywność aminującą dehydrogenazy glutaminianowej w badanych organach siewek ogórka. Aplikacja Ni do podłoża spowodowała istotny wzrost aktywności NADH-GDH we wszystkich wariantach badawczych. Po 2 tygodniach traktowania metalem zaobserwowano 69 % i 64 % wzrost aktywności NADH-GDH, odpowiednio w liściu I i II. Po 3 tygodniach w liściu I odnotowano 4-krotny, a w liściu II prawie 3-krotny wzrost aktywności tego enzymu. W korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni nastąpił 2,4-krotny i 2-krotny wzrost aktywności enzymu, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania.



Rys. 65. Aktywność NADH-GDH w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)

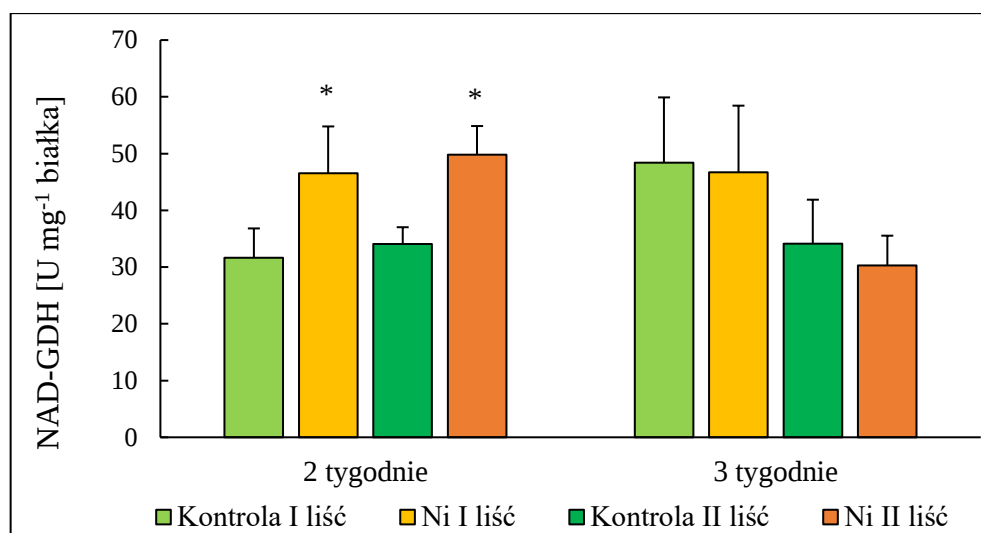


Rys. 66. Aktywność NADH-GDH w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ (n= 4-6)

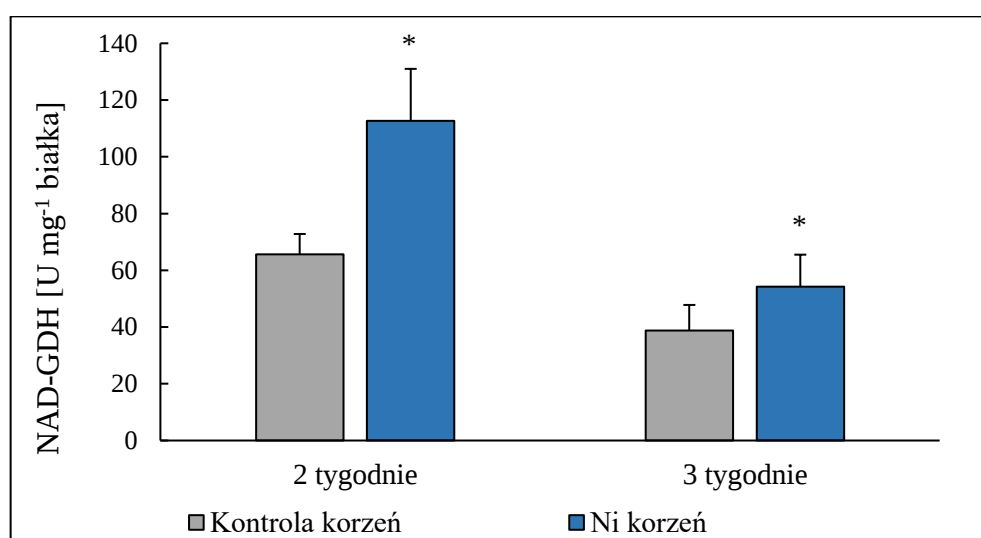
4.10.5.2. Aktywność NAD-GDH

Na Rys. 67 oraz Rys. 68 przedstawiono wpływ Ni na aktywność deaminującą dehydrogenazy glutaminianowej w badanych organach siewek ogórka. W wyniku ekspozycji siewek ogórka na działanie Ni nastąpił 47% i 46% wzrost aktywności NAD-GDH, odpowiednio w liściu I oraz II po 2 tygodniach traktowania. W korzeniu zaobserwowano 72 % oraz 40 % wzrost aktywności tego enzymu w porównaniu do kontroli, odpowiednio po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni.



Rys. 67. Aktywność NAD-GDH w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)

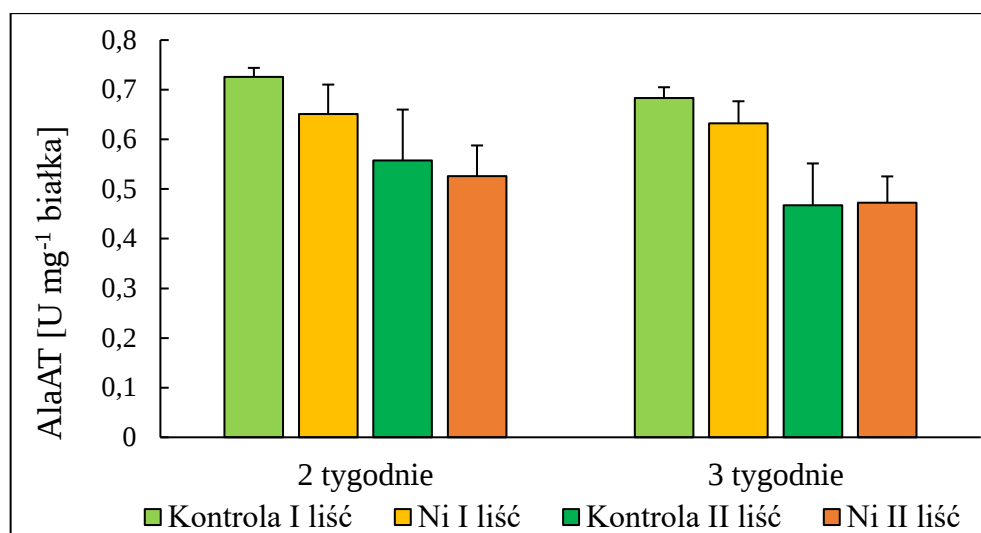


Rys. 68. Aktywność NAD-GDH w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

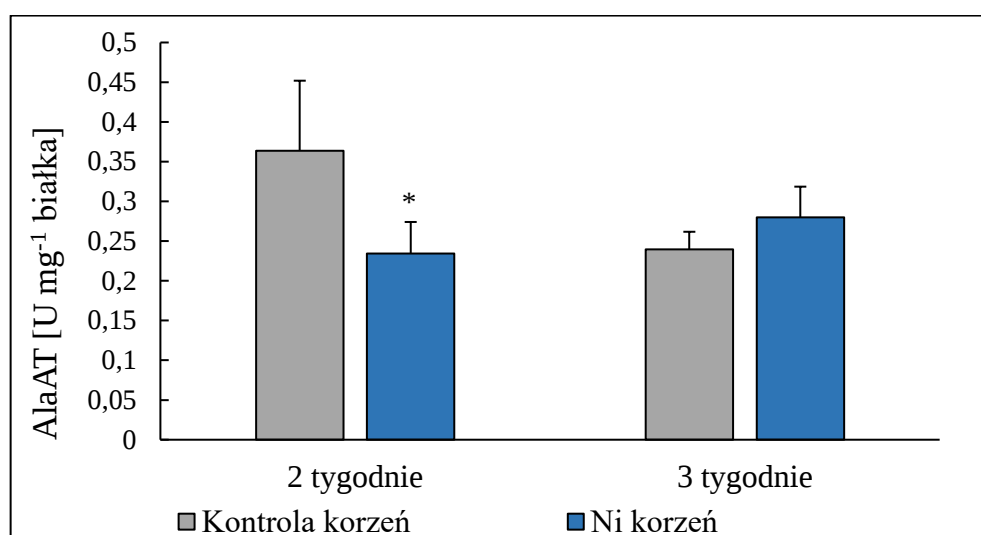
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-6$)

4.10.6. Aktywność aminotransferazy alaninowej

W liściach siewek ogórka traktowanych Ni nie stwierdzono istotnych zmian aktywności aminotransferazy alaninowej (Rys. 69). W korzeniu 2-tygodniowych siewek ogórka odnotowano 36% spadek aktywności AlaAT (Rys. 70).



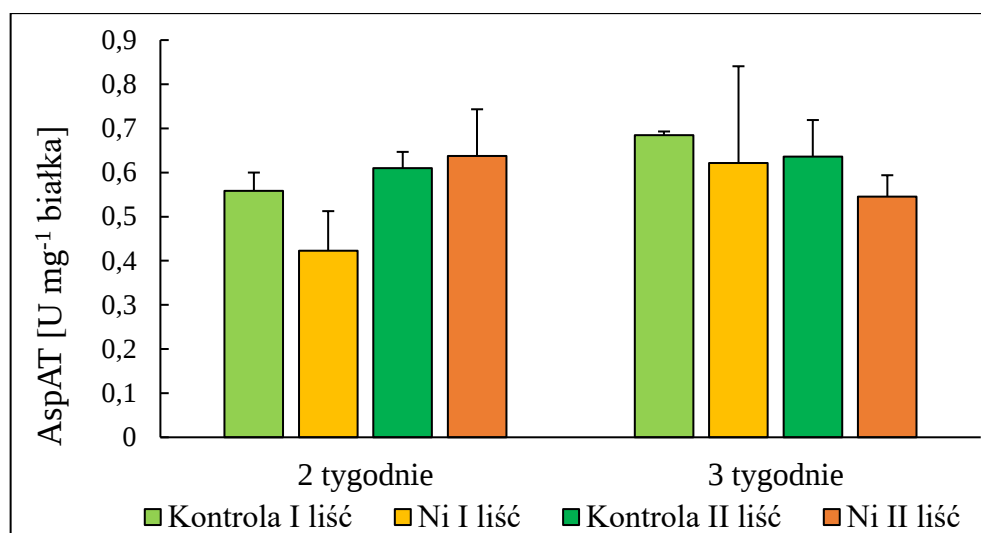
Rys. 69. Aktywność AlaAT w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3-4$)



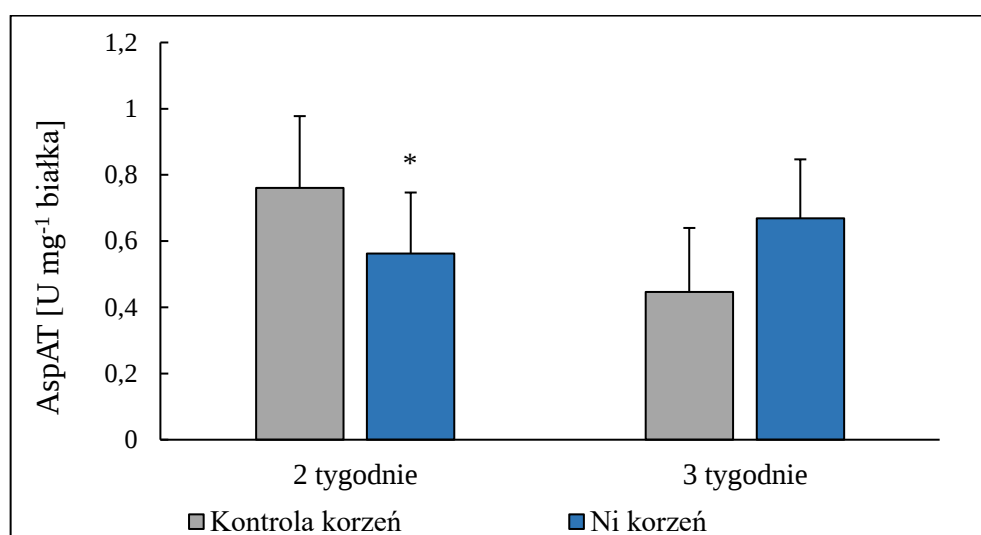
Rys. 70. Aktywność AlaAT w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4$)

4.10.7. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej

Podobnie jak w przypadku AlaAT w liściach siewek ogórka traktowanych Ni nie stwierdzono istotnych zmian aktywności aminotransferazy asparaginianowej (Rys. 71). W korzeniu 2-tygodniowych siewek ogórka odnotowano 26% spadek aktywności AspAT (Rys. 72).



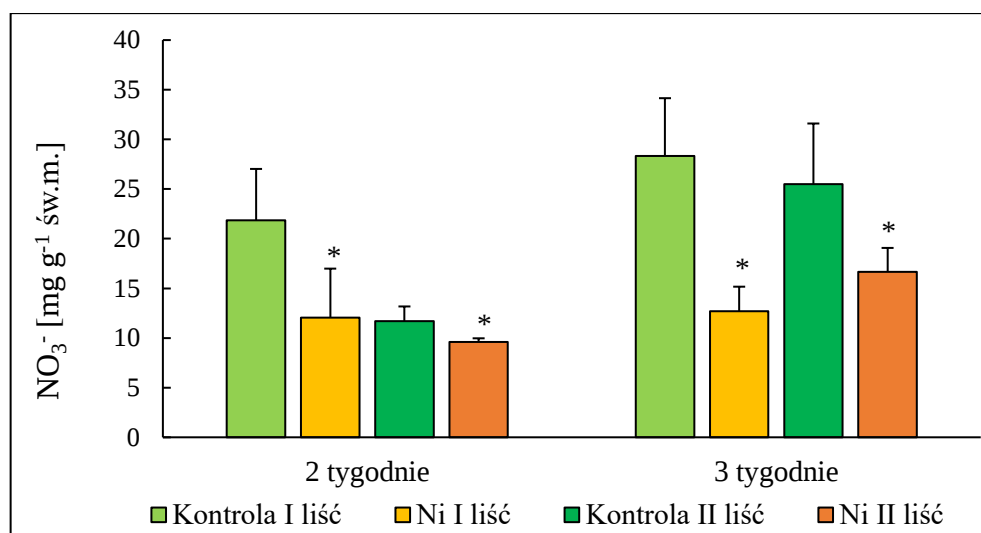
Rys.71. Aktywność AspAT w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n= 3-4$)



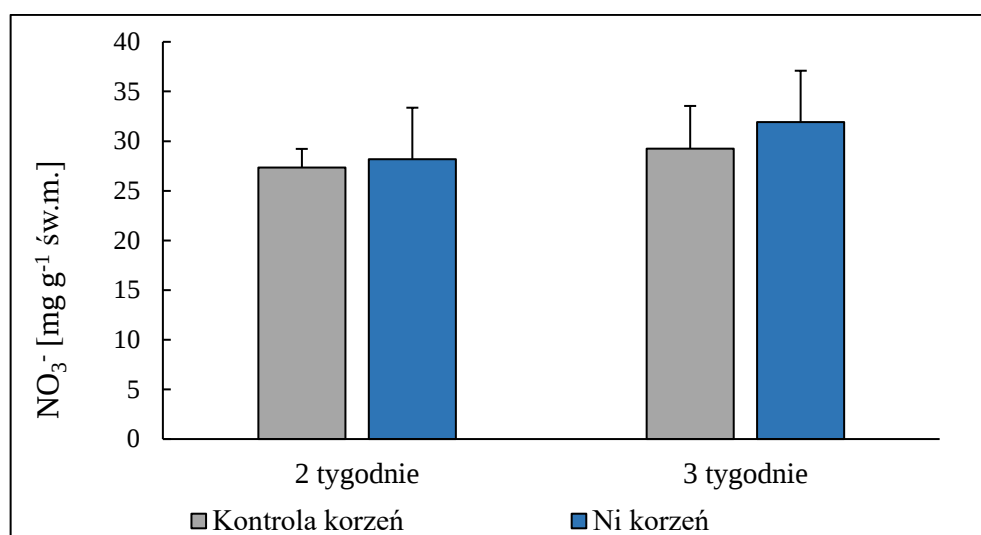
Rys. 72. Aktywność AspAT w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n= 4$)

4.11. Zawartość jonów NO_3^-

W wyniku ekspozycji siewek ogórka na działanie Ni po 2 tygodniach nastąpił spadek zawartości jonów azotanowych o 45% i 18% w porównaniu do kontroli, odpowiednio w liściu I i II (Rys. 73). Natomiast po 3 tygodniach w liściu I i II zaobserwowano odpowiednio 55 % oraz 35 % spadek zawartości NO_3^- . W korzeniu traktowanie Ni nie wpłynęło istotnie na zawartość jonów NO_3^- (Rys. 74).



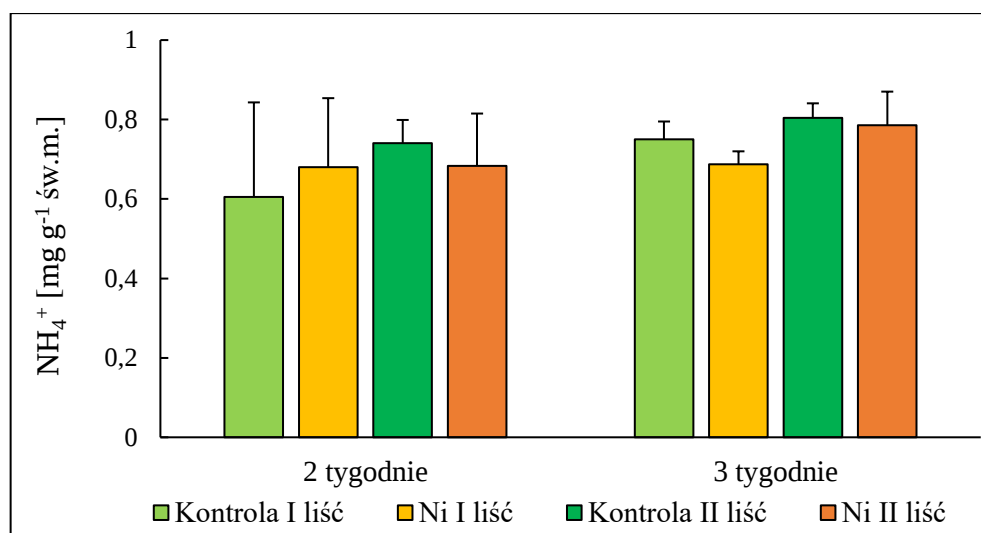
Rys. 73. Zawartość jonów NO_3^- w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-7$)



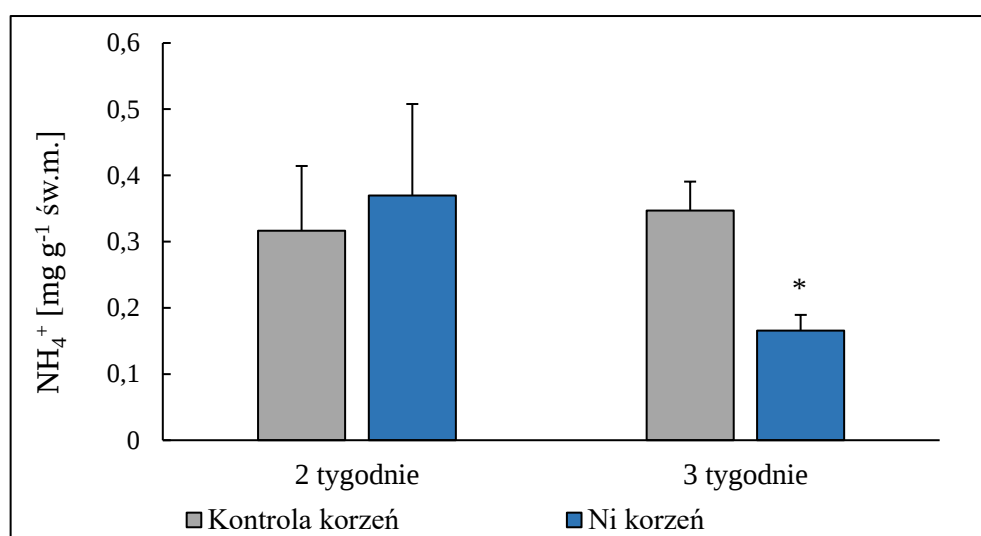
Rys. 74. Zawartość jonów NO_3^- w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=5-7$)

4.12. Zawartość jonów NH_4^+

Ekspozycja siewek ogórka na Ni nie wpłynęła istotnie na zawartość jonów NH_4^+ w liściach siewek ogórka w żadnym punkcie czasowym (Rys. 75). Istotny spadek zawartości badanych jonów zaobserwowano jedynie w korzeniu siewek ogórka po 3 tygodniach traktowania Ni i wynosił on 52% w porównaniu z kontrolą (Rys. 76).



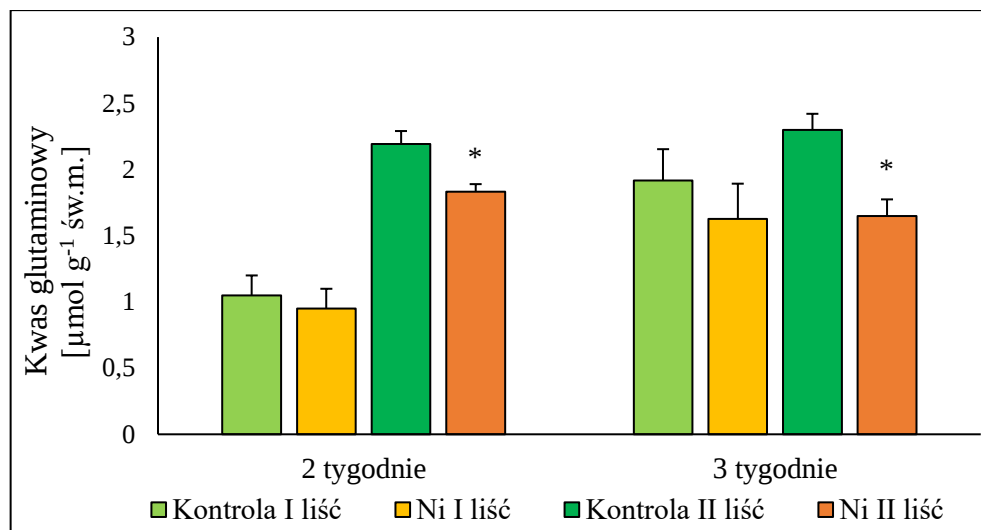
Rys. 75. Zawartość jonów NH_4^+ w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=3-5$)



Rys. 76. Zawartość jonów NH_4^+ w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni
 *- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4-7$)

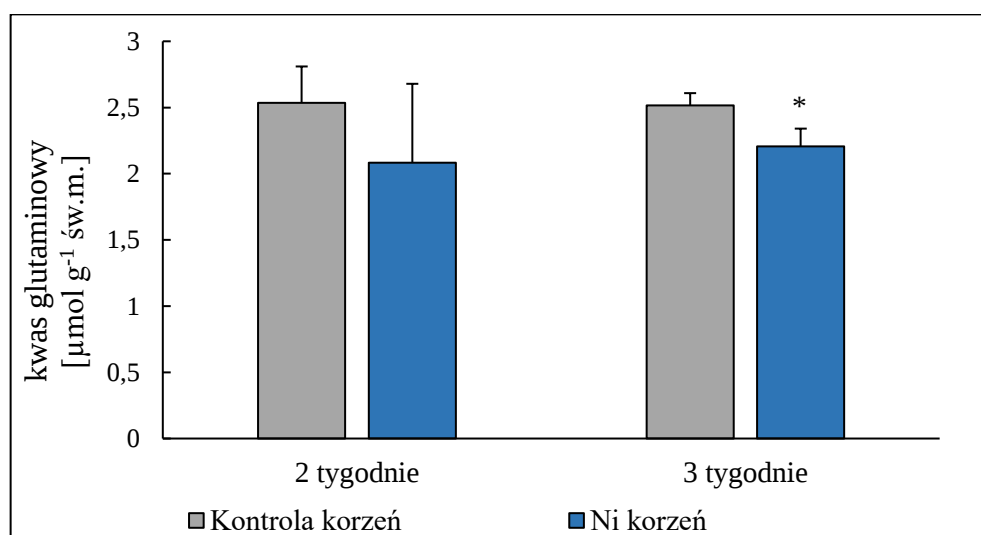
4.13. Zawartość kwasu glutaminowego

W liściu I siewek ogórka traktowanych Ni nie zaobserwowano istotnych zmian zawartości kwasu glutaminowego, natomiast w liściu II nastąpił spadek zawartości tego aminokwasu o 16% i 28%, odpowiednio, po 2 i 3 tygodniach traktowania metalem (Rys. 77). W korzeniu po 3 tygodniach zawartość kwasu glutaminowego obniżyła się o 12% w porównaniu z kontrolą (Rys. 78).



Rys. 77. Zawartość kwasu glutaminowego w liściu I oraz II siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4$)

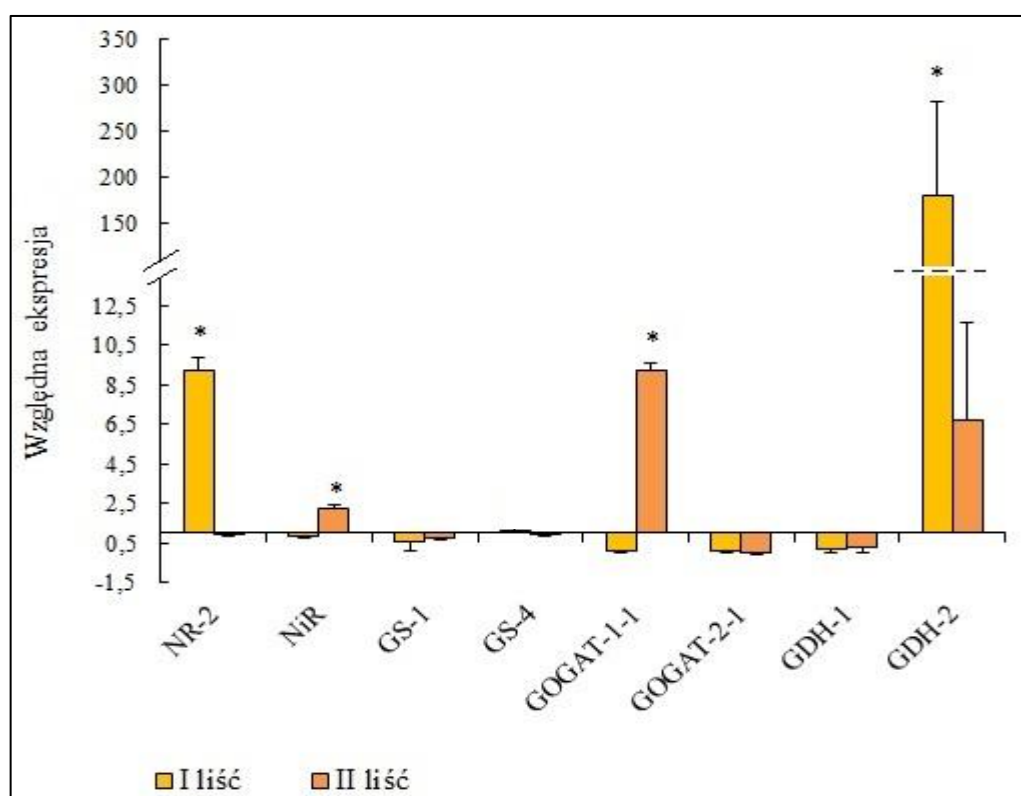


Rys. 78. Zawartość kwasu glutaminowego w korzeniu siewek ogórka po 2 i 3 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n=4$)

4.14. Analiza profilu ekspresji genów dla białek NR, NiR, GS, GOGAT i GDH

Na Rys. 79 przedstawiono zmiany ekspresji badanych genów w liściach siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni. Aplikacja Ni do podłoża hodowlanego spowodowała 180-krotny wzrost ekspresji genu GDH-2 w liściu I siewek ogórka traktowanych Ni, w porównaniu do kontroli. Stwierdzono także ponad 9-krotny wzrost ekspresji genów NR-2 w liściu I oraz GOGAT-1-1 w liściu II, a także 2,3-krotny wzrost ekspresji NiR w liściu II.



Rys. 79. Względna ekspresja genów w liściu I i II siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni

*- oznacza wyniki różniące się istotnie od odpowiedniego wariantu kontrolnego dla $p \leq 0,05$ ($n = 4$)

5. Dyskusja

5.1. Wpływ Ni na wzrost siewek ogórka

Nikiel podobnie jak inne metale ciężkie w zbyt dużych stężeniach wywołuje u roślin efekty toksyczne. Najczęstszą reakcją roślin na działanie czynników stresowych, w tym metali jest zhamowanie wzrostu. Wrażliwość roślin na metale ciężkie znacznie różni się w zależności od gatunku. Wykorzystywany w pracy ogórek odmiany Cezar wykazuje większą wrażliwość na działanie Ni, w porównaniu do wcześniej stosowanej w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin UŁ pszenicy, w podobnym układzie eksperymentalnym. Gajewska i wsp. [2012] wykazali, że 7-dniowe traktowanie pszenicy odmiany Zyta Ni w stężeniu 50 μM spowodowało około 50% redukcję wzrostu, w porównaniu do roślin kontrolnych. W pierwszym etapie badań na ogórku zastosowanie tego samego stężenia Ni okazało się letalne dla badanych siewek i skutkowało zamieraniem pędów już na etapie pojawiania się pierwszych liści. W wyniku przetestowania kilku stężeń Ni do dalszych analiz wybrano dawkę 10 μM Ni, przy zastosowaniu której obserwowano około 50% redukcję wzrostu korzeni siewek ogórka.

Mając na celu zbadanie czy odpowiedź siewek ogórka na stres Ni ma charakter organospecyficzny do oceny parametrów wzrostowych i analiz biochemicznych wykorzystywano osobno korzeń, liść I (starszy) i liść II (młodszy). Poddanie siewek ogórka działaniu Ni spowodowało znaczne zmniejszenie świeżej masy oraz powierzchni I i II liścia, a także masy korzenia. Redukcja wzrostu korzenia była nieco silniejsza w porównaniu do organów części nadziemnej. Podobne efekty działania Ni obserwowano również u innych gatunków, takich jak lucerna siewna [Helaoui i wsp., 2020], jęczmień [Rahman i wsp., 2005] i pszenica [Gajewska i wsp., 2012]. Porównując wpływ Ni na parametry wzrostowe I i II liścia wykazano, że większy spadek biomasy i powierzchni blaszki dotyczył II liścia.

Silniejsze zahamowanie wzrostu korzenia mogło być związane z ponad 2-krotnie większą akumulacją Ni w tym organie, w porównaniu z liściem I. Wyższą akumulację Ni w korzeniach stwierdzono również w pszenicy [Parlak, 2016] oraz w orzeszkach ziemnych [Gopal, 2014]. Gromadzenie większości pobranego metalu w części podziemnej jest typową reakcją roślin z grupy eliminatorów, do której zaliczany jest ogórek [Baker, 1981]. Uważane jest to za strategię obronną roślin mającą na celu ochronę aparatu fotosyntetycznego przed toksycznym działaniem metalu [Krämer i wsp., 2000]. Wykazana w niniejszej pracy ponad 2-krotnie większa akumulacja Ni w liściu I w porównaniu do liścia II, może być przejawem podobnej

strategii polegającej na ochronie młodszych organów. Różnicę w dystrybucji Ni między liśćmi starszymi i młodszyimi stwierdzili także Almehdi i wsp. [2019] u pustynnego krzewu *Calotropis procera*. Zdaniem cytowanych autorów mniej aktywne fotosyntetycznie starsze liście pełnią u tego gatunku funkcję magazynu pobranego przez roślinę Ni. Ponieważ najstarsze liście najszybciej się starzeją i odpadają z rośliny, powyższy mechanizm może być sposobem na pozbywanie się nadmiernej ilości toksycznego metalu. W niniejszej pracy wydłużenie czasu ekspozycji siewek ogórka na działanie Ni do 3 tygodni nie spowodowało zwiększonej akumulacji tego metalu w tkankach, przy czym nie wynikało to z ograniczenia zawartości Ni w podłożu hodowlanym. Możliwe, że jest to związane z osiągnięciem przez rośliny granicy możliwości akumulowania metalu w tkankach. Istnienie takiego zjawiska sugerują również wyniki uzyskane przez Yilmaz i Parlak [2011], którzy mimo zwiększania stężenia Ni w pożywce nie obserwowali większej akumulacji tego metalu w tkankach rdestniczki gęstej (*Groenlandia densa*).

Zahamowanie wzrostu może być wynikiem zaburzenia przebiegu podstawowych procesów życiowych, które odpowiadają za wzrost i rozwój roślin, takich jak oddychanie czy fotosynteza [Helaoui i wsp., 2020]. Negatywny wpływ na przebieg procesu fotosyntezy może wiązać się ze zmniejszeniem ilości barwników fotosyntetycznych, obniżeniem wymiany gazowej, uszkodzeniem aparatu fotosyntetycznego czy zmniejszeniem aktywności enzymów cyklu Calvina [Altaf i wsp., 2022]. Do oznaczanych w pracy parametrów związanych z procesem fotosyntezy należy zawartość barwników fotosyntetycznych oraz wydajność kwantowa fotoukładu II. Wykazano, że w liściach siewek ogórka Ni powoduje spadek zawartości chlorofilu a i b oraz karotenoidów. Odnotowane obniżenie stężenia barwników fotosyntetycznych było zależne zarówno od wieku liścia jak i czasu ekspozycji na metal. Największy spadek stężenia chlorofilu zaobserwowano w liściu I, co było skorelowane z nasileniem obserwowanych na tym organie wizualnych objawów toksyczności w postaci chloroz i nekroz. Większe obniżenie zawartości chlorofilu w liściu I w porównaniu do liścia II może być spowodowane wyższą akumulacją Ni w blaszce starszego liścia. Odnotowany spadek stosunku chlorofilu a/b sugeruje, że chlorofil a jest bardziej wrażliwy na toksyczność Ni niż chlorofil b. Podobne wyniki uzyskali Pandey i Sharma [2002] w traktowanych Ni liściach kapusty.

Możliwe, że obserwowane w niniejszej pracy obniżenie zawartości chlorofilu było również związane ze znacznym, nawet 70% spadkiem stężenia karotenoidów. Uważa się, że karotenoidy jako nieenzymatyczne antyoksydanty pełnią ważną rolę w ochronie chlorofilu przed stresem

oksydacyjnym [Sharma i Agrawal, 2008]. Spadek stężenia karotenoidów w odpowiedzi na traktowanie Ni stwierdzono również w liściach dyni [Valivand i Amooaghaie, 2021] oraz bazylii [Georgiadou i wsp., 2018]. Istnieją jednak doniesienia o indukowanym przez Ni wzroście zawartości karotenoidów w liściach, co stwierdzono np. w liściach trzciny cukrowej [Rampazzo i wsp., 2022].

Redukcja zawartości chlorofilu w odpowiedzi na działanie czynników stresowych, w tym metali ciężkich, może być wynikiem jego zmniejszonej biosyntezy [Stobart i wsp., 1985] bądź zwiększonej degradacji [Somashekaraiah i wsp., 1992]. Uważa się, że zaburzenia w syntezie tego barwnika mogą wiązać się z deficytem Fe, Mg i N, a także zmniejszoną aktywnością enzymów biorących udział w jego biosyntezie [Seregin i Kozhevnikova, 2006]. Ponadto, jon Mg^{2+} w centrum układu porfiryнового może być zastępowany przez jony metali ciężkich, w tym Ni, co zakłóca funkcjonowanie tak zmodyfikowanej cząsteczki barwnika jako fotoreceptora [Parlak, 2016]. W pracy nie wykazano spadku stężenia Mg i Fe w liściach po traktowaniu Ni, dlatego obniżenie stężenia chlorofilu nie jest związane z niedoborem tych pierwiastków. W roślinach ogórka poddanych działaniu Ni, oprócz spadku zawartości barwników fotosyntetycznych, stwierdzono także obniżenie wydajności kwantowej fotoukładu II (QY). Podobny efekt obserwowano w liściach papryki traktowanej Ni [Altaf i wsp., 2022]. Zakłócenie funkcjonowania fotoukładu II w warunkach stresu Ni może wynikać z indukowanej przez ten metal fotoinhibicji w centrum reakcji PSII, co wykazali Jahan i wsp. [2020]. Negatywny wpływ Ni na centrum reakcji PSII może być także związany z modyfikacją lub uszkodzeniem białka D1 [Seregin i Kozhevnikova, 2006; Drązkiewicz i Baszyński, 2010]. Istotny udział w obniżeniu wydajności fotosyntezy, może mieć także zmniejszenie ilości chloroplastów wynikające z redukcji powierzchni liści [Seregin i Kozhevnikova, 2006].

Dane literaturowe wskazują, że obserwowane w roślinach poddanych działaniu Ni zaburzenie procesu fotosyntezy może wynikać także z bezpośredniego uszkodzenia chloroplastów, zmiany struktury gran i błon tylakoidów chloroplastów oraz zmniejszenia ilości gran [Sobati-Nasab i wsp., 2021]. Stwierdzono, że stres Ni może prowadzić do zamykania aparatów szparkowych i ostatecznie do deficytu CO_2 [Helaoui i wsp., 2020]. Przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego wykazano, że w liściach papryki Ni powodował zmniejszenie długości i szerokości aparatów szparkowych [Altaf i wsp., 2022].

Obserwowana u roślin poddanych działaniu czynników stresowych, w tym metali ciężkich, redukcja wzrostu może wynikać bezpośrednio z inhibicji wzrostu wydłużeniowego komórek

jak i zmniejszenia intensywności podziałów komórkowych. Wykazano, że Ni powoduje obniżenie indeksu mitotycznego w korzeniach kukurydzy [L'Huillier i wsp., 1996], groszku [Gabbrielli i wsp., 1999] oraz pszenicy [Gajewska i wsp., 2006]. Taki negatywny wpływ Ni na aktywność mitotyczną wynika prawdopodobnie z indukowanych przez ten metal uszkodzeń struktury jąder, aberracji chromosomów i nieprawidłowości podczas procesu mitozy [Lešková i wsp., 2020].

Zahamowanie wzrostu wydłużeniowego komórek jest związane z obniżeniem plastyczności ścian komórkowych głównie poprzez intensyfikację lignifikacji, a także innych procesów prowadzących do wzmocnienia i usztywnienia ściany. Za specyficzny substrat dla peroksydaz uczestniczących w procesie lignifikacji uważana jest syringaldazyna. Badania histochemiczne wykazały, że peroksydazy utleniające syringaldazynę są umiejscowione głównie w ścianach komórkowych, gdzie ma miejsce intensywne odkładanie ligniny [Goldberg i wsp., 1985]. Uważa się, że peroksydazy ścian komórkowych, szczególnie te wykorzystujące syringaldazynę jako substrat, pełnią kluczową rolę w usztywnianiu ściany komórkowej, a co za tym idzie, w hamowaniu wzrostu i wydłużania komórek. W niniejszej pracy w liściu I oraz liściu II siewek ogórka po 3 tygodniach traktowania Ni stwierdzono istotny wzrost aktywności peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazyny (SPOX). Tylko po 3 tygodniach od aplikacji metalu większemu, w porównaniu do liścia I, zahamowaniu wzrostu liścia II towarzyszył intensywniejszy wzrost aktywności SPOX. Po 2 tygodniach, mimo większego zahamowania wzrostu liścia II, aktywność SPOX spadła poniżej poziomu kontroli. W korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni również obserwowano podwyższenie aktywności SPOX. Indukowane przez Ni zwiększenie aktywności peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazyny wykazano również w korzeniach sadzonek ryżu, gdzie równocześnie obserwowano wzrost zawartości ligniny [Lin i Kao, 2005].

Usztywnienie ściany komórkowej może także wiązać się z sekwestracją Ni w jej strukturze, co uważane jest za mechanizm obronny przed toksycznym działaniem metalu. Grupy karboksylowe i hydroksylowe polisacharydów ściany komórkowej, jak również grupy sulfhydrylowe i histydylowe białek odgrywają kluczową rolę w immobilizacji jonów metali w ścianach komórkowych [Krzesłowska, 2011]. Wiele jonów metali, w tym Ni^{2+} ma zdolność wiązania się z deestryfikowanymi pektynami [Dronnet i wsp., 1996; Meychik i wsp., 2014]. Wykazano, że kwasy poligalakturonowy oraz hydroksycynamonowy ścian komórkowych mogą skutecznie wiązać Ni. W konsekwencji zwiększa się sztywność ściany, co może wyjaśniać hamowanie wydłużania się komórek [Lešková i wsp., 2020].

Redukcja biomasy może wynikać również z ograniczenia absorpcji składników odżywczych, poprzez konkurencyjne pobieranie jonów metalu [Rehman i wsp., 2016]. Dzięki podobieństwu do innych metali dwuwartościowych Ni^{2+} może konkurować z tymi metalami podczas transportu oraz w wielu procesach biochemicznych i fizjologicznych. Tak jest w przypadku żelaza, ponieważ często wysoki poziom Ni indukuje pojawienie się objawów przypominających niedobór Fe, takich jak chloroza liści. Wiele transporterów zaangażowanych w pobieranie i dystrybucję Fe^{2+} jest również zdolnych do pośredniczenia w transporcie Ni^{2+} przez błony, co sugeruje istnienie konkurencji między tymi dwoma metalami na poziomie transportu [Lešková i wsp., 2020]. W odpowiedzi na traktowanie Ni wykazano spadek zawartości żelaza w pędzie kapusty [Prajapati i wsp., 2020], a także w liściach i korzeniach kukurydzy [Amjad i wsp., 2020]. W przeciwieństwie do cytowanych wyżej prac w siewkach ogórka stwierdzono wzrost zawartości żelaza spowodowany aplikacją Ni. Podobnie, wzrost zawartości żelaza odnotowano w korzeniu pomidora traktowanego Ni [Jahan i wsp., 2020]. W pracy wykazano spadek zawartości manganu w liściach a także sodu i potasu w korzeniach ogórka. Dane literaturowe wskazują, że aplikacja Ni spowodowała spadek zawartości potasu i manganu w liściach i korzeniach pomidora [Jahan i wsp., 2020] oraz spadek potasu w roślinach papryki [Altaf i wsp., 2022] i kapusty [Prajapati i wsp., 2020].

Podsumowując, wywołany działaniem Ni stopień zahamowania wzrostu był zależny od organu rośliny. Najsilniej zahamowany był wzrost korzenia co wiązało się z najwyższą akumulacją metalu w tym organie. W liściach nie stwierdzono zależności pomiędzy akumulacją Ni, a stopniem zahamowania wzrostu. Liść II, mimo mniejszej akumulacji Ni, charakteryzował się większym zahamowaniem wzrostu. Wykazano, że Ni może zakłócać przebieg procesu fotosyntezy poprzez obniżenie zawartości barwników asymilacyjnych oraz zmniejszenie wydajności kwantowej fotoukładu II. Intensywniejszy spadek zawartości barwników obserwowano w liście I, w którym akumulacja Ni była większa. Takiej zależności nie stwierdzono analizując wpływ Ni na wydajność kwantową fotoukładu II. Obserwowany w siewkach ogórka traktowanych Ni wzrost aktywności peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazyny sugeruje indukcję procesu lignifikacji. Nie ma jednak jasnej zależności pomiędzy zahamowaniem wzrostu liści, a wzrostem aktywności peroksydaz.

5.2. Wpływ Ni na procesy pro- i antyoksydacyjne

Wytwarzanie RFT jest nieodłącznym elementem metabolizmu wszystkich organizmów żyjących w warunkach tlenowych, w tym roślin. Stanowią one produkty uboczne procesów fizjologicznych związanych z transportem elektronów oraz powstają w reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez niektóre enzymy z grupy oksydaz [Mittler, 2017; Huang i wsp., 2019].

W niniejszej pracy wpływ Ni na wytwarzanie RFT badano metodą histochemiczną przeprowadzając reakcje dające barwne produkty wskazujące na obecność O_2^- i H_2O_2 . Taka technika detekcji RFT jest ostatnio dość często wykorzystywana w badaniach dotyczących indukcji stresu oksydacyjnego przez różne czynniki stresowe, w tym metale ciężkie. Jest to metoda *in situ* umożliwiającą lokalizację obszarów akumulacji RFT w blaszkach liściowych. Stanowi ona dobrą alternatywę dla analiz zawartości RFT we fragmentach wyciętych z blaszki liściowej, w których przy pobieraniu tkanki zazwyczaj pomija się nerwy, zwłaszcza główne.

W liściach kontrolnych siewek ogórka wykryto niewielką zawartość O_2^- i H_2O_2 , które zlokalizowane były głównie w okolicach wiązek przewodzących oraz na brzegu blaszki. Podobny efekt barwienia liści ogórka na obecność RFT w warunkach kontrolnych obserwowany był również przez innych autorów [Łukawska-Kuźma i wsp., 2012; Wang i wsp., 2018; Słomnicka i wsp., 2021]. Jak wspomniano wyżej obecność RFT w tkankach roślin jest zjawiskiem fizjologicznym. Anionorodnik nadadtlenkowy, produkt jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, może powstawać na skutek „wyciekania” elektronów podczas ich transportu w chloroplastach i mitochondriach w przebiegu, odpowiednio fotosyntezy i oddychania. Kolejnym źródłem O_2^- może być aktywność enzymów takich jak oksydaza błonowa zależna od NADPH oraz peroksydaza, zwłaszcza związana ze ścianą komórkową [Marino i wsp., 2012; Kimura i wsp., 2014]. W plazmolemie komórek liści ogórka potwierdzono obecność oksydazy wytwarzającej O_2^- poprzez redukcję O_2 kosztem cytoplazmatycznego NADPH [Łukawska-Kuźma i wsp., 2012]. Nieenzymatyczna lub katalizowana przez SOD dysproporcjonacja O_2^- prowadzi do powstania H_2O_2 . Oprócz tego H_2O_2 może być produktem redukcji O_2^- przez askorbinian, związki tiolowe lub inne reduktory. Może również być generowany w reakcjach katalizowanych przez oksydazy utleniające glikolan, glukozę lub aminokwasy [Ślesak i wsp., 2007; Smirnov i Arnaud, 2019].

W odpowiedzi na traktowanie Ni w liściach siewek ogórka nastąpiła intensywna akumulacja O_2^- , na co wskazywało pojawienie się na znacznej powierzchni blaszki liściowej osadów

niebieskiego formazanu, produktu redukcji NBT. W przeciwieństwie do siewek kontrolnych obecność O_2^- wykryto głównie w obszarach międzyżyłkowych. Przyjmując powierzchnię liścia wybarwioną NBT jako ilościowy wskaźnik akumulacji O_2^- stwierdzono, że liście siewek traktowanych Ni zawierały kilkakrotnie więcej O_2^- niż odpowiadające im liście siewek kontrolnych. Akumulację O_2^- w odpowiedzi na nadmierne stężenie Ni w podłożu wykazano również w liściach pszenicy [Gajewska i Skłodowska, 2007], papryki [Altaf i wsp., 2022], maneczek łękowatej (*Eleusine coracana* L.) [Kotapati i wsp., 2017] i soi [Mir i wsp., 2018].

Zwiększona generacja O_2^- i jego pochodnych w warunkach stresowych, w tym przy podwyższonym stężeniu metali ciężkich w podłożu, może być spowodowana zaburzeniami w transporcie elektronów w przebiegu procesów będących stałym źródłem RFT w komórkach roślinnych, głównie fotosyntezy. Do wzmożonej produkcji O_2^- może dochodzić przy nadmiernej redukcji elementów łańcucha fotosyntetycznego, która sprzyja wyciekaniu elektronów z łańcucha. Taka sytuacja może mieć miejsce gdy utrudnione są reakcje przekazywania elektronów na kolejne akceptory lub gdy dochodzi do inhibicji reakcji fazy ciemnej [Savchenko i Tikhonov, 2021]. Z danych literaturowych wynika, że Ni może ingerować w przebieg zarówno fazy jasnej jak i ciemnej. Indukowane przez ten metal zaburzenia w przenoszeniu elektronów między poszczególnymi przenośnikami stwierdzono w liściach kukurydzy [Drażkiewicz i Baszyński, 2010], szarłat wiechowatego (*Amaranthus puniculatus*) [Pietrini i wsp., 2015] i kapusty sitowatej [Khan i wsp., 2016]. W liściach kapusty sitowatej Ni wywołał istotny spadek aktywności Rubisco, kluczowego enzymu fazy ciemnej fotosyntezy [Khan i wsp., 2016]. Udowodniono, że Ni powoduje obniżenie przewodnictwa szparkowego i wewnątrzkomórkowego stężenia CO_2 , [Khaliq i wsp., 2015; Khan i wsp., 2016; Altaf i wsp., 2022; Kumar i wsp., 2022], co również negatywnie wpływa na przebieg fazy ciemnej. W niniejszej pracy stwierdzono niewielki spadek wydajności kwantowej fotoukładu II (QY), co wskazuje, że w opisywanym układzie doświadczalnym Ni powodował zakłócenia w przebiegu fazy jasnej fotosyntezy. Może to sugerować, że obserwowana w liściach ogórka traktowanego Ni akumulacja O_2^- może w jakimś stopniu wiązać się z intensywniejszym jego wytwarzaniem w procesie fotosyntezy.

Uważa się jednak, że w warunkach stresowych głównym źródłem O_2^- u roślin jest oksydaza błonowa zależna od NADPH [Miller i wsp., 2009; Li i wsp., 2018]. Wzrost aktywności tego enzymu w warunkach stresu Ni obserwowano w korzeniach pszenicy. Stosując inhibitory oksydazy zależnej od NADPH potwierdzono, że w korzeniach siewek pszenicy enzym ten był źródłem O_2^- generowanego w odpowiedzi na traktowanie Ni. Zmiany aktywności oksydazy

blonowej zależnej od NADH były zbieżne w czasie i nasileniu z tempem produkcji O_2^- [Hao i wsp., 2006].

Oprócz akumulacji O_2^- w liściach siewek ogórka traktowanych Ni stwierdzono również znaczny wzrost zawartości H_2O_2 , co jest zgodne z wynikami uzyskanymi dla innych gatunków roślin [Gajewska i Skłodowska, 2007; Khaliq i wsp., 2015; Mir i wsp., 2018; Fiala i wsp., 2021; Altaf i wsp., 2022; Kumar i wsp., 2022]. Podwyższeniu zawartości H_2O_2 w liściach ogórka nie towarzyszył wzrost aktywności SOD, a więc akumulacja tej RFT nie wynikała raczej z katalizowanej przez ten enzym dysproporcjonacji O_2^- . Możliwe, że w wytwarzanie H_2O_2 w liściach siewek ogórka poddanych działaniu Ni zaangażowane są inne enzymy, takie jak oksydazy [Ślesak i wsp., 2007; Smirnoff i Arnaud, 2019]. Prawdopodobna jest również nieenzymatyczna dysproporcjonacja O_2^- do H_2O_2 .

Porównując liść I i II siewek ogórka pod względem akumulacji RFT następującej w odpowiedzi na traktowanie Ni wykazano, że zarówno O_2^- jak i H_2O_2 w większym stopniu gromadziły się w liściu I, co było zbieżne z większą akumulacją Ni w jego tkankach.

W niniejszej pracy aktywność SOD w liściach ogórka traktowanego Ni uległa istotnemu obniżeniu, podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez innych autorów [Gajewska i Skłodowska, 2007; Kotapati i wsp., 2017]. Spadek aktywności tego metaloenzymu w warunkach stresu wywołanego przez metale ciężkie może być spowodowany deficytem pierwiastków wchodzących w skład cząsteczki SOD. Enzym ten wykazuje również dużą wrażliwość na działanie oksylipin takich jak 4-HNE i kwas 12-oksofitodienowy [Knieper i wsp., 2023]. W przeciwieństwie do niniejszej pracy większość publikacji dotyczących wpływu Ni na rośliny prezentuje wzrost aktywności SOD w liściach [Khaliq i wsp., 2015; Pietrini i wsp., 2015; Soliman i wsp., 2019; Amjad i wsp., 2020; Fiala i wsp., 2021; Altaf i wsp., 2022; Kumar i wsp., 2022].

Uważa się, że głównymi enzymami zaangażowanymi w usuwanie H_2O_2 w komórkach roślinnych są CAT i APX [Dietz i wsp., 1999; Anjum i wsp., 2016]. Różnią się one pod względem powinowactwa do H_2O_2 oraz zapotrzebowania na siłę redukującą przy pełnieniu swojej funkcji katalitycznej. Katalaza powoduje rozkład H_2O_2 bez udziału siły redukującej, ale ma niskie powinowactwo do tego substratu i wykazuje aktywność dopiero przy wysokich jego stężeniach. Z kolei APX potrzebuje do przeprowadzenia redukcji H_2O_2 askorbinianu pełniącego funkcję reduktora, ale ma duże powinowactwo do H_2O_2 i działa już przy niskich jego stężeniach [Anjum i wsp., 2016]. Znaczenie CAT i APX w ochronie komórek roślinnych

przed działaniem H_2O_2 może zależeć m.in. od wrażliwości ich cząsteczek na uszkodzenia oksydacyjne.

Podobnie jak w przypadku SOD aktywność CAT w liściach ogórka obniżyła się po traktowaniu Ni, co jest dość powszechną reakcją roślin na stres wywołany tym metalem. Spadki aktywności CAT w odpowiedzi na stres Ni obserwowano wcześniej w liściach pszenicy [Gajewska i Skłodowska, 2007], bawełny [Khaliq i wsp., 2015], manneczki łąkowej [Kotapati i wsp., 2017], soi [Mir i wsp., 2018], bakłażana [Soliman i wsp., 2019] i kukurydzy [Fiala i wsp., 2021]. Istnieją jednak doniesienia o wzroście aktywności tego enzymu w liściach roślin traktowanych Ni [Amjad i wsp., 2020; Altaf i wsp., 2022]. Obniżenie aktywności CAT u roślin poddanych działaniu metali ciężkich może być związane z dużą podatnością cząsteczki tego enzymu na uszkodzenia dokonywane przez RFT. Hodgson i Fridovich [1975] udowodnili, że aktywność katalazy jest inhibowana przez O_2^- .

W niniejszej pracy aktywność APX w liściach ogórka wzrosła w odpowiedzi na stres Ni, z wyjątkiem liścia II po 2 tygodniach traktowania. Większość opublikowanych wyników badań potwierdza indukcję aktywności APX w liściach roślin poddanych działaniu Ni [Gajewska i Skłodowska, 2007; Khaliq i wsp., 2015; Pietrini i wsp., 2015; Khan i wsp., 2016; Soliman i wsp., 2019; Amjad i wsp., 2020; Altaf i wsp., 2022; Kumar i wsp., 2022].

Poza CAT oraz APX H_2O_2 jest wykorzystywany przez inne enzymy takie jak peroksydazy klasy III. W niniejszej pracy badano aktywność peroksydazy oznaczanej względem guajakolu oraz syringaldazyny. Chociaż peroksydazy klasy III nie są typowymi enzymami antyoksydacyjnymi to stwierdzone w pracy wielokrotne wzrosty ich aktywności wskazują na ich istotny udział w usuwaniu H_2O_2 gromadzącego się w liściach w odpowiedzi na traktowanie Ni.

Porównując reakcje antyoksydacyjne w poszczególnych organach siewek ogórka należy zwrócić uwagę, że korzenie, mimo ich bezpośredniego kontaktu z metalem i większej jego akumulacji w tkankach w porównaniu z liśćmi na ogół wykazują mniej intensywne zmiany (zarówno wzrosty jak i spadki) aktywności enzymatycznych antyoksydantów. W przeciwieństwie do liści aktywności SOD i APX w korzeniach wzrosły po 3 tygodniach traktowania a aktywność CAT nie zmieniała się. Aktywności peroksydaz klasy III wykazały tak jak w liściach tendencje wzrostowe, ale w znacznie mniejszym nasileniu. Porównując reakcje liścia I i II można stwierdzić, że po krótszym czasie traktowania Ni (2 tygodnie) zmiany

aktywności enzymów antyoksydacyjnych występowały tylko w liściu I akumulującym więcej metalu lub były intensywniejsze w liściu I niż w liściu II.

Jeśli produkcja RFT przekracza potencjał antyoksydacyjny komórki może dochodzić do oksydacyjnych uszkodzeń makrocząsteczek istotnych dla zachowania prawidłowej struktury i funkcji komórek roślinnych. Wśród związków podatnych na utlenianie znajdują się lipidy będące ważnym składnikiem błon plazmatycznych. Peroksydacja lipidów jest najczęściej oznaczanym wskaźnikiem nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach.

Stopień peroksydacji lipidów rutynowo określa się poprzez pomiar stężenia MDA [Skórzyńska-Polit, 2007] metodą opartą na jego reakcji z TBA, która prowadzi do wytworzenia barwnego produktu. Dialdehyd malonowy zaliczany jest do końcowych produktów peroksydacji lipidów [Morales i Munné-Bosch, 2019]. Oksylipina ta jest pochodną utleniania kwasów tłuszczowych zawierających przynajmniej 3 wiązania podwójne [Guéraud i wsp., 2010]. Powstaje w wyniku rozerwania łańcucha wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych przez liazę wodoronadtlenkową [Savchenko i wsp., 2014].

W niniejszej pracy w liściach siewek ogórka poddanych działaniu Ni stwierdzono znaczną akumulację MDA. Najsilniejszy, ponad 2-krotny wzrost stężenia MDA obserwowano w liściu II po 2 tygodniach. Akumulację MDA w odpowiedzi na traktowanie Ni wykazano również m.in. w liściach kapusty sitowatej [Khan i wsp., 2016], batata [Kumar i wsp., 2022], kukurydzy [Amjad i wsp., 2020], pszenicy [Parlak, 2016] i papryki [Altaf i wsp., 2022]. Istnieją również doniesienia o braku zmian stężenia MDA w odpowiedzi na stres wywołany Ni, mimo akumulacji RFT w tkankach liścia [Gajewska i Skłodowska, 2007]. Podobny efekt obserwowano również w niniejszej pracy po 2 tygodniach traktowania metalem w przypadku liścia I, gdzie podwyższenie stężenia MDA nie było istotne statystycznie. Jednocześnie w liściu tym wykazano prawie 4-krotny wzrost aktywności GST, enzymu uczestniczącego w detoksykacji elektrofilowych związków organicznych poprzez ich sprzęganie z glutationem. Możliwe, że utrzymywanie się stężenia MDA na poziomie kontrolnym było związane z silnym wzrostem aktywności GST, dla której MDA stanowi potencjalny substrat. W pozostałych wariantach badanych liści ogórka wzrosty aktywności GST były znacznie mniejsze a stężenie MDA przewyższało istotnie poziom kontrolny. Dialdehyd malonowy charakteryzuje się wysoką toksycznością ze względu na jego zdolność do łączenia się z DNA i białkami [Jové i wsp., 2020]. Uważa się, że GST może odgrywać ważną rolę w jego usuwaniu [Mueller i wsp.,

2008]. Weber i wsp. [2004] wykazali, że w liściach rzodkiewnika pospolitego MDA powodował indukcję aktywności genów kodujących GST.

Z danych literaturowych wynika, że GST może również katalizować tworzenie koniugatów GSH z innymi produktami fragmentacji utlenionych łańcuchów kwasów tłuszczowych, takimi jak 4-HNE [Gronwald i Plaisance, 1998; Guéraud i wsp., 2010], kwas 13-okso-oktadekadienowy (13-oksoODE) [Blackburn i wsp., 1997], kwas 12-oksofitodienowy i fitoprostany [Mueller i wsp., 2008]. Koniugaty oksylipin z GSH mogą się tworzyć również nieenzymatycznie, jednak z mniejszą wydajnością niż w reakcji katalizowanej przez GST [Mueller i wsp., 2008; Guéraud i wsp., 2010].

W przeciwieństwie do liści, w korzeniach siewek ogórka traktowanych Ni nie stwierdzono wzrostu stężenia MDA. Podobnie, w korzeniach siewek pszenicy poddanych działaniu Ni nie obserwowano akumulacji tej oksylipiny [Gajewska i wsp., 2012]. W cytowanej pracy wraz z niezmiennym poziomem MDA wykryto tylko nieznaczny, przejściowy wzrost stężenia H_2O_2 . W niniejszej pracy w korzeniu nie oznaczano zawartości RFT, ale powszechnie wiadomo, że organy te są mniej narażone na ich wytwarzanie niż organy fotosyntetyzujące [Hasanuzzaman i wsp., 2020b]. Możliwe, że brak zmian stężenia MDA w korzeniach siewek ogórka traktowanych Ni ma związek z niewielką akumulacją RFT w tych organach. Ponadto, po 2 tygodniach uprawy siewek ogórka w podłożu zawierającym Ni w korzeniach stwierdzono wzrost aktywności GST, który, jak wspomniano wyżej, może przyczyniać się do utrzymywania zawartości tej oksylipiny na poziomie kontrolnym.

Ze względu na zaobserwowany w liściach siewek ogórka indukowany obecnością Ni wzrost zawartości MDA postanowiono zbadać wpływ tego metalu na wczesne produkty peroksydacji lipidów wykorzystując metodę LC-MS. Szczególnie wrażliwe na utlenianie są lipidy zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Podatność na utlenianie wzrasta wraz ze stopniem nienasycenia cząsteczki kwasu tłuszczowego [Catalá, 2009]. U roślin w puli wielonienasyconych kwasów tłuszczowych największą ilość stanowią kwasy 18:3 i 18:2. Pierwotnymi produktami utleniania lipidów, zarówno na drodze nieenzymatycznej, jak i w reakcji katalizowanej przez LOX są wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych. Ze względu na swoją niestabilność szybko ulegają one redukcji do odpowiadających im wodorotlenków [Triantaphylidès i wsp., 2008]. Wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych mogą być również usuwane przez GSH-Px, która wykorzystując GSH jako substrat redukujący przekształca je do odpowiednich alkoholi [Sugimoto i Sakamoto, 1997; Bela i wsp., 2022]. W niniejszej pracy

niewielki wzrost aktywności tego enzymu stwierdzono w liściu II po 2 tygodniach traktowania Ni. Możliwe, że był on związany z podwyższeniem stężenia wodoronadtlenków kwasów 18:3 i 18:2. Związków tych nie wykryto w ekstraktach z liści ogórka, ale na ich powstawanie w odpowiedzi na stres Ni wskazuje obecność ich zredukowanych pochodnych.

W niniejszej pracy w liściach siewek ogórka traktowanych Ni wykryto obecność dwóch pochodnych kwasu 18:3: kwas 9-hydroksyoktadekatrienowy (9-HOTrE) i kwas 13-hydroksyoktadekatrienowy (13-HOTrE) oraz czterech pochodnych kwasu 18:2: kwas 13-okso-oktadekadienowy (13-oksoODE), kwas 13-hydroksyoktadekadienowy (13-HODE), kwas 9-hydroksyoktadekadienowy (9-HODE) i kwas 8,13-dihydroksyoktadekadienowy (8,13-diHODE). W ogólnej puli wykrytych związków przeważały pochodne kwasu 18:2, zwłaszcza 13-HODE, natomiast najsilniejszy wzrost względnej zawartości po traktowaniu Ni wykazały pochodne kwasu 18:3, tj 9-HOTrE i 13-HOTrE. Wzrost zawartości wykrytych oksylipin w odpowiedzi na traktowanie Ni sugeruje wzrost aktywności lipoksygenaz (LOX), czyli enzymów utleniających nienasycone kwasy tłuszczowe do odpowiednich wodoronadtlenków. W niniejszej pracy aktywność tych enzymów nie była badana, ale istnieją doniesienia literaturowe potwierdzające indukcję aktywności LOX w tkankach roślin poddanych działaniu Ni. Wzrost aktywności tego enzymu obserwowano m.in. w liściach traktowanych Ni roślin bakłazana [Soliman i wsp., 2019] oraz manneczki łękowatej (*Eleusine coracana* L.) [Kotapati i wsp., 2017]. Występowanie pośród wykrytych w niniejszej pracy oksylipin 13- i 9-wodoronadtlenków lub ich pochodnych sugeruje, że w liściach siewek ogórka uprawianych w podłożu zawierającym Ni nastąpił wzrost aktywności 13-LOX i 9-LOX. Jedną z wykrytych pochodnych, 13-oksoODE, jest produktem utleniania 13-HODE i powstaje w reakcji katalizowanej przez zależną od NAD^+ dehydrogenazę 13-HODE [Murphy i Zarini, 2002]. Obserwowany w pracy wzrost zawartości 13-oksoODE może sugerować wywołaną Ni indukcję aktywności wspomnianego enzymu. Jediną wykrytą w liściach ogórka oksylipiną, która nie pochodzi ze szlaku syntezy zapoczątkowanego przez LOX była 8,13-diHODE. Powstaje ona w wyniku enzymatycznego przekształcenia kwasu 18:2 w reakcji katalizowanej przez syntazę diolu kwasu linolowego (LDS).

Chociaż przytoczone powyżej przykłady literaturowe sugerują, że wykryte w liściach ogórka oksylipiny pochodzą z reakcji katalizowanych przez LOX to nie można wykluczyć, że swój udział w generowaniu tych związków miały również RFT.

Do tej pory nie ma doniesień literaturowych dotyczących wpływu Ni na wytwarzanie wczesnych produktów peroksydacji lipidów w roślinach. Bardzo nieliczne są również prace opisujące powstawanie tej grupy oksylipin w odpowiedzi na stres wywołany przez inne metale ciężkie. Montillet i wsp. [2004] wykazali, że w liściach siewek rzodkiewnika pospolitego potraktowanych Cd zachodzi akumulacja wodorotlenków kwasów 18:2 i 18:3, tj. 9-HODE, 9-HOTrE, 13-HODE, 13-HOTrE, kwasu 12-hydroksyoktadekatrienowego (12-HOTrE) oraz kwasu 16-hydroksyoktadekatrienowego (16-HOTrE). Zdaniem cytowanych autorów 2 ostatnie związki są produktami nieenzymatycznego utleniania kwasu 18:3. U brunatnicy *Ectocarpus siliculosus* poddanej działaniu Cu stwierdzono wzrost zawartości 13-HODE i 13-HOTrE. Podwyższenie stężenia tych związków było, odpowiednio, 16- i 3-krotne, a więc znacznie większe niż w niniejszej pracy. Poza wymienionymi wodorotlenkami kwasów 18:2 i 18:3 stwierdzono również indukowaną stresem wywołanym przez Cu akumulację cyklicznych oksylipin takich jak kwas 12-oksofitodienowy i fitoprostany [Ritter i wsp., 2014].

W związku z nielicznymi badaniami dotyczącymi udziału wczesnych produktów peroksydacji lipidów w odpowiedzi roślin na stres metali ciężkich rola tych związków nie została jeszcze poznana. Wiadomo natomiast, że ta grupa oksylipin, zwłaszcza pochodne powstające w szlaku zapoczątkowanym przez 9-LOX mają istotne znaczenie w reakcji na stres biotyczny. Wykazano, że 9-HOTrE i 9-HODE uczestniczą w obronie roślin przed patogenami bakteryjnymi i grzybowymi [Göbel i wsp., 2002; Schuck i wsp., 2014; Battilani i wsp., 2018; Wang i wsp., 2021; Beccaccioli i wsp., 2022]. Działanie regulacyjne w interakcjach roślina-patogen przypisuje się również oksylipinom pochodzącym ze szlaku zapoczątkowanego przez LDS, m.in. 8,13-diHODE. Udowodniono, że wytwarzane przez rośliny kukurydzy związki z tej grupy mogą regulować ekspresję genów i metabolizm atakującego grzyba (*Fusarium verticillioides*) i w związku z tym znacząco wpływają na przebieg procesu patogenezy [Scala i wsp., 2014]. U zwierząt udział takich związków jak 9-HODE, 13-HODE i wielu innych wczesnych produktów peroksydacji lipidów w regulacji podziałów komórkowych, apoptozy a także regulacji metabolicznej i hormonalnej też został już potwierdzony [Quaranta i wsp., 2022].

Możliwe, że wykryte w niniejszej pracy wczesne produkty peroksydacji lipidów, zwłaszcza te, których zawartość najbardziej wzrasta po traktowaniu Ni, czyli 9-HOTrE i 13-HOTrE również pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych wpływających na przebieg odpowiedzi roślin na stres wywołany tym metalem ciężkim.

Wiele danych wskazuje na to, że metale ciężkie negatywnie działają na błony plazmatyczne powodując zmiany w ich strukturze i funkcjonowaniu, w tym ich przepuszczalności [Devi i Prasad, 1999; Singh i wsp., 2020]. Najpowszechniejszą metodą pozwalającą oszacować stopień uszkodzenia błon jest pomiar wycieku elektrolitów, który wykonano w niniejszej pracy. Wykazano, że poddanie siewek ogórka działaniu Ni spowodowało istotny wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych w liściach. Podobnie, większą przepuszczalność błon w warunkach stresu Ni stwierdzono m.in. w liściach kapusty sitowatej [Khan i wsp., 2016], pszenicy [Gajewska i wsp., 2012] i bawełny [Khaliq i wsp., 2015].

Przepuszczalność błon komórkowych jest w dużym stopniu zależna od jej składu lipidowego [Zhang i wsp., 2005; Wang i wsp., 2020]. Szczególne znaczenie ma profil fosfolipidów, które w przypadku plazmolemy mogą stanowić zdecydowaną większość wszystkich występujących w niej lipidów [Wang i wsp., 2020]. Ze względu na kształt cząsteczki klasy fosfolipidów takie jak PC, PG i PS mają tendencję do tworzenia stabilnej struktury dwuwarstwowej, podczas gdy inne, takie jak PE, mają skłonność do tworzenia niestabilnej struktury nielamelarnej [Wang i wsp., 2020; Yu i wsp., 2021]. W niniejszej pracy względna zawartość dwóch najliczniej występujących klas, czyli PC i PE, pozostała niezmienną w liściach siewek ogórka traktowanych Ni. Brak istotnych zmian w zawartości PC w odpowiedzi na stres Ni stwierdzono także w liściach pszenicy [Bernat i wsp., 2014a]. Podobnie, zawartość tej klasy fosfolipidów nie zmieniała się w liściach kapusty sitowatej poddanej działaniu Cd [Nouairi i wsp., 2006]. W przeciwieństwie do badanych w niniejszej pracy liści ogórka, w przypadku liści pszenicy traktowanej Ni zaobserwowano znaczny wzrost zawartości PE [Bernat i wsp., 2014a]. Z kolei w liściach migdałowca poddanego działaniu Cd zawartość obydwu wyżej wymienionych frakcji, PC i PE uległa obniżeniu [Elloumi i wsp., 2014], a w liściach będącej hiperakumulatorem kapusty rzepak traktowanej tym samym metalem ciężkim stwierdzono znaczny wzrost zawartości tych frakcji fosfolipidów [Nouairi i wsp., 2006].

Ze względu na wspomniane wyżej odmienne właściwości fosfolipidów klas PC i PE w aspekcie kształtu cząsteczki i zdolności do tworzenia struktury dwuwarstwowej, zmiana stosunku zawartości tych frakcji w błonie może znacznie wpływać na jej płynność, i co za tym idzie, przepuszczalność. W liściach ogórka po traktowaniu Ni stosunek PC/PE nie zmienił się istotnie. Przeciwnie, w liściach pszenicy stres Ni spowodował spadek stosunku PC/PE [Bernat i wsp., 2014a]. Natomiast Nouairi i wsp. [2006] wykazali, że zmiana stosunku PC/PE może wiązać się z wrażliwością danego gatunku na metal ciężki. W liściach wrażliwej na Cd kapusty sitowatej po działaniu tym metalem nastąpiło obniżenie stosunku PC/PE sugerujące wzrost

przepuszczalności, natomiast w przypadku tolerującej Cd kapusty rzepak obserwowano odwrotny trend.

W niniejszej pracy, w przeciwieństwie do niezmienionych w warunkach stresu Ni zawartości PC i PE, względna zawartość PA i PG wzrosła a zawartość PI uległa obniżeniu. Największe zmiany zaobserwowano w przypadku PA, który w warunkach kontrolnych miał znikomy udział w całkowitej puli fosfolipidów, tj. 0,7 – 1,8%, w zależności od liścia. Po traktowaniu Ni jego zawartość w liściu II prawie 3-krotnie przewyższała poziom kontroli. Podobnie, indukowany Ni wzrost zawartości PA wykazano wcześniej w liściach pszenicy [Bernat i wsp., 2014a]. Zwiększenie zawartości PA stwierdzono także w liściach traktowanych Cd siewek kapusty rzepak [Nouairi i wsp., 2006]. Uważa się, że ten najprostszy fosfolipid ze względu na unikalną budowę cząsteczki: stożkowy kształt, małą i ujemnie naładowaną część głowową złożoną z fosforanu może łatwo wchodzić w interakcje z białkami, lipidami a także inną cząsteczką PA. W związku z powyższym może wpływać na strukturę błony uczestnicząc w procesach fuzji i rozszczepienia oraz innych przegrupowaniach błony. Ponadto, może służyć jako substrat dla enzymów wytwarzających inne lipidy i bierze udział w regulacji wielu komórkowych szlaków sygnałowych [Kim i wsp., 2013; Liu i wsp., 2019; Zhukovsky i wsp., 2019]. Udowodniono, że PA ingeruje w funkcjonowanie szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego [Guo i wsp., 2012], reguluje aktywność oksydazy NADPH i w związku z tym produkcję RFT [Zhang i wsp., 2009]. Iakimova i wsp. [2013] wykazali, że w komórkach pomidora poddanych działaniu Cd PA stymuluje wytwarzanie RFT i uczestniczy w programowanej śmierci komórek.

Oprócz składu fosfolipidowego na płynność błony w dużym stopniu wpływa również stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych. Uważa się, że nienasycone lipidy zwiększają płynność błony, ponieważ podwójne wiązania cis w łańcuchach acylowych tworzą sztywny łuk, uniemożliwiając ich ścisłe upakowanie. Natomiast lipidy z nasyconymi kwasami tłuszczowymi zmniejszają płynność błony ze względu na ścisłe upakowanie prostych nasyconych łańcuchów kwasów tłuszczowych i ich silniejsze oddziaływanie ze sterolami [Harayama i Riezman, 2018].

U roślin poddanych różnym stresom środowiskowym zaobserwowano zmiany poziomu nienasycenia lipidów błonowych [Liu i wsp., 2019]. Stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy większym stopniem nienasycenia kwasów tłuszczowych a tolerancją na stres osmotyczny i niską temperaturę. Rola modyfikacji stopnia nienasycenia błony w warunkach stresu chłodu i osmotycznego jest dość dobrze poznana. Uważa się, że wysokie nienasycenie osłabia sztywność błon i w konsekwencji zmniejsza ich uszkodzenia pod wpływem ww. czynników

stresowych [Zhang i wsp., 2005]. Do tej pory wpływ metali ciężkich na stopień nienasycenia błon nie był zbyt intensywnie badany, a otrzymane wyniki nie dają jasnego obrazu odnośnie roli zmian nasycenia lipidów błonowych w odpowiedzi roślin na stres wywołany obecnością metali.

W niniejszej pracy poddanie siewek ogórka działaniu Ni doprowadziło do wzrostu poziomu nienasycenia fosfolipidów w liściach, na co wskazywała podwyższona wartość DBI. Wynikało to przede wszystkim ze znacznego wzrostu względnej zawartości kwasów 18:1 i 18:2. Analiza profilu fosfolipidów wykazała, że wiązało się to głównie ze wzrostem zawartości lipidów PC 18:2;18:8, PC 18:2;18:1 oraz PC 18:3;18:1. W liściu I względna zawartość 18:3 uległa istotnemu zmniejszeniu i było to związane w głównej mierze ze spadkiem zawartości lipidu PC 18:3;18:3, który dominował w całkowitej puli fosfolipidów liścia. Obniżenie zawartości kwasu 18:3, któremu towarzyszy wzrost zawartości jego prekursorów, kwasu 18:2 i 18:1 sugeruje indukowaną działaniem Ni inhibicję aktywności delta $\Delta 15$ desaturazy [Verdoni i wsp., 2001]. Wyniki przeprowadzonej w pracy analizy zawartości wczesnych produktów peroksydacji kwasów tłuszczowych pozwalają przypuszczać, że spadek zawartości kwasu 18:3 może być także spowodowany jego utlenianiem. Zawartość kwasu 16:0, jedyne wykrytego w liściach ogórka nasyconego kwasu tłuszczowego, również uległa znacznemu zmniejszeniu w odpowiedzi na stres Ni, a dotyczyło to głównie fosfolipidów PC 16:0;18:3, PC 16:0;18:2 oraz PG 16:0;18:3. Zmniejszoną proporcję kwasu 16:0 zaobserwowano także w liściach kukurydzy traktowanej Cd [Pál i wsp., 2007]. Biorąc pod uwagę wywołane działaniem Ni zmiany stopnia nienasycenia w poszczególnych klasach fosfolipidów stwierdzono, że uległ on zwiększeniu we wszystkich klasach z wyjątkiem PI. Na szczególną uwagę zasługuje PA, który wykazał największy wzrost DBI. Jednak w związku z niewielkim udziałem tej klasy w całkowitej puli fosfolipidów, nawet ponad 2-krotny wzrost stopnia nienasycenia tylko nieznacznie przyczynił się do indukowanego przez Ni wzrostu stopnia nienasycenia całej frakcji fosfolipidów.

W przeciwieństwie do niniejszej pracy, w liściach pomidora traktowanego Cd stwierdzono spadek stopnia nienasycenia wynikający ze wzrostu zawartości kwasów nasyconych 16:0 i 18:0 oraz jednonienasyconego 18:1, a także spadku zawartości kwasów 18:2 i 18:3. Stosując metodę znakowania izotopowego wykazano, że obserwowane zmiany były efektem indukcji syntezy wykrytych kwasów nasyconych oraz zahamowania syntezy kwasów nienasyconych [Ben Ammar i wsp., 2008]. W większości prac dotyczących wpływu metali ciężkich na profil kwasów tłuszczowych, podobnie jak w niniejszej pracy, odnotowano spadek względnej

zawartości kwasu 18:3 i podwyższenie zawartości 18:2 [Ouariti i wsp., 1997; Verdoni i wsp., 2001; Chaffai i wsp., 2007; Gajewska i wsp., 2012; Zemanová i wsp., 2015b; Liu i wsp., 2019].

Zmiany stopnia nienasycenia lipidów w odpowiedzi na stres metali ciężkich są różnie interpretowane w literaturze. Obniżenie stopnia nienasycenia prowadzące do zmniejszenia przepuszczalności błony traktowano jako reakcję obronną polegającą na ograniczeniu wnikania metalu do komórek [Chaffai i wsp., 2005]. Zmniejszona zawartość kwasów nienasyconych, zwłaszcza kwasu 18:3 może także chronić błonę przed procesami oksydacyjnymi. Wzrost stopnia nienasycenia wiążący się ze zwiększeniem przepuszczalności błony i tym samym ułatwieniem pobierania jonów metalu przez komórki interpretowano jako reakcję stresową wynikającą z ich toksycznego działania [Pál i wsp., 2007]. Dodatkowo, zwiększona płynność błony przy podwyższonym stopniu nienasycenia może ułatwiać RFT penetrację błony i sprzyjać ich oddziaływaniu na podwójne wiązania kwasów tłuszczowych [Nouairi i wsp., 2006]. Porównawcze badania reakcji na stres Cd u kapusty rzepak (gatunek wrażliwy) i kapusty sitowatej (hiperakumulator) wykazały, że tylko u tej pierwszej Cd wywołał zwiększenie stopnia nienasycenia fosfolipidów błony [Nouairi i wsp., 2006]. Kolejnym potwierdzeniem tezy, że niskie nienasycenie lipidów sprzyja odporności roślin na metale są wyniki badań przeprowadzonych na wykluczającym i hiperakumulującym gatunku rzodkiewnika pospolitego [Seregin i wsp., 2023]. Przeciwnie stanowisko odnośnie związku stopnia nienasycenia błony z odpornością na metale zajmują Zemanová i wsp. [2015 a,b]. Zdaniem tych autorów tolerancja hiperakumulatorów na metale ciężkie koreluje z ich zdolnością do zwiększania nienasycenia lipidów błonowych.

Wzrost stopnia nienasycenia fosfolipidów w liściach siewek ogórka traktowanych Ni należy odczytywać raczej jako reakcję stresową. Intensywniejszy wzrost DBI stwierdzono w liściu I, na którym jednocześnie obserwowano silniejsze objawy toksyczności w postaci nekroz i większy wyciek elektrolitów. W porównaniu z liściem II, liść I charakteryzował się też większą akumulacją Ni oraz znacznie wyższym poziomem RTF.

Podsumowując, Ni wywołał w liściach ogórka akumulację O_2^- i H_2O_2 . Może ona częściowo wynikać z indukowanego działaniem Ni obniżenia aktywności SOD i CAT. W usuwanie H_2O_2 w liściach siewek ogórka w warunkach stresu Ni zaangażowane są głównie APX i peroksydazy klasy III wykazujące znaczne wzrosty aktywności w odpowiedzi na traktowanie tym metalem ciężkim. Nikiel wywołuje w liściach ogórka oksydacyjne uszkodzenia lipidów, na co wskazuje wzrost zawartości wczesnych (wodorotlenki kwasów tłuszczowych i ich pochodne)

i końcowych (MDA) produktów peroksydacji kwasów tłuszczowych. W regulację poziomu produktów peroksydacji lipidów mogą być zaangażowane GST i GSH-Px. Pod wpływem Ni w liściach siewek ogórka dochodzi do zmian w profilu fosfolipidów, przy czym największy wzrost zawartości wykazał PA. Dochodzi także do wzrostu stopnia nienasycenia fosfolipidów, co wynika głównie ze zwiększenia zawartości kwasów 18:1 i 18:2. Podwyższenie stopnia nienasycenia błon prowadzi do zwiększenia ich przepuszczalności, co potwierdza zwiększony wyciek elektrolitów z komórek liści. Opisane powyżej zmiany są z reguły bardziej nasilone w liściu I, który akumuluje około 2-krotnie więcej Ni niż liść I.

5.3. Wpływ Ni na zawartość i profil związków fenolowych

Metabolizm związków fenolowych odgrywa ważną rolę w dostarczaniu związków aromatycznych, związków uczestniczących w obronie roślin, chemicznych atraktantów lub repelentów a także związków budujących strukturę komórek [Jun i wsp., 2018]. Zawartość fenoli zmienia się w roślinach w zależności od wieku, gatunku, rodzaju tkanki, pory roku czy rodzaju stresu i czasu jego oddziaływania na rośliny [Kisa i wsp., 2019]. Czynniki środowiskowe mogą wpływać na syntezę i profil związków fenolowych, zwiększając lub zmniejszając ich poziom w roślinach. Rola związków fenolowych w odpowiedzi na biotyczne czynniki stresowe, takie jak roślinożercy czy mikroorganizmy, jest dość dobrze poznana. Wiadomo również, że stresy abiotyczne takie jak susza, zasolenie czy metale ciężkie modyfikują profil związków fenolowych, jednak bliższe poznanie roli związków fenolowych w reakcji roślin na stres wywoływany przez metale ciężkie wymaga dalszych badań.

W niniejszej pracy, stosując tradycyjną metodę kolorymetryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu wykazano, że stres Ni powoduje zwiększenie całkowitej zawartości związków fenolowych w liściach siewek ogórka, nieco większy po krótszym czasie traktowania. W korzeniach, które w porównaniu do liści charakteryzowały się niższą konstytutywną całkowitą zawartością związków fenolowych, po traktowaniu Ni obserwowano spadek ich ilości. Wzrostowi zawartości fenoli w liściach ogórka towarzyszył znaczny wzrost aktywności peroksydaz klasy III: GPOX i SPOX, które wykorzystują fenole jako substraty w reakcji redukcji nadtlenku wodoru. Jedynie w liściu II siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania obserwowano spadek aktywności SPOX. Większy wzrost aktywności peroksydaz klasy III odnotowano w liściu I, który w porównaniu do liścia II charakteryzował się większą akumulacją H_2O_2 i związków fenolowych. W korzeniach, mimo spadku zawartości fenoli

obserwowano wzrost aktywności zarówno GPOX jak i SPOX, jednak mniejszy w porównaniu do liści.

Dane literaturowe wskazują, że nie ma jednakowych tendencji zmian zawartości fenoli w tkankach roślinnych po traktowaniu Ni. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w pracy, w przypadku rumianku poddanego działaniu Ni stwierdzono wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych tylko w korzeniach, natomiast w liściach Ni nie obserwowano istotnych zmian ich zawartości [Kováčik i wsp., 2009]. W kwiatach nagietka lekarskiego w wyniku traktowania większymi dawkami Ni nastąpił wzrost całkowitej zawartości fenoli, natomiast po zastosowaniu niższych stężeń metalu obserwowano jej spadek [Sobati-Nasab i wsp., 2021]. Zmiany całkowitej zawartości związków fenolowych wykazano również w przypadku zastosowania innych metali. Aplikacja miedzi do podłoża spowodowała spadek zawartości związków fenolowych w korzeniu cynii [Tugbaeva i wsp., 2022] oraz w liściach pomidora [Kisa i wsp., 2019].

Zmiany zawartości związków fenolowych mogą wynikać ze zmian w aktywności enzymów uczestniczących w ich syntezie takich jak PAL czy dehydrogenaza kwasu szikimowego [Kováčik i wsp., 2009; Kisa i wsp., 2019]. Spośród enzymów zaangażowanych w biosyntezę związków fenolowych w pracy oznaczono aktywność PAL, która jest pierwszym enzymem w szlaku fenylopropanoidowym oraz biosyntezie flawonoidów. Katalizuje nieoksydacyjną eliminację amoniaku z L-fenyloalaniny, w wyniku czego powstaje kwas *trans*-cynamonowy będący prekursorem w biosyntezie różnych metabolitów wtórnych [Jańczak-Pieniążek i wsp., 2023]. Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że nikiel nie powoduje istotnych zmian aktywności PAL w liściach siewek ogórka. W korzeniu natomiast stwierdzono spadek aktywności PAL, co może być związane ze spadkiem całkowitej zawartości związków fenolowych w tym organie. W oparciu o dane literaturowe można stwierdzić, że zmiany aktywności PAL mogą różnić się w zależności od rodzaju metalu i jego dawki a także organu i odmiany rośliny. W przeciwieństwie do wyników przedstawionych w pracy potraktowanie roślin rumianku Ni spowodowało wzrost aktywności PAL w korzeniu, ale tylko przy najwyższym stężeniu Ni (120 μ M), natomiast w części nadziemnej taki efekt był obserwowany już przy o połowę mniejszej dawce Ni [Kováčik i wsp., 2009]. Podobnie, w przypadku kultur zawieszinowych korzeni żeń-szenia przy niższych stężeniach Cu nie obserwowano istotnych zmian aktywności PAL, natomiast zastosowanie wyższych dawek Cu spowodowało wzrost aktywności enzymu [Ali i wsp., 2006]. Wyniki otrzymane przez Jańczak-Pieniążek i wsp., [2023] wskazują, że wpływ metalu ciężkiego na aktywność PAL zależy nie tylko od jego dawki, ale może być

również specyficzny odmianowo. Cytowani autorzy stwierdzili, że ta sama dawka Pb w liściach jednej odmiany pszenicy powoduje wzrost a u innej spadek aktywności PAL. Z kolei badania przeprowadzone na jatrofie przeczyszczającej (*Jatropha curcas*) traktowanej Cr, Cd i Pb wykazały przeciwne tendencje zmian aktywności PAL w liściach i korzeniach. W liściach aktywność tego enzymu obniżyła się, natomiast w korzeniach znacznie wzrosła [Devi Chinmayee i wsp., 2014].

W celu przeprowadzenia dokładniejszej analizy profilu związków fenolowych wykonano analizę HPLC wybranych metabolitów w liściu I oraz korzeniu siewek ogórka po 2 tygodniach traktowania Ni. Profile związków fenolowych dla liścia I i korzenia roślin kontrolnych różniły się od siebie. Biorąc pod uwagę kwasy fenolowe to większą ich różnorodność stwierdzono w korzeniu, który charakteryzował się jednocześnie ich wyższą konstytutywną zawartością. Wiele wolnych kwasów fenolowych takich jak kwas protokatechowy, α - i β -rezorcynowy, *o*-kumarowy, syryngowy, synapinowy oraz rozmarynowy występujące w korzeniu, nie zostały wykryte w liściu I siewek ogórka. Wyższa konstytutywna zawartość kwasów fenolowych w korzeniu może wskazywać na większe zapotrzebowanie na te metabolity właśnie w tym organie. Przeciwnie do wyników przedstawionych w pracy u rumianku większe stężenie kwasów fenolowych odnotowano w liściach [Kováčik i wsp., 2009].

W wyniku aplikacji Ni stwierdzono wzrost zawartości wielu kwasów fenolowych, głównie w korzeniu siewek ogórka. W korzeniu odnotowano istotny wzrost zawartości kwasu protokatechowego, α - i β -rezorcynowego, *o*-kumarowego, syryngowego, synapinowego, a także kwasu chlorogenowego, *trans*-cynamonowego, elagowego czy *p*-kumarowego. Dane literaturowe potwierdzają, że aplikacja Ni powoduje wzrost zawartości kwasów fenolowych takich jak kwas protokatechowy, *p*-hydroksybezoesowy, wanilinowy, syryngowy, chlorogenowy *o*- i *p*-kumarowy, a także ferulowy w korzeniu rumianku [Kováčik i wsp., 2009]. Podobne wyniki uzyskano także w rumianku po 7 dniach traktowania Cu oraz Cd [Kováčik i Klejdus, 2008]. Odmienne wyniki, tj. spadek zawartości kwasu wanilinowego, chlorogenowego oraz benzoesowego wykazano w roślinach pomidora traktowanych Cu, Cd oraz Pb [Kisa i wsp., 2019].

W wyniku traktowania Ni pojawiły się nowe związki, nieobecne w kontroli, na przykład w korzeniu była to hesperytna, a w liściu kwas galusowy i *trans*-3-hydroksycynamonowy. Pojawienie się tych związków może świadczyć o ich zaangażowaniu w odpowiedzi na stres Ni. Podobnie, zmiany jakościowe w profilu związków fenolowych związane z pojawieniem się

nowych związków stwierdzono w traktowanych Cd sadzonkach borówki amerykańskiej [Manquían-Cerda i wsp., 2016]. W odpowiedzi na traktowanie tym metalem wykazano pojawienie się w nich nowych metabolitów takich jak kwas wanilinowy oraz luteolina. Indukowane metalem zmiany w profilu związków fenolowych mogą dotyczyć również zaniku metabolitów występujących w roślinach kontrolnych. W korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni nie została wykryta luteolina, obecna w kontroli. W przypadku borówki amerykańskiej po traktowaniu Cd stwierdzono zanik kwasu galusowego i synapinowego. [Manquían-Cerda i wsp., 2016].

Sugeruje się, że zwiększona biosynteza związków fenolowych w roślinach poddanych działaniu metali ciężkich pomaga chronić je przed stresem oksydacyjnym [Jańczak-Pieniążek i wsp., 2023]. Mogą one działać jako czynniki redukujące, hamujące reakcje utleniania poprzez oddawanie elektronów lub atomu wodoru innym wolnym rodnikom przekształcając je w produkty stabilne [De Araújo i wsp., 2014]. Badania *in vitro* wykazały, że flawonoidy mogą bezpośrednio wychwytywać RTF takie jak H_2O_2 , $HO^\bullet$, 1O_2 czy $LOO^\bullet$ [Michalak, 2006]. Dodatkową ochroną przed stresem oksydacyjnym jest chelatowanie metali ziem przejściowych. W znacznym stopniu ogranicza to występowanie reakcji Fentona i tym samym powstawanie $HO^\bullet$ [De Araújo i wsp., 2014].

Właściwości przeciwutleniające związków fenolowych są związane z budową chemiczną tych związków, w tym z obecnością pierścienia benzenowego oraz jego podstawników. Obecność pierścienia benzenowego stabilizuje cząsteczkę przeciwutleniacza [Zeb, 2020]. Istotne znaczenie w potencjale antyoksydacyjnym związków fenolowych ma liczba i pozycja grup hydroksylowych [Chen i wsp., 2020]. Związki fenolowe różnią się między sobą pod względem właściwości przeciwutleniających. Wykazano, że flawonoidy mają wyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu z kwasami fenolowymi [Zhang i Tsao, 2016]. Flawonole takie jak kwercetyna zawierające pięć grup hydroksylowych wykazują wysokie zdolności przeciwutleniające [Tsao, 2010]. Aktywność przeciwutleniająca i przeciwrodnikowa kwasów fenolowych jest również dodatnio skorelowana z liczbą grup hydroksylowych związanych z pierścieniem aromatycznym. Silny potencjał antyoksydacyjny wykazywały kwasy fenolowe z trzema grupami hydroksylowymi związanymi z pierścieniem aromatycznym w pozycji orto [Syta i wsp., 2013]. Stwierdzono, że kwas cytrynowy lub jego pochodne wykazują wyższą aktywność przeciwutleniającą niż kwas benzoowy i jego pochodne. Podobnie, obecność grup hydroksylowych w pozycji orto i/lub para zwiększa aktywność antyoksydacyjną, w porównaniu z obecnością tych grup w pozycji meta i niepodstawionym fenolem [Göçer i Gülçin, 2011].

Antyoksydacyjne właściwości związków fenolowych wynikają także z faktu, że stanowią one substrat dla peroksydaz. Peroksydazy wykorzystujące związki fenolowe można podzielić na rozpuszczalne i związane ze ścianą komórkową. Uważa się, że POX związane ze ścianą komórkową biorą udział w utlenianiu monomerów ligniny dostarczając utlenionych substratów do ich tworzenia. Rola rozpuszczalnych POX w roślinach jest głównie związana z pełnieniem przez nie funkcji antyoksydacyjnej. Wykorzystują fenole jako substraty do redukcji H_2O_2 i w związku z tym uczestniczą w regulacji poziomu tej RFT. Potwierdzono, że związki fenolowe, zwłaszcza flawonole i fenylopropanoidy wakuoli i apoplastu mogą stanowić donory elektronów dla peroksydaz fenolowych [Michalak, 2006]. Pomimo tego, że związki fenolowe są silnymi przeciwutleniaczami, to w pewnych warunkach mogą działać jako prooksydanty. Kiedy cząsteczka fenolu traci elektron lub działa jako reduktor sama staje się rodnikiem, choć względnie stabilnym. Tworzone rodniki fenoksyłowe mogą stać się zatem prooksydantami i wykazywać działanie cytotoksyczne ze względu na ich zdolność do inicjowania reakcji łańcuchowych. Taka sytuacja może mieć miejsce w reakcji związków fenolowych z RFT, a także z jonami metali ziem przejściowych o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym [Bouayed i Bohn, 2010; Zhang i Tsao, 2016].

Stwierdzono, że jony metali mogą wpływać na charakter fenoli *in vivo* zmieniając czas życia rodników fenoksyłowych. W normalnych warunkach fizjologicznych rodniki te nie wykazują szkodliwego działania i ulegają regeneracji do fenoli na drodze nieenzymatycznej w reakcji z askorbinianem [Michalak, 2006]. Uważa się, że możliwe jest także działanie reduktazy monodehydroaskorbinianowej w redukcji rodników fenoksyłowych w celu przywrócenia statusu redoks fenoli [Sakihama i wsp., 2000].

Uważa się, że związki fenolowe spełniają funkcje antyoksydacyjne również wobec wodoronadtlenków lipidowych czyli bezpośrednich produktów peroksydacji lipidów. Sugeruje się, że jony metali rozkładają wodoronadtlenki lipidów poprzez rozszczepienie wiązania O-O, w wyniku czego powstają rodniki alkoksyłowe, a związki fenolowe mogą hamować peroksydację lipidów poprzez wychwytywanie rodników alkoksyłowych. Ponadto uważa się, że związki fenolowe (zwłaszcza flawonoidy) mogą zmieniać kinetykę peroksydacji lipidów poprzez modyfikację kolejności upakowania lipidów, stabilizują błony poprzez zmniejszenie jej płynności oraz utrudniają dyfuzję wolnych rodników [Michalak, 2006]. Verstraeten i wsp. [2003] stwierdzili, że flawanole i procyanidyny mogą oddziaływać z fosfolipidami błonowymi poprzez wiązanie wodorowe z polarnymi głowami fosfolipidów, a w konsekwencji gromadzić się na powierzchni błon. Dzięki temu pomagają zachować integralność błon i zapobiegają

potencjalnym uszkodzeniom oksydacyjnym błony. Do najważniejszych fenolowych przeciwutleniaczy zaangażowanych w ochronę przed peroksydacją lipidów błonowych zalicza się kwas chlorogenowy [Kováčik i Klejdus, 2008]. Wykazany w niniejszej pracy prawie 4-krotny wzrost zawartości kwasu chlorogenowego w korzeniu siewek ogórka traktowanych Ni wraz z niezmiennym stężeniem MDA po 2 tygodniach traktowania Ni może potwierdzać pełnienie przez niego takiej roli.

Zaangażowanie związków fenolowych w ochronę roślin przed toksycznym działaniem metali może wynikać z ich zdolności do chelatowania metali [Chen i wsp., 2020]. Zdolność chelatowania metali przez związki fenolowe może być związana z silnym charakterem nukleofilowym pierścienia aromatycznego [Kisa i wsp., 2016]. Lavid i wsp. [2001] stwierdzili, że wzrost stężenia chromu w kłączach lilii wodnej spowodował zwiększone wiązanie metalu przez polifenole. Autorzy sugerują, że zaangażowane w ten proces mogą być dwa mechanizmy. Jony metali trójwartościowych takie jak żelazo, chrom czy glin mogą wiązać się specyficznie z polifenolami, natomiast jony metali dwuwartościowych jak kadm, mangan czy rtęć mogą tworzyć tlenki lub inne nierozpuszczalne związki ulegające precypitacji, które są następnie wychwytywane i unieruchamiane w spolimeryzowanych polifenolach. Fernandez i wsp. [2002] wykazali, że kwercetyna, myricetyna, luteolina, naryngenina oraz katechina tworzyły kompleksy z jonami miedzi i żelaza. Obserwowany w niniejszej pracy spadek zawartości luteoliny i naryngeniny w korzeniu, a także naryngeniny i katechiny w liściu może sugerować wykorzystanie tych metabolitów do chelatowania niklu.

Związki fenolowe stanowią ważny składnik strukturalny ściany komórkowej komórek roślin, a proces lignifikacji może służyć utworzeniu bariery ochronnej mającej ograniczać wnikanie metalu do tkanek [Roitto i wsp., 2005]. Kwasy *p*-kumarowy, ferulowy oraz synapinowy są prekursorami alkoholi odpowiednio *p*-kumarylowego, koniferulowego oraz synapylowego, a te z kolei stanowią bezpośrednie substraty dla peroksydazy, która utlenia je do polimeryzujących później form rodnikowych [Sytar i wsp., 2013]. Wykazany w korzeniach siewek ogórka traktowanych Ni 10-krotny wzrost zawartości kwasu ferulowego i 8-krotny wzrost kwasu *p*-kumarowego, któremu towarzyszył wzrost aktywności SPOX może sugerować, że w badanych roślinach dochodzi do intensyfikacji procesu lignifikacji.

Związki fenolowe mogą występować w roślinie w formie wolnych związków, bądź mogą być spolimeryzowane albo połączone z innymi składnikami fenolowymi lub niefenolowymi, takimi jak węglowodany [Vargas-Madriz i wsp., 2020]. Na ogół występują w roślinach w postaci

O- glikozydów i są zwykle związane z cukrem poprzez grupę hydroksylową w pozycji C3 lub C7. Najpowszechniejszymi cukrami związanymi z fenolowym aglikonem są D-glukoza i L- ramnoza [De Araújo i wsp., 2014].

Na podstawie analizy HPLC związków fenolowych przeprowadzonej z wykorzystaniem ekstraktów poddanych i nie poddanych hydrolizie wykazano, że niektóre kwasy fenolowe, takie jak synapinowy, wanilinowy czy α -rezorcynowy występują w korzeniach siewek ogórka głównie w formie wolnej. Stwierdzono również, że kwas galusowy w liściu występuje wyłącznie w formie związanej, natomiast w korzeniu głównie w formie wolnej.

Mazel i Levine [2002] stwierdzili, że u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) RFT indukują ekspresję genu UDP-glukozylotransferazy. Podwyższone poziomy glukozylotransferaz skutkują przyspieszoną glukozylacją fenylopropanoidów, a tym samym mogą przyczyniać się do akumulacji kwasów fenolowych poprzez transport ich glikozydów z cytoplazmy do wakuoli [Kováčik i wsp., 2008]. Można opisany mechanizm powiązać z obserwowanym w pracy większym wzrostem związanych kwasów fenolowych takich jak kwas galusowy i *p*-kumarowy w liściu, a także *o*-kumarowy i 4-hydroksybenzoesowy w korzeniu roślin ogórka traktowanych Ni, w porównaniu z wolnymi kwasami fenolowymi.

Podsumowując, Ni spowodował wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych w liściach ogórka, silniejszy w liściu I oraz po krótszym czasie traktowania. Wzrostowi zawartości związków fenolowych w liściach towarzyszył znaczny wzrost aktywności peroksydaz klasy III, co może sugerować udział fenoli w enzymatycznym, katalizowanym przez POX usuwaniu H₂O₂ gromadzącego się w tych organach. W korzeniach natomiast zawartość związków fenolowych ulegała redukcji, co może być związane ze spadkiem aktywności PAL, enzymu uczestniczącego w ich wytwarzaniu. Zarówno w przypadku całkowitej zawartości związków fenolowych jak i aktywności PAL w korzeniu zmiany były silniejsze po dłuższym czasie ekspozycji na działanie Ni.

Biorąc pod uwagę wyniki analizy HPLC można stwierdzić, że w profilu związków fenolowych liścia I i korzenia ogórka znaczny udział mają kwasy fenolowe oraz flawonoidy. Korzenie charakteryzują się wyższym konstytutywnym poziomem kwasów fenolowych oraz większą ich różnorodnością. Przeciwnie, w liściu I odnotowano wyższy niż w korzeniu poziom flawonoidów. Około 50% wykrytych związków fenolowych występowało w formie związanej. Ekspozycja siewek ogórka na działanie Ni spowodowała modyfikacje profilu związków fenolowych w liściu I i korzeniu polegające na zmianie zawartości poszczególnych związków,

jak również na zanikaniu czy pojawianiu się nowych, nieobecnych w kontroli związków fenolowych. W obydwu badanych organach Ni spowodował wzrost zawartości wolnych kwasów fenolowych i nasilił proces ich uwalniania z postaci związanej. W liściu I zawartość flawonoidów wolnych nie zmieniała się po traktowaniu Ni, natomiast wzrosła zawartość ich form związanych. W korzeniach siewek traktowanych Ni zawartość flawonoidów uległa obniżeniu.

5.4. Wpływ Ni na metabolizm azotu

Metabolizm azotu jest fundamentalnym procesem fizjologicznym w roślinach, a pierwiastek ten jest makroelementem niezbędnym do wzrostu i prawidłowego funkcjonowania roślin [Rizwan i wsp., 2022]. Sugeruje się, że Ni wpływa niekorzystnie na całkowitą zawartość azotu w roślinach. Wykazano, że Ni powoduje zmniejszenie całkowitej zawartości azotu w soczewicy [Saad i wsp., 2016].

Ekspozycja siewek ogórka na działanie Ni spowodowała istotny spadek zawartości jonów azotanowych w liściach, większy w przypadku liścia I, natomiast w korzeniach nie zaobserwowano istotnych zmian zawartości tego parametru. Spowodowany stresem Ni spadek jonów azotanowych stwierdzono również w liściu sałaty [Hosseini i Khoshgoftarmanesh, 2013], ryżu [Rizwan i wsp., 2022] oraz cebuli [Alibakhshi i Khoshgoftarmanesh, 2015].

W odpowiedzi na stres Ni w liściach siewek ogórka nastąpił spadek stężenia jonów NO_3^- , natomiast w korzeniach nie zmienił się istotnie. Mogło to wynikać ze zmniejszonego pobierania NO_3^- przez korzenie i jednocześnie zaburzony transport tych jonów z korzeni do części nadziemnej [Gajewska i Skłodowska, 2009; Mishra i Dubey, 2011]. Zarówno pobieranie, jak i transport azotanów do komórek zależą od energii metabolicznej, która jest wykorzystywana do polaryzacji błony komórkowej, a główną rolę w tym procesie odgrywa pompa protonowa H^+ -ATPaza. Hamowanie wychwytu NO_3^- przez nikiel może wynikać z działania tego metalu na pompę protonową oraz na nośnik symportu H^+/NO_3^- . Białka układu wychwytu NO_3^- zawierają grupy SH, przez co są wrażliwe na metale ciężkie, w tym Ni [Matraszek, 2008]. Feil i wsp. [2023] wykazali, że nadmierne stężenie Cu w podłożu powoduje istotne zmniejszenie szybkości pobierania jonów NO_3^- .

W przeciwieństwie do uzyskanych wyników oraz przytoczonej literatury istnieją również doniesienia o wzroście zawartości jonów NO_3^- po traktowaniu Ni, co stwierdzono w liściach

trzciny cukrowej [Rampazzo i wsp., 2022], czy w wyniku działania Cu w liściu pomidora [Chaffei i wsp., 2004].

Enzymem wykorzystującym jony azotanowe jako substraty jest reduktaza azotanowa. W pracy stwierdzono spadek aktywności tego enzymu w korzeniach siewek ogórka traktowanych Ni oraz w liściu II po 3 tygodniach traktowania metalem. W liściu II 2-tygodniowych siewek ogórka traktowanych Ni odnotowano natomiast znaczny wzrost aktywności NR. Większość danych literaturowych potwierdza indukowane Ni hamowanie aktywności NR, co zostało wykazane w liściach bazylii [Georgiadou i wsp., 2018], dyni [Valivand i Amooaghaie, 2021] oraz ryżu [Rizwan i wsp., 2022], a także korzeniu pszenicy [Gajewska i wsp., 2009] i ryżu [Mishra i Dubey, 2011]. Spadek aktywności NR stwierdzono, także w przypadku innych metali takich jak chrom [Sangwan i wsp., 2014] czy kadm [Chaffei i wsp., 2004; Dguimi i wsp., 2019]. Istnieją jednak doniesienia, że aplikacja Ni powoduje również wzrost aktywności NR w liściu trzciny cukrowej [Rampazzo i wsp., 2022], cebuli [Alibakhshi i Khoshgoftarmanesh, 2015], a także korzeniu pomidora [Zhang i wsp., 2022]. Obniżenie aktywności tego indukowanego substratem enzymu po traktowaniu roślin metalami ciężkimi, w tym Ni, może być wynikiem ograniczenia dostępności jonów azotanowych [Gajewska i wsp., 2009]. Taką zależność obserwowano jedynie w liściu II po 3 tygodniach traktowania Ni. Jednak w korzeniu siewek ogórka nie stwierdzono istotnych zmian stężenia azotanów, więc obserwowany spadek aktywności NR nie mógł wynikać ze zmniejszonej dostępności substratu, a może raczej z bezpośredniego hamowania tego enzymu przez Ni w tym organie. Uważa się, że zmniejszenie aktywności NR w roślinach poddanych działaniu Ni może być także spowodowane spadkiem syntezy białka NR, bezpośrednim oddziaływaniem metalu na enzym, bądź indukcją proteaz, a w konsekwencji zwiększonym tempem jego degradacji czy fosforylacją potranslacyjną białka [Mishra i Dubey, 2011]. Hamowanie aktywności NR może być również spowodowane oksydacyjnym uszkodzeniem białka enzymu NR przez H_2O_2 . Analiza ekspresji genu NR-2 po 2 tygodniach traktowania Ni wykazała ponad 9-krotny wzrost ekspresji tego genu w liściu I, co wskazuje, że białko to było syntetyzowane, natomiast nie wykazywało zwiększonej aktywności. Sugeruje się, że powodowane stresem metali ciężkich zmniejszenie aktywności NR może być związane z bezpośrednim oddziaływaniem metalu z grupami $-SH$ obecnymi w centrum aktywnym tego enzymu [Sharma i Dubey, 2005; Xiong i wsp., 2006]. Badania *in vitro* wykonane przez Sharma i Dubey [2005] wykazały, że dodatek Ni do mieszaniny reakcyjnej nie tylko zmniejsza aktywność NR, ale także znacząco obniża powinowactwo tego enzymu do jonów NO_3^- . Autorzy ci stwierdzili również, że enzym NR jest wrażliwy

na obecność H_2O_2 . Spadek aktywności NR w liściu II siewek ogórka traktowanych Ni może zatem być związany ze zwiększoną generacją H_2O_2 , którą obserwowano w liściach. Możliwe, że podobny mechanizm hamowania aktywności NR działa również w korzeniu, jednak zawartość H_2O_2 w tych organach nie była oznaczana. Wzrost stężenia tej RFT w odpowiedzi na stres Ni stwierdzono w korzeniu ryżu [Rizwan i wsp., 2017] i pszenicy [Gajewska i Skłodowska, 2007].

Pomimo obserwowanego spadku aktywności NR w siewkach ogórka nie stwierdzono zmian aktywności NiR. Reduktaza azotynowa uczestniczy w redukcji jonów azotynowych do amonowych. Jony azotynowe pochodzą głównie z reakcji katalizowanej przez NR, dlatego wydaje się zasadne, aby aktywność NiR podążała za schematem zmian NR, jednak w ogórku nie obserwowano takiej zależności. Stwierdzony w korzeniu spadek zawartości jonów NH_4^+ nie był wynikiem zmian aktywności NiR. Spadek zawartości jonów NH_4^+ może być spowodowany jego wykorzystywaniem ich przez inne enzymy, w tym NADH-GDH, której aktywność znacząco wzrosła w siewkach ogórka traktowanych Ni. W liściach siewek ogórka, pomimo spadku stężenia NO_3^- po traktowaniu Ni, nie stwierdzono obniżenia się zawartości jonów NH_4^+ . Podobnie, w liściach sałaty odmiany Concoistador traktowanej Ni spadkowi stężenia jonów NO_3^- również nie towarzyszyły istotne zmiany zawartości jonów NH_4^+ . [Hosseini i Khoshgoftarmanesh, 2013]. Pomimo braku zmian aktywności NiR w liściach siewek ogórka stwierdzono ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu kodującego ten enzym w liściu II, co może wskazywać na hamowanie aktywności zsyntetyzowanego białka NiR.

Podobnie jak w przypadku NiR, aktywność GS w liściach siewek ogórka traktowanych Ni nie zmieniała się istotnie. Natomiast w korzeniu stwierdzono spadek aktywności GS po dłuższym czasie ekspozycji na metal. Spadek aktywności GS indukowany traktowaniem Ni stwierdzono w korzeniu ryżu [Mishra i Dubey, 2011] i pszenicy [Gajewska i wsp., 2009], a także po traktowaniu roślin kadmem [Chaffei i wsp., 2004; Dguimi i wsp., 2019], chromem [Sangwan i wsp., 2014] oraz miedzią [Güleryüz i wsp., 2015]. Wykryty w korzeniu siewek ogórka spadek aktywności GS może być związany ze spadkiem zawartości jonów NH_4^+ , który w tym samym czasie obserwowano w tym organie. Obserwowane w roślinach poddanych działaniu Ni zmniejszenie aktywności GS może także wynikać z oksydacyjnych modyfikacji tych białek enzymatycznych [Balestrasse i wsp., 2006].

W liściach ogórka stwierdzono występowanie aktywności dwóch form GOGAT: zależnej od NADH oraz ferredoksyny. W całkowitej aktywności GOGAT wykrytej w liściach dominowała

Fd-GOGAT, natomiast NADH-GOGAT stanowiła tylko około 6% - 13%, w zależności od liścia, co jest typowe dla organów fotosyntetyzujących [Esposito, 2016]. Podobnie, w pędach pszenicy wykazano, że aktywność NADH-GOGAT stanowiła tylko 8% całkowitej aktywności tego enzymu [Gajewska i Skłodowska, 2009].

Potraktowanie siewek ogórka Ni spowodowało spadek aktywności Fd-GOGAT w liściu I, co może mieć negatywny wpływ na metabolizm azotu w tych organach [Gajewska i Skłodowska, 2009]. W liściu II nie odnotowano istotnych zmian aktywności tego enzymu. Podobnie jak w przypadku GS zmniejszenie aktywności GOGAT może być spowodowane oksydacyjnymi modyfikacjami białka enzymatycznego [Balestrasse i wsp., 2006]. Ponieważ dodatek Ni do podłoża stymuluje powstawanie RFT w liściach ogórka, to spadek aktywności Fd-GOGAT może w pewnym stopniu być związany z oksydacyjnym uszkodzeniem tego enzymu. W liściu I 2-tygodniowych siewek ogórka nie stwierdzono istotnych zmian ekspresji genu kodującego Fd-GOGAT, natomiast w liściu II odnotowano ponad 9-krotny wzrost ekspresji tego genu. Jednak nie zaobserwowano zależności pomiędzy wzrostem ekspresji genu kodującego enzym a jego aktywnością.

W niniejszej pracy wykazano, że aktywność NADH-GOGAT, w przeciwieństwie do Fd-GOGAT, wzrosła znacznie w liściach siewek ogórka poddanych działaniu Ni. Można zatem przypuszczać, że NADH-GOGAT charakteryzuje się mniejszą wrażliwością na Ni i w warunkach stresu wywoływanego przez ten metal indukcja aktywności NADH-GOGAT może częściowo rekompensować obniżoną aktywność Fd-GOGAT i pełnić istotną rolę w syntezie glutaminianu. Podobny mechanizm stwierdzono w pędach pszenicy poddanej działaniu Ni [Gajewska i Skłodowska, 2009] i roślinach pomidora traktowanych Cd [Chaffei i wsp., 2004].

W korzeniach siewek ogórka gdzie dominującą formę stanowi NADH-GOGAT odnotowano istotny spadek aktywności tego enzymu, co może świadczyć o negatywnym efekcie Ni na pierwotny cykl asymilacji jonów amonowych w tym organie.

Dehydrogenaza glutaminianowa jest szeroko rozpowszechnionym enzymem w roślinach i odgrywa rolę w asymilacji jonów amonowych, zwłaszcza podczas niesprzyjających warunków środowiskowych, w tym skażeniu metalami ciężkimi [Mishra i Dubey, 2011]. Indukcja aktywności dehydrogenazy może być związana z detoksykacją jonów amonowych uwalnianych w odpowiedzi na stres, jak również w uzupełnianiu puli glutaminianu [Jha i Dubey, 2004]. W pracy oznaczano aktywność aminującą NADH-GDH prowadzącą do

powstania glutaminianu oraz deaminującą rozkładającą glutaminian do 2-oksoglutaranu oraz amoniaku. W pracy wykazano znaczny wzrost aktywności NADH-GDH w liściach i korzeniu siewek ogórka poddanych działaniu Ni. Wyniki wskazują, że wzrost aktywności tego enzymu nie jest związany ze zwiększoną akumulacją jonów amonowych pochodzących z redukcji przez NiR. Jony NH_4^+ mogą pochodzić także z innych źródeł, w tym z deamidacji i deaminacji aminokwasów [Gajewska i wsp., 2009]. Kilkukrotne zwiększenie aktywności NADH-GDH w liściach wykazane pod koniec eksperymentu oraz korzeniach może wskazywać na zwiększone zapotrzebowanie na glutaminian w siewkach ogórka. Równocześnie obserwowano także wzrost aktywności deaminującej GDH, jednak nie był on tak znaczny jak wzrost aktywności NADH-GDH. Reakcja deaminacji glutaminianu przez NAD-GDH dostarcza szkielety węglowe dla różnych szlaków metabolicznych, w tym cyklu kwasów trikarboksylowych [Chaffei i wsp., 2004]. Jednoczesne zwiększenie aminującej i deaminującej aktywności GDH wykazano także w pszenicy traktowanej Ni [Gajewska i Skłodowska, 2009], ryżu traktowanym As [Jha i Dubey, 2004] oraz w tytoniu traktowanym Cd [Dguimi i wsp., 2019]. Wykazano, że w roślinach GDH występuje w postaci wielu izoform, z których każda może wykazywać aktywność anaboliczną i kataboliczną w zależności od warunków stresowych. Jha i Dubey [2004] sugerują, że izoformy GDH mogą być różnie indukowane w jednym z dwóch kierunków, w zależności od warunków stresowych czy dostępności jonów amonowych. Dlatego w siewkach ogórka poddanych działaniu Ni niektóre izoformy GDH mogą być indukowane w kierunku asymilacji jonów amonowych, a inne w kierunku deaminacji glutaminianu. Wzrost aktywności GDH obserwowany jest jednocześnie ze zwiększoną ekspresją genu kodującego ten enzym. Stwierdzono 180-krotny wzrost ekspresji genu GDH-2 w liściu I 2-tygodniowych siewek ogórka traktowanych Ni. Obserwowany w siewkach ogórka traktowanych Ni wzrost aktywności GDH, jak również NADH-GOGAT może wskazywać na indukcję tych enzymów w celu skompensowania zmniejszonej aktywności Fd-GOGAT.

Glutaminian ma kluczowe znaczenie w metabolizmie azotu u roślin, ponieważ stanowi substrat w biosyntezie wielu aminokwasów, a także innych związków zawierających azot, również takich, które pełnią funkcje obronne w warunkach stresu wywoływanego przez metale ciężkie, np. niebiałkowych związków tiolowych. Sugerowano, że jako centralny związek pośredni metabolizmu azotu, odgrywa ważną rolę w reakcjach roślin na metale ciężkie, w tym Ni [Bhatia i wsp., 2005]. Oprócz tego, że służy jako substrat do syntezy większości aminokwasów jest prekursorem do tworzenia tripeptydu glutationu, który uważa się za związany z tolerancją roślin na Ni [Gajewska i Skłodowska, 2009]. W niniejszej pracy nie oznaczano zawartości glutationu,

jednak wzrost aktywności enzymów wykorzystujących glutation jako substrat takich jak GST czy GSH-Px może świadczyć o zwiększonej jego syntezie w warunkach stresu Ni. Khan i wsp. [2016] oraz Abd_Allah i wsp. [2019] odnotowali wzrost stężenia glutationu w gorczycy traktowanej Ni, natomiast Israr i wsp. [2011] w siewkach *Sesbania drummondii*. Stwierdzono także wzrost zawartości ogólnej puli niebiałkowych związków tiolowych w siewkach ryżu [Maheshwari i Dubey, 2009] i jęczmienia [Kumar i wsp., 2012] traktowanych Ni. W pracy wykazano spadek zawartości glutaminianu zarówno w korzeniu jak i liściu II siewek ogórka traktowanych Ni, przy czym większą redukcję jego stężenia odnotowano po dłuższej ekspozycji na metal. Podobnie, spadek zawartości glutaminianu odnotowano w liściu i korzeniu pomidora traktowanego kadmem [Chaffei-Haouari i wsp., 2011]. Obserwowany spadek zawartości glutaminianu może być związany z dużym zapotrzebowaniem na ten związek i jego wykorzystaniem jako substrat w innych reakcjach czy procesach zachodzących w warunkach stresu Ni.

Aminotransferazy odgrywają ważną rolę w asymilacji azotu pośrednicząc w syntezie różnych aminokwasów z glutaminianu. Ponieważ jednak reakcje, w których pośredniczą aminotransferazy są odwracalne, enzymy te mogą również uczestniczyć w tworzeniu glutaminianu poprzez przenoszenie grupy aminowej z aminokwasów na 2-oksoglutaran. Uznaje się, że odwracalność reakcji katalizowanych przez aminotransferazy odpowiada za utrzymanie równowagi pomiędzy glutaminianem a 2-oksoglutaranem, a także za względną stabilność stężenia glutaminianu w roślinach [Gajewska i wsp., 2009]. Uważa się, że te enzymy mają niewielki udział w wytwarzaniu glutaminianu w warunkach fizjologicznych, ale stanowią alternatywne źródło tego aminokwasu, uruchamiane w warunkach stresowych [Jha i Dubey, 2004]. Jednak wyniki zaprezentowane w pracy nie wskazują na udział tych enzymów w wytwarzaniu glutaminianu w siewkach ogórka w warunkach stresu Ni. W liściach siewek ogórka nie obserwowano istotnych zmian aktywności AlaAT i AspAT, natomiast w korzeniu odnotowano spadek ich aktywności po 2 tygodniach traktowania. Spadek aktywności aminotransferaz w korzeniu w tym punkcie czasowym nie był związany ze spadkiem stężenia glutaminianu. Podobnie, spadek AlaAT i AspAT odnotowano także w siewkach soi [El- Shintinawy i El-Ansary, 2000] traktowanych Ni. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w pracy i przytoczonych powyżej przykładów dane literaturowe wskazują także na indukowany Ni wzrost aktywności AlaAT oraz AspAT [Gajewska i Skłodowska, 2009].

Podsumowując, Ni ingeruje w metabolizm azotowy siewek ogórka m.in. poprzez ograniczenie pobierania jonów NO_3^- , a także poprzez zmiany w aktywności enzymów uczestniczących

w przemianach azotu. Większy spadek zawartości NO_3^- stwierdzono w liściu I, a dodatkowo efekt ten nasilał się wraz z długością traktowania. Podobnie, obserwowany spadek zawartości glutaminianu również był zależny od czasu traktowania. Zmiany w zawartości NH_4^+ obserwowano tylko w korzeniu, a spadek ich zawartości nie był związany ze zmianami w aktywności NiR. Jony te mogą być wykorzystywane jako substrat przez inne enzymy, np. NADH-GDH, której aktywność znacznie wzrosła w tym organie. Nie stwierdzono zależności pomiędzy zmianami aktywności NR, a aktywnością NiR. Wywołany działaniem Ni spadek aktywności Fd-GOGAT, dominującej formy tego enzymu w liściach, może być częściowo rekompensowany przez wzrost aktywności NADH-GOGAT. Pomimo znacznego wzrostu aktywności NADH-GDH oraz NADH-GOGAT w liściach nie obserwuje się wzrostu zawartości produktu reakcji katalizowanej przez te enzymy, czyli glutaminianu. Jedyną nieinhibowaną przez Ni reakcją prowadzącą do powstania glutaminianu w korzeniach jest ta katalizowana przez NADH-GDH. Spadek zawartości glutaminianu w siewkach ogórka może wskazywać na jego duże zapotrzebowanie i wykorzystywanie w innych reakcjach, m.in. związanych z obroną przed toksycznym działaniem Ni. Aminotranferazy nie uczestniczą w wytwarzaniu glutaminianu w warunkach stresu Ni. W większości przypadków brak jest zależności pomiędzy zmianami aktywności enzymów, a akumulacją Ni w tkankach. Taką zależność stwierdzono w liściach tylko w przypadku aktywności GOGAT oraz GDH.

Nikiel wpływa także na zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm azotowy. Jednak jednoczesny wzrost ekspresji genów i aktywności stwierdzono tylko dla GDH.

6. Wnioski

1. Nikiel wywołuje w siewkach ogórka stres oksydacyjny o czym świadczy wytwarzanie zarówno wczesnych jak i końcowych produktów peroksydacji lipidów.
2. Indukowany przez Ni stres oksydacyjny może wynikać ze znacznej akumulacji O_2^- i H_2O_2 oraz hamującego działania tego metalu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych usuwających te RFT (SOD i CAT).
3. Za usuwanie H_2O_2 w tkankach ogórka w warunkach stresu Ni odpowiedzialne są głównie peroksydazy, zwłaszcza peroksydazy klasy III.
4. Nikiel wywołuje w liściach ogórka modyfikacje fosfolipidów polegające na zmianie zawartości poszczególnych klas tych związków oraz zwiększeniu stopnia ich nienasycenia, co może być przyczyną wzrostu przepuszczalności błon plazmatycznych.
5. Stres Ni powoduje w siewkach ogórka zaburzenia w przebiegu pierwotnego metabolizmu azotu związane zarówno z pobieraniem jak i dystrybucją jonów NO_3^- i NH_4^+ a także ingerencją w aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm azotu.
6. Obserwowany w liściach wzrost aktywności NADH-GOGAT oraz NADH-GDH może kompensować obniżoną aktywność Fd-GOGAT, służąc jako alternatywna droga syntezy glutaminianu w warunkach stresu Ni.
7. Nikiel powoduje modyfikacje profilu związków fenolowych polegające na zmianie zawartości poszczególnych związków, jak również na zanikaniu czy pojawianiu się nowych, nieobecnych w kontroli metabolitów.
8. Odpowiedź siewek ogórka na stres Ni jest organospecyficzna, przy czym większość badanych parametrów w mniejszym stopniu zmieniała się w korzeniu, w porównaniu z liśćmi.
9. Istnienie zależności pomiędzy nasileniem zmian w odpowiedzi na traktowanie Ni a akumulacją tego metalu w liściach stwierdzono tylko w przypadku niektórych parametrów: akumulacji RFT, aktywności SOD, NADH-GOGAT i NADH-GDH, przepuszczalności błon, całkowitej zawartości związków fenolowych i jonów NO_3^- .
10. W większości parametrów oznaczanych w korzeniu można zaobserwować zależność między nasileniem ich zmian a czasem ekspozycji na Ni.

7. Streszczenie

Nikiel (Ni) jest zaklasyfikowany do mikroelementów i w niskich dawkach korzystnie wpływa na wzrost i rozwój roślin. Jednak w nadmiernych stężeniach pierwiastek ten wykazuje działanie fitotoksyczne. Działanie niklu jest wielokierunkowe, jednak uważa się że u podstaw toksyczności tego metalu dla roślin leży wywoływany przez niego stres oksydacyjny, wynikający z zaburzenia równowagi między wytwarzaniem a usuwaniem reaktywnych form tlenu (RFT) przez system antyoksydacyjny. O zaistnieniu stresu oksydacyjnego świadczy obecność w roślinach traktowanych Ni markerów stresu oksydacyjnego takich jak utlenione lipidy czy białka. Fitotoksyczność Ni dla roślin może być także związana z zakłócaniem przebiegu podstawowych przemian metabolicznych. Niekorzystny wpływ Ni na rośliny przejawia się m.in. inhibicją wzrostu i może skutkować znacznym pogorszeniem ilości i jakości plonów roślin uprawnych. Wśród nich szczególnie niską tolerancję na Ni wykazuje ogórek, który jest jednym z najpopularniejszych gatunków warzyw uprawianych na świecie.

Materiał badawczy stanowiły siewki ogórka (*Cucumis sativus*) odmiany Cezar uprawiane metodą hydroponiczną na pożywce Hoaglanda, nie zawierającą Ni (kontrola) bądź z dodatkiem Ni o stężeniu 10 μM . Po 2 i 3 tygodniach do analiz pobierano I i II liść oraz korzeń roślin kontrolnych i traktowanych Ni.

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu Ni na parametry związane ze stresem oksydacyjnym oraz metabolizmem azotu. Właściwe analizy poprzedzone były badaniami podstawowymi mającymi na celu określenie wpływu zastosowanej dawki Ni na parametry wzrostowe siewek ogórka, parametry związane z fotosyntezą, zawartość pierwiastków, w tym Ni. Wpływ Ni na procesy pro- i antyoksydacyjne badano oceniając zawartość wybranych RFT: anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) i nadtlenku wodoru (H_2O_2), poziom wczesnych i końcowych produktów peroksydacji lipidów jako markerów stresu oksydacyjnego, a także aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy askorbinianowej (APX), peroksydazy glutationowej (GSH-Px) oraz peroksydaz klasy III oznaczanych wobec guajakolu (GPOX) i syringaldazyny (SPOX). Ponadto oznaczano aktywność S-transferazy glutationowej (GST), przepuszczalność błon, profil fosfolipidów i stopień ich nienasycenia. Przeprowadzono również analizę profilu związków fenolowych i aktywności amoniakolizazy L-feniloalaniny (PAL). Wpływ Ni na metabolizm azotu monitorowano poprzez analizę aktywności uczestniczących w nim enzymów: reduktazy azotanowej (NR), reduktazy azotynowej (NiR), syntetazy glutaminowej (GS), syntazy glutaminianowej (GOGAT) i dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) oraz analizę

zawartości jonów azotanowych (NO_3^-), amonowych (NH_4^+) oraz kwasu glutaminowego. Wykonano także analizę profilu ekspresji genów dla białek związanych z metabolizmem azotu.

Przeprowadzone badania wykazały, że wywołany działaniem Ni stopień zahamowania wzrostu był zależny od organu rośliny i tylko w przypadku korzenia korelował z akumulacją metalu w tkankach. Nikiel może wpływać negatywnie na fotosyntezę poprzez obniżenie zawartości barwników asymilacyjnych i zmniejszenie wydajności kwantowej fotoukładu II. Obserwowany w siewkach ogórka traktowanych Ni wzrost aktywności peroksydazy oznaczanej wobec syringaldazy sugeruje indukcję procesu lignifikacji.

Nikiel wywołał w liściach ogórka akumulację O_2^- i H_2O_2 , która mogła częściowo wynikać z indukowanego działaniem Ni obniżenia aktywności SOD i CAT. W usuwanie H_2O_2 w liściach siewek ogórka w warunkach stresu Ni zaangażowane są głównie APX i peroksydazy klasy III. Nikiel wywołuje w liściach ogórka oksydacyjne uszkodzenia lipidów, na co wskazuje wzrost zawartości wczesnych (wodorotlenki kwasów tłuszczowych i ich pochodne) i końcowych (MDA) produktów ich peroksydacji. W regulację poziomu produktów peroksydacji lipidów mogą być zaangażowane GST i GSH-Px. Pod wpływem Ni w liściach siewek ogórka dochodzi do zmian w profilu fosfolipidów i wzrostu stopnia ich nienasycenia, co może być przyczyną zwiększenia przepuszczalności błon plazmatycznych.

Ekspozycja siewek ogórka na działanie Ni spowodowała modyfikację profilu związków fenolowych w liściu I i korzeniu polegające na zmianie zawartości poszczególnych związków, jak również na zanikaniu czy pojawianiu się nowych, nieobecnych w kontroli związków. W obydwu badanych organach Ni spowodował wzrost zawartości wolnych kwasów fenolowych i nasilił proces ich uwalniania z postaci związanej.

Nikiel ingeruje w metabolizm azotowy siewek ogórka m.in. poprzez ograniczenie pobierania jonów NO_3^- , a także poprzez zmiany w aktywności enzymów uczestniczących w przemianach azotu. Wywołany działaniem Ni spadek aktywności Fd-GOGAT, dominującej formy tego enzymu w liściach, może być częściowo rekompensowany przez wzrost aktywności NADH-GOGAT. Pomimo znacznego wzrostu aktywności NADH-GDH oraz NADH-GOGAT w liściach nie obserwuje się wzrostu zawartości glutaminianu będącego produktem reakcji katalizowanej przez te enzymy. Jedyną nieinhibowaną przez Ni reakcją prowadzącą do powstania glutaminianu w korzeniach jest ta katalizowana przez NADH-GDH. Nikiel wpływa także na zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm azotowy. Jednak jednoczesny wzrost ekspresji genów i aktywności stwierdzono tylko dla GDH.

8. Abstract

Nickel (Ni) is classified as a micronutrient and in low doses has a beneficial effect on plant growth and development. However, in excessive concentrations, this element has a phytotoxic effect. The toxic effect of nickel is multidirectional, however it is believed that phytotoxicity of this metal to plants may be attributed to oxidative stress, resulting from an imbalance between the production and removal of reactive oxygen species (ROS) by the antioxidant system. Oxidative stress in Ni-treated plants is evidenced by the presence of oxidative stress markers such as oxidized lipids or proteins. The phytotoxicity of Ni to plants may also be related to disruption of primary metabolic processes. The unfavorable effect of Ni on plants is manifested, among others, by growth inhibition and may result in a significant deterioration in the yield quantity and quality of crop plants. Among them, cucumber, one of the most popular vegetable species grown in the world, has a particularly low tolerance to Ni.

The research material consisted of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings cv. Cezar grown hydroponically on Hoagland's medium without (control) or with the addition of Ni at the concentration of 10 μM . After 2 and 3 weeks, the first and second leaves and roots of control and Ni-treated plants were collected for analysis.

The main aim of the study was to investigate the effect of Ni on parameters related to oxidative stress and nitrogen metabolism. The main analyzes were preceded by basic research aimed at determining the impact of the applied Ni dose on the growth parameters of cucumber seedlings, parameters related to photosynthesis, and the content of elements, including Ni. The influence of Ni on pro- and antioxidative processes was examined by assessing the content of selected ROS: superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), the level of early and final lipid peroxidation products as markers of oxidative stress, as well as the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GSH-Px) and class III peroxidases determined with guaiacol (GPOX) and syringaldazine (SPOX). Additionally, the activity of glutathione S-transferase (GST), membrane permeability, phospholipid profile and the degree of phospholipid unsaturation were determined. The profile of phenolic compounds and the activity of L-phenylalanine ammonialyase (PAL) were also analyzed. The effect of Ni on nitrogen metabolism was monitored by analyzing the activity of the enzymes involved: nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH) and by analyzing nitrate ions (NO_3^-), ammonium ions (NH_4^+) and

glutamic acid contents. Gene expression profile analysis for proteins related to nitrogen metabolism was also performed.

It has been shown that the degree of growth inhibition caused by Ni exposure depended on the plant organ but only in the case of the root it correlated with the accumulation of the metal in the tissues. Nickel may negatively affect photosynthesis by reducing the content of photosynthetic pigments and reducing the quantum yield of photosystem II. The increase in peroxidase activity determined with syringaldazine observed in Ni-treated cucumber seedlings suggests the induction of the lignification process.

Nickel caused the accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 in cucumber leaves, which could be partially due to the Ni-induced reduction of SOD and CAT activity. APX and class III peroxidases are mainly involved in the removal of H_2O_2 in the leaves of cucumber seedlings under Ni stress. Nickel causes oxidative damage to lipids in cucumber leaves, as evidenced by an increase in the content of early (fatty acid hydroxides and their derivatives) and final (MDA) lipid peroxidation products. GST and GSH-Px may be involved in regulating the level of lipid peroxidation products. Nickel induces changes in the profile of cucumber leaf phospholipids and an increase in their unsaturation degree, which may result in an increase in the plasma membrane permeability.

Exposure of cucumber seedlings to Ni resulted in modifications of the phenolic compounds profile in the 1st leaf and root, consisting in changes in the content of individual compounds, as well as the disappearance or appearance of new compounds, not present in the control. In both tested organs, Ni increased the content of free phenolic acids and intensified the process of their release from the bound form.

Nickel interferes with the nitrogen metabolism of cucumber seedlings, among others, by limiting the uptake of NO_3^- ions, as well as by changing the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism. The Ni-induced decrease in the activity of Fd-GOGAT, the dominant form of this enzyme in leaves, may be partially compensated by the increase in NADH-GOGAT activity. Despite a significant increase in the activity of NADH-GDH and NADH-GOGAT in the leaves, there was no increase in the content of glutamate, which is the product of reactions catalyzed by these enzymes. In the roots reaction catalyzed by NADH-GDH was the only not inhibited by Ni source of glutamate. Nickel also induces changes in the expression of genes encoding enzymes involved in nitrogen metabolism. However, a concomitant increase in gene expression and activity was found only for GDH.

9. Literatura

1. Abd_Allah, E.F., Hashem, A., Alam, P., Ahmad, P., 2019. Silicon alleviates nickel-induced oxidative stress by regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants. *J Plant Growth Regul* 38, 1260–1273. Doi: 10.1007/s00344-019-09931-y.
2. Agbaria, H., Heuer, B., Zieslin, N., 1998. Rootstock-imposed alterations in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in leaves of rose plants. *Biol Plant* 41, 85–91.
3. Ahmad, M.S.A., Ashraf, M., 2011. Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 214, 125–167. Doi: 10.1007/978-1-4614-0668-6_6.
4. Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S., 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30, 161–175. Doi: 10.3109/07388550903524243.
5. Alché, J. de D., 2019. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox Biol* 23:101136, 1–11. Doi: 10.1016/j.redox.2019.101136.
6. Ali, A., 2020. Nitrate assimilation pathway in higher plants: Critical role in nitrogen signalling and utilization. *Plant Science Today* 7, 157–163. Doi: 10.14719/PST.2020.7.2.637.
7. Alibakhshi, M., Khoshgoftarmanesh, A.H., 2015. Effects of nickel nutrition in the mineral form and complexed with histidine in the nitrogen metabolism of onion bulb. *Plant Growth Regul* 75, 733–740. Doi: 10.1007/s10725-014-9975-z.
8. Ali, E., Hussain, S., Hussain, N., Kakar, K.U., Shah, J.M., Zaidi, S.H.R., Jan, M., Zhang, K., Khan, M.A., Imtiaz, M., 2022. Tocopherol as plant protector: an overview of tocopherol biosynthesis enzymes and their role as antioxidant and signaling molecules. *Acta Physiol Plant* 44, 1–11. Doi: 10.1007/s11738-021-03350-x.
9. Ali, M.B., Singh, N., Shohael, A.M., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171, 147–154. Doi: 10.1016/j.plantsci.2006.03.005.
10. Almehdi, A., El-Keblawy, A., Shehadi, I., El-Naggar, M., Saadoun, I., Mosa, K.A., Abhilash, P.C., 2019. Old leaves accumulate more heavy metals than other parts of the desert shrub *Calotropis procera* at a traffic-polluted site as assessed by two analytical techniques. *Int J Phytoremediation* 21, 1254–1262. Doi: 10.1080/15226514.2019.1619164.
11. Altaf, M.A., Hao, Y., He, C., Mumtaz, M.A., Shu, H., Fu, H., Wang, Z., 2022. Physiological and biochemical responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings to nickel toxicity. *Front Plant Sci* 13, 1–16. Doi: 10.3389/fpls.2022.950392.
12. Ambrożewicz, E., Bielawska, K., 2016. Karbonylacja białek – przyczyny, skutki i sposoby oceny. *Postepy Biochem* 62, 495–505.
13. Amjad, M., Raza, H., Murtaza, B., Abbas, G., Imran, M., Shahid, M., Naeem, M.A., Zakir, A., Iqbal, M.M., 2020. Nickel toxicity induced changes in nutrient dynamics and antioxidant profiling in two maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Plants* 9, 1–15. Doi: 10.3390/plants9010005.

14. Anjum, N.A., Sharma, P., Gill, S.S., Hasanuzzaman, M., Khan, E.A., Kachhap, K., Mohamed, A.A., Thangavel, P., Devi, G.D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N.A., Misra, A.N., Lukatkin, A.S., Singh, H.P., Pereira, E., Tuteja, N., 2016. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 19002–19029. Doi: 10.1007/s11356-016-7309-6.
15. Anjum, N.A., Sofo, A., Scopa, A., Roychoudhury, A., Gill, S.S., Iqbal, M., Lukatkin, A.S., Pereira, E., Duarte, A.C., Ahmad, I., 2015. Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4099–4121. Doi: 10.1007/s11356-014-3917-1.
16. Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373–399. Doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
17. Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 1–31. Doi: 10.1155/2014/360438.
18. Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643–654. Doi: 10.1080/01904168109362867.
19. Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2006. Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant Soil* 284, 187–194. Doi: 10.1007/s11104-006-0050-z.
20. Bartosz, G., 2013. *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
21. Battilani, P., Lanubile, A., Scala, V., Reverberi, M., Gregori, R., Falavigna, C., Dall’asta, C., Park, Y.S., Bennett, J., Borrego, E.J., Kolomiets, M. V., 2018. Oxylipins from both pathogen and host antagonize jasmonic acid-mediated defence via the 9-lipoxygenase pathway in *Fusarium verticillioides* infection of maize. *Mol Plant Pathol* 19, 2162–2176. Doi: 10.1111/mpp.12690.
22. Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide Gels. *Anal Biochem* 44, 276–287.
23. Beccaccioli, M., Pucci, N., Salustri, M., Scortichini, M., Zaccaria, M., Momeni, B., Loreti, S., Reverberi, M., Scala, V., 2022. Fungal and bacterial oxylipins are signals for intra- and inter-cellular communication within plant disease. *Front Plant Sci* 13:823233, 1–13. Doi: 10.3389/fpls.2022.823233.
24. Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J., 2015. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J Plant Physiol* 176, 192–201. Doi: 10.1016/j.jplph.2014.12.014.
25. Bela, K., Riyazuddin, R., Csiszár, J., 2022. Plant glutathione peroxidases: non-heme peroxidases with large functional flexibility as a core component of ROS-processing mechanisms and signalling. *Antioxidants* 11, 1–18. Doi: 10.3390/antiox11081624.

26. Ben Ammar, W., Nouairi, I., Zarrouk, M., Jemal, F., 2008. The effect of cadmium on lipid and fatty acid biosynthesis in tomato leaves. *Biologia* 63, 86–93. Doi: 10.2478/s11756-008-0002-6.
27. Bernat, P., Gajewska, E., Bernat, T., Wielanek, M., 2014a. Characterisation of the wheat phospholipid fraction in the presence of nickel and/or selenium. *Plant Growth Regul* 72, 163–170. Doi: 10.1007/s10725-013-9848-x.
28. Bernat, P., Gajewska, E., Szewczyk, R., Słaba, M., Długoński, J., 2014b. Tributyltin (TBT) induces oxidative stress and modifies lipid profile in the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 4228–4235. Doi: 10.1007/s11356-013-2375-5.
29. Bhaduri, A.M., Fulekar, M.H., 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Rev Environ Sci Biotechnol* 11, 55–69. Doi: 10.1007/s11157-011-9251-x.
30. Bhatia, N.P., Walsh, K.B., Baker, A.J.M., 2005. Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *J Exp Bot* 56, 1343–1349. Doi: 10.1093/jxb/eri135.
31. Biswas, M.S., Mano, J., 2021. Lipid peroxide-derived reactive carbonyl species as mediators of oxidative stress and signaling. *Front Plant Sci* 12, 1–14. Doi: 10.3389/fpls.2021.720867.
32. Blackburn, M.L., Ketterer, B., Meyer, D.J., Juett, A.M., Bull, A.W., 1997. Characterization of the enzymatic and nonenzymatic reaction of 13-oxooctadecadienoic acid with glutathione. *Chem. Res. Toxicol* 10, 1364–1371. Doi: 10.1021/tx970087a.
33. Bouayed, J., Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3, 228–237. Doi: 10.4161/oxim.3.4.12858.
34. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
35. Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322, 43–54. Doi: 10.1016/S0764-4469(99)80016-X.
36. Caretto, S., Nisi, R., Paradiso, A., de Gara, L., 2010. Tocopherol production in plant cell cultures. *Mol Nutr Food Res* 54, 726–730. Doi: 10.1002/mnfr.200900397.
37. Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157, 1–11. Doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004.
38. Cataldo, D.A., Garland, T.R., Wildung, R.E., 1978. Nickel in Plants II. Distribution and chemical form in soybean plants. *Plant Physiol* 62, 566–570.
39. Cataldo, D.A., Haroon, M.H., Schrader, L.E., Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant Anal* 6, 71–80. Doi: 10.1080/00103627509366547.

40. Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S.P., 2016. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet Mol Biol* 39, 1–6. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109.
41. Chaffai, R., Elhammadi, M.A., Seybou, T.N., Tekitek, A., Marzouk, B., El Ferjani, E., 2007. Altered fatty acid profile of polar lipids in maize seedlings in response to excess copper. *J Agron Crop Sci* 193, 207–217. Doi: 10.1111/j.1439-037X.2007.00252.x.
42. Chaffai, R., Marzouk, B., El Ferjani, E., 2005. Aluminum mediates compositional alterations of polar lipid classes in maize seedlings. *Phytochemistry* 66, 1903–1912. Doi: 10.1016/j.phytochem.2005.06.028.
43. Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H., Masclaux-Daubresse, C., 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol* 45, 1681–1693. Doi: 10.1093/pcp/pch192.
44. Chaffei-Haouari, C., Hajjaji-Nasraoui, A., Carrayol, E., Lelendais, M., Ghorbel, M.H., Gouia, H., 2011. Role of glutamate availability on cadmium induced changes of nitrogen and glutamate in tomato plants (*Solanum lycopersicon*). *Acta Botanica Gallica* 158, 57–69. Doi: 10.1080/12538078.2011.10516254.
45. Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci* 22, 163–174. Doi: 10.1016/j.tplants.2016.12.001.
46. Chen, C., Huang, D., Liu, J., 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean* 37, 304–313. Doi: 10.1002/clen.200800199.
47. Chen, S., Lin, R., Lu, H., Wang, Q., Yang, J., Liu, J., Yan, C., 2020. Effects of phenolic acids on free radical scavenging and heavy metal bioavailability in kandelia obovata under cadmium and zinc stress. *Chemosphere* 249, 1–12. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126341.
48. Chomczyński, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–537.
49. Conn, S., Curtin, C., Bézier, A., Franco, C., Zhang, W., 2008. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *J Exp Bot* 59, 3621–3634. Doi: 10.1093/jxb/ern217.
50. Corpas, F.J., González-Gordo, S., Rodríguez-Ruiz, M., Muñoz-Vargas, M.A., Palma, J.M., 2022. Thiol-based oxidative posttranslational modifications (OxiPTMs) of plant proteins. *Plant Cell Physiol* 63, 889–900. Doi: 10.1093/pcp/pcac036.
51. Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352. Doi: 10.3390/molecules15107313.
52. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A., 2009. Protein S- glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 34, 85–96. Doi: 10.1016/j.tibs.2008.11.002.

53. Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2, 1–13. Doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
54. De Araújo, C.R., Botelho, P.D.S., Da Silva, T.M.S., Maciel, M.I.S., Melo, E.D.A., Ryan, S., Smith, R.E., 2014. Phenolic compounds and metals in tomy Atkins mango (*Mangifera indica* L) peels. *Nat Prod J* 4, 2–7. Doi: 10.2174/221031550401140715094338.
55. Debouba, Mohamed, Gouia, H., Suzuki, A., Ghorbel, M.H., 2006a. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *J Plant Physiol* 163, 1247–1258. Doi: 10.1016/J.JPLPH.2005.09.012.
56. Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M.H., Ghorbel, M.H., Suzuki, A., 2006b. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 409–419. Doi: 10.1016/J.PLAPHY.2006.06.017.
57. Demidchik, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109, 212–228. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
58. Devi Chinmayee, M., Anu, M.Sm.B., Mary Sheeba A., Mini, I., Swapna T.S., 2014. A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol* 8, 58–67. Doi: 10.9790/2402-08735867.
59. Devi, S.R., Prasad, M.N.V. (1999) Membrane Lipid Alterations in Heavy Metal Exposed Plants. W: Prasad M.N.V. i Hagemeyer J. (Red.) Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg, ss.73-98. Doi: 10.1007/978-3-662-07745-0_5.
60. Dguimi, H.M., Alshehri, K., Zaghdoud, C., Albaggar, A.K., Debouba, M., 2019. Effect of cadmium repartition on nitrogen metabolism in tobacco seedlings. *Open Access Library Journal* 6, 1–14. Doi: 10.4236/oalib.1104000.
61. Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 32, 93–101. Doi: 10.1093/jxb/32.1.93.
62. Dietz, K.J., Baier, M., Krämer, U. (1999). Free Radicals and Reactive Species as Mediators of Heavy Metal Toxicity in Plants. W: Prasad M.N.V. i Hagemeyer J. (Red.) Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg, ss. 99-116. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_4.
63. Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Protein family review Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3, 1–10. Doi: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004.
64. Dążkiewicz, M., Baszyński, T., 2010. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73, 982–986. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.02.001.
65. Dronnet, V.M., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A. V, Thibault, J.-F., 1996. Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydr Polym* 30, 253–263. Doi: 10.1016/S0144-8617(96)00107-5.

66. Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jaćević, V., 2021. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Front Plant Sci* 11, 1–13. Doi: 10.3389/fpls.2020.552969.
67. Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., Takáč, T., 2021. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. *Front Plant Sci* 11, 1–24. Doi: 10.3389/fpls.2020.618835.
68. Elloumi, N., Zouari, M., Chaari, L., Jomni, C., Marzouk, B., Ben Abdallah, F., 2014. Effects of cadmium on lipids of almond seedlings (*Prunus dulcis*). *Bot Stud* 55, 1–9. Doi: 10.1186/s40529-014-0061-7.
69. El-Maarouf-Bouteau, H., Meimoun, P., Job, C., Job, D., Bailly, C., 2013. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 4, 1–5. Doi: 10.3389/fpls.2013.00077.
70. El-Shintinawy, F., El-Ansary, A., 2000. Differential effect of Cd^{2+} and Ni^{2+} on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biologia Plantarum* 43, 79–84. Doi: 10.1023/A:1026507114354.
71. Esposito, S., 2016. Nitrogen assimilation, abiotic stress and glucose 6-phosphate dehydrogenase: The full circle of reductants. *Plants* 5, 236–246. Doi: 10.3390/plants5020024.
72. Farooq, M.A., Niazi, A.K., Akhtar, J., Saifullah, Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., Rengel, Z., 2019. Acquiring control: The evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry* 141, 353–369. Doi: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039.
73. Feil, S.B., Zuluaga, M.Y.A., Cesco, S., Pii, Y., 2023. Copper toxicity compromises root acquisition of nitrate in the high affinity range. *Front Plant Sci* 13, 1–9. Doi: 10.3389/fpls.2022.1034425.
74. Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florencio, M.H., Keith, K.R., 2002. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem* 92, 105–111. Doi: 10.1016/S0162-0134(02)00511-1.
75. Fiala, R., Fialová, I., Vaculík, M., Luxová, M., 2021. Effect of silicon on the young maize plants exposed to nickel stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 166, 645–656. Doi: 10.1016/j.plaphy.2021.06.026.
76. Gabbrielli, R., Pandolfini, T., Espen, L., Palandri, M.R., 1999. Growth, peroxidase activity and cytological modifications in *Pisum sativum* seedlings exposed to Ni^{2+} toxicity. *J Plant Physiol* 155, 639–645. Doi: 10.1016/S0176-1617(99)80066-2.
77. Gajewska, E., Bernat, P., Długoński, J., Skłodowska, M., 2012. Effect of nickel on membrane integrity, lipid peroxidation and fatty acid composition in wheat seedlings. *J Agron Crop Sci* 198, 286–294. Doi: 10.1111/j.1439-037X.2012.00514.x.
78. Gajewska, E., Skłodowska, M., 2009. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *J Plant Physiol* 166, 1034–1044. Doi: 10.1016/j.jplph.2008.12.004.
79. Gajewska, E., Skłodowska, M., 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals* 20, 27–36. Doi: 10.1007/s10534-006-9011-5.

80. Gajewska, E., Słaba, M., Andrzejewska, R., Skłodowska, M., 2006. Nickel-induced inhibition of wheat root growth is related to H_2O_2 production, but not to lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* 49, 95–103. Doi: 10.1007/s10725-006-0018-2.
81. Gajewska, E., Wielanek, M., Bergier, K., Skłodowska, M., 2009. Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Physiol Plant* 31, 1291–1300. Doi: 10.1007/s11738-009-0370-8.
82. Gallé, Á., Czékus, Z., Bela, K., Horváth, E., Ördög, A., Csiszár, J., Poór, P., 2019. Plant glutathione transferases and light. *Front Plant Sci* 9, 1–12. Doi: 10.3389/fpls.2018.01944.
83. Georgiadou, E.C., Kowalska, E., Patla, K., Kulbat, K., Smolińska, B., Leszczyńska, J., Fotopoulos, V., 2018. Influence of heavy metals (Ni, Cu, and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Front Plant Sci* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00862>
84. Gerendás, J., Sattelmacher, B., 1999. Influence of ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. *Ann Bot* 83, 65–71. Doi: 10.1006/anbo.1998.0789.
85. Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930. Doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
86. Göbel, C., Feussner, I., Hamberg, M., Rosahl, S., 2002. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim Biophys Acta* 1584, 55–64. Doi: 10.1016/S1388-1981(02)00268-8.
87. Göçer, H., Gülçin, I., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *Int J Food Sci Nutr* 62, 821–825. Doi: 10.3109/09637486.2011.585963.
88. Goldberg, R., Le And, T., Catesson, A.M., 1985. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* 36, 503–510. Doi: 10.1093/jxb/36.3.503.
89. Gopal, R., 2014. Excess nickel modulates oxidative stress responsive enzymes in groundnut. *J Plant Nutr* 37, 1433–1440. Doi: 10.1080/01904167.2014.881872.
90. Griffiths, G., 2015. Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free Radic Res* 49, 565–582. Doi: 10.3109/10715762.2014.1000318.
91. Groat, R.G., Vance, C.P., 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol* 67, 1198–1203. Doi: 10.1104/pp.67.6.1198.
92. Gronwald, J.W., Plaisance, K.L., 1998. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from Sorghum. *Plant Physiol.* 117, 877–892. Doi: 10.1104/pp.117.3.877.
93. Groß, F., Durner, J., Gaupels, F., 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci* 4, 1–15. Doi: 10.3389/fpls.2013.00419.

94. Grzechowiak, M., Sliwiak, J., Jaskolski, M., Ruszkowski, M., 2020. Structural studies of glutamate dehydrogenase (Isoform 1) from *Arabidopsis thaliana*, an important enzyme at the branch-point between carbon and nitrogen metabolism. *Front Plant Sci* 11, 1–17. Doi: 10.3389/fpls.2020.00754.
95. Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K., 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44, 1098–1124. Doi: 10.3109/10715762.2010.498477.
96. Güleriyüz, G., Erdemir, Ü.S., Arslan, H., Akpınar, A., Çiçek, A., Güçer, Ş., 2015. Variation in trace element mobility and nitrogen metabolism of *Verbascum olympicum* Boiss. under copper stress. *Chemistry and Ecology* 31, 494–509. Doi: 10.1080/02757540.2015.1043285.
97. Guo, L., Mishra, G., Markham, J.E., Li, M., Tawfall, A., Welti, R., Wang, X., 2012. Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 8286–8296. Doi: 10.1074/jbc.M111.274274.
98. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15, 129–135. Doi: 10.1016/0968-0004(90)90206-q.
99. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139. Doi: 10.1016/s0021-9258(19)42083-8.
100. Hao, F., Wang, X., Chen, J., 2006. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science* 170, 151–158. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.08.014.
101. Harasim, P., Filipek, T., 2015. Nickel in the environment. *J Elem* 20, 525–534. Doi: 10.5601/jelem.2014.19.3.651.
102. Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 281–296. Doi: 10.1038/nrm.2017.138.
103. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, M.S., Zulfiqar, F., Alam, M.M., Fujita, M., 2020a. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *Int J Mol Sci* 21, 1–44. Doi: 10.3390/ijms21228695.
104. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., Fotopoulos, V., 2020b. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9, 1–52. Doi: 10.3390/antiox9080681.
105. Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I., Chattha, M.B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M.A.U., Khan, T.A., 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 12673–12688. Doi: 10.1007/s11356-019-04892-x.

106. Helaoui, S., Boughattas, I., Hattab, S., Mkhinini, M., Alphonse, V., Livet, A., Bousserhine, N., Banni, M., 2020. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure. *Chemosphere* 249, 1–10. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126121.
107. He, S., He, Z., Yang, X., Baligar, V.C., 2012. Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation. *Advances in Agronomy* 117, 117–189. Doi: 10.1016/B978-0-12-394278-4.00003-9.
108. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42, 462–468. Doi: 10.1093/pcp/pce061.
109. Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347, 1–39.
110. Hodgson, E.K., Fridovich, I., 1975. The use of X-ray diffraction in the study of protein and nucleic acid structure. *Biochemistry* 14, 6–16. Doi: 10.1002/9780470110317.ch4.
111. Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br J Haematol* 25, 563–575. Doi: 10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x.
112. Hosseini, H., Khoshgoftarmanesh, A.H., 2013. The effect of foliar application of nickel in the mineral form and urea-Ni complex on fresh weight and nitrogen metabolism of lettuce. *Sci Hortic* 164, 178–182. Doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.030.
113. Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci* 10, 1–10. Doi: 10.3389/fpls.2019.00800.
114. Huchzermeyer, B., Menghani, E., Khardia, P., Shilu, A., 2022. Metabolic pathway of natural antioxidants, antioxidant enzymes and ROS providence. *Antioxidants* 11, 1–20. Doi: 10.3390/antiox11040761.
115. Iakimova, E.T., Michaeli, R., Woltering, E.J., 2013. Involvement of phospholipase D-related signal transduction in chemical-induced programmed cell death in tomato cell cultures. *Protoplasma* 250, 1169–1183. Doi: 10.1007/s00709-013-0497-8.
116. Imberty, A., Goldberg, R., Catesson, A.M., 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta* 164, 221–226. Doi: 10.1007/BF00396085.
117. Inokuchi, R., Kuma, K.I., Miyata, T., Okada, M., 2002. Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: Phylogenic and physiological perspectives. *Physiol Plant* 116, 1–11. Doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160101.x.
118. Islam, S., Islam, R., Kandwal, P., Khanam, S., Proshad, R., Kormoker, T., Tusher, T.R., 2022. Nitrate transport and assimilation in plants: a potential review. *Arch Agron Soil Sci* 68, 133–150. Doi: 10.1080/03650340.2020.1826042.
119. Israr, M., Jewell, A., Kumar, D., Sahi, S. V., 2011. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *J Hazard Mater* 186, 1520–1526. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.021.

120. Jahan, M.S., Guo, S., Baloch, A.R., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., Ahammed, G.J., Kabir, K., Roy, R., 2020. Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis, secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* 197, 1–12. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110593.
121. Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant* 31, 427–436. Doi: 10.1007/s11738-009-0275-6.
122. Jańczak-Pieniążek, M., Cichoński, J., Michalik, P., Chrzanowski, G., 2023. Effect of heavy metal stress on phenolic compounds accumulation in winter wheat plants. *Molecules* 28, 1–15. Doi: 10.3390/molecules28010241.
123. Jha, A.B., Dubey, R.S., 2004. Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. *Plant Growth Regul* 43, 259–268. Doi: 10.1023/B:GROW.0000045995.49365.df.
124. Jouili, H., Bouazizi, H., Ferjani, E. El, 2011. Plant peroxidases: Biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol Plant* 33, 2075–2082. Doi: 10.1007/s11738-011-0780-2.
125. Jové, M., Mota-Martorell, N., Pamplona, R., Pradas, I., Martín-Gari, M., Ayala, V., 2020. The advanced lipoxidation end-product malondialdehyde-lysine in aging and longevity. *Antioxidants* 9, 1–20. Doi: 10.3390/antiox9111132.
126. Jun, S.Y., Sattler, S.A., Cortez, G.S., Vermerris, W., Sattler, S.E., Kang, C.H., 2018. Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiol* 176, 1452–1468. Doi: 10.1104/pp.17.01608.
127. Kaiser, W.M., Huber, S.C., 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52, 1981–1989. Doi: 10.1093/jexbot/52.363.1981.
128. Kendziorek, M.El., Zagdańska, B.M., 2011. Aminotransferaza alaninowa w roślinach wyższych 3, 533–544.
129. Khaliq, A., Ali, S., Hameed, A., Farooq, M.A., Farid, M., Shakoob, M.B., Mahmood, K., Ishaque, W., Rizwan, M., 2015. Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seedlings through enhancing growth, photosynthesis, and suppressing Ni uptake and oxidative stress. *Arch Agron Soil Sci* 62, 633–647. Doi: 10.1080/03650340.2015.1073263.
130. Khan, A.H.A., Nawaz, I., Qu, Z., Butt, T.A., Yousaf, S., Iqbal, M., 2020. Reduced growth response of ornamental plant *Nicotiana glauca* L. upon selected heavy metals uptake, with co-application of ethylenediaminetetraacetic acid. *Chemosphere* 241, 1–13. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125006.
131. Khan, M.I.R., Khan, N.A., Masood, A., Per, T.S., Asgher, M., 2016. Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard. *Front Plant Sci* 7, 1-20. Doi: 10.3389/fpls.2016.00044.

132. Kidwai, M., Ahmad, I.Z., Chakrabarty, D., 2020. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. *Plant Cell Rep* 39, 1381–1393. Doi: 10.1007/s00299-020-02588-y.
133. Kim, S.C., Guo, L., Wang, X., 2013. Phosphatidic acid binds to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and promotes its cleavage in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 11834–11844. Doi: 10.1074/jbc.M112.427229.
134. Kimura, M., Umemoto, Y., Kawano, T., 2014. Hydrogen peroxide-independent generation of superoxide by plant peroxidase: Hypotheses and supportive data employing ferrous ion as a model stimulus. *Front Plant Sci* 5, 1–10. Doi: 10.3389/fpls.2014.00285.
135. Kisa, D., Elmastaş, M., Öztürk, L., Kayır, Ö., 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Appl Biol Chem* 59, 813–820. Doi: 10.1007/s13765-016-0229-9.
136. Kisa, D., Kayır, O., Sağlam, N., Şahin, S., Öztürk, L., Elmastaş, M., 2019. Changes of phenolic compounds in tomato associated with the heavy metal stress. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences JONAS* 2, 35–43.
137. Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., Gupta, K.J., 2020. An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. *Methods in Molecular Biology* 2057, 1–13. Doi: 10.1007/978-1-4939-9790-9_1.
138. Knieper, M., Viehhauser, A., Dietz, K.J., 2023. Oxylipins and reactive carbonyls as regulators of the plant redox and reactive oxygen species network under stress. *Antioxidants* 12, 1–25. Doi: 10.3390/antiox12040814.
139. Kolton, A., Długosz-Grochowska, O., Wojciechowska, R., Czaja, M., 2022. Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Sci Hort* 291, 1–15. Doi: 10.1016/j.scienta.2021.110561.
140. Kolupaev, Y.E., Horielova, E.I., Yastreb, T.O., Popov, Y. V., Ryabchun, N.I., 2018. Phenylalanine ammonia-lyase activity and content of flavonoid compounds in wheat seedlings at the action of hypothermia and hydrogen sulfide donor. *Ukr Biochem J* 90, 12–20. Doi: 10.15407/ubj90.06.012.
141. Kopcewicz, J., Lewak, S., 2019. *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
142. Kotapati, K.V., Palaka, B.K., Ampasala, D.R., 2017. Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *Crop Journal* 5, 240–250. Doi: 10.1016/j.cj.2016.09.002.
143. Kováčik, J., Grúz, J., Bačkor, M., Tomko, J., Strnad, M., Repčák, M., 2008. Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environ Exp Bot* 62, 145–152. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.07.012.
144. Kováčik, J., Klejdus, B., 2008. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep* 27, 605–615. Doi: 10.1007/s00299-007-0490-9.

145. Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M., 2009. Phenolic metabolism of *Matricaria chamomilla* plants exposed to nickel. J Plant Physiol 166, 1460–1464. Doi: 10.1016/j.jplph.2009.03.002.
146. Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E., 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* Species. Plant Physiol 122, 1343–1353. Doi: 10.1104/pp.122.4.1343.
147. Krapp, A., 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. Curr Opin Plant Biol 25, 115–122. Doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.010.
148. Krieger-Liszkay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. J Exp Bot 56, 337–346. Doi: 10.1093/jxb/erh237.
149. Krzesłowska, M., 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. Acta Physiol Plant 33, 35–51. Doi: 10.1007/s11738-010-0581-z.
150. Kumar, H., Sharma, D., Kumar, V., 2012. Nickel-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in *Barley* roots and leaves. International Journal of Environmental Biology 2, 121–128.
151. Kumar, S., Trivedi, P.K., 2018. Glutathione S-transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. Front Plant Sci 9, 1–9. Doi: 10.3389/fpls.2018.00751.
152. Kumar, S., Wang, M., Liu, Y., Fahad, S., Qayyum, A., Jadoon, S.A., Chen, Y., Zhu, G., 2022. Nickel toxicity alters growth patterns and induces oxidative stress response in sweetpotato. Front Plant Sci 13, 1–17. Doi: 10.3389/fpls.2022.1054924.
153. Kuźniak, E., 2002. Transgenic plants: An insight into oxidative stress tolerance mechanisms. Acta Physiol Plant 24, 97–113. Doi: 10.1007/s11738-002-0027-3.
154. Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O., Tel-Or, E., 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). Planta 212, 323–331. Doi: 10.1007/s004250000400.
155. Lešková, A., Zvarík, M., Araya, T., Giehl, R.F.H., 2020. Nickel toxicity targets cell wall-related processes and PIN2-mediated auxin transport to inhibit root elongation and gravitropic responses in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol 61, 519–535. Doi: 10.1093/pcp/pcz217.
156. L’Huillier, L., D’Auzac, J., Durand, M., Michaud-Ferriere, N., 1996. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars: growth, structure, Ni concentration, and localization. Canadian Journal of Botany 74, 1547–1554. Doi: 10.1139/b96-187.
157. Lin, Y.-C., Kao, C.-H., 2005. Nickel toxicity of rice seedlings: cell wall peroxidase, lignin, and NiSO₄-inhibited root growth. Crop, Environment & Bioinformatics 2, 131–136. Doi: 10.30061/CEB.200506.0005.
158. Liu, X., Ma, D., Zhang, Z., Wang, S., Du, S., Deng, X., Yin, L., 2019. Plant lipid remodeling in response to abiotic stresses. Environ Exp Bot 165, 174–184. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.06.005.

159. Li, Z., Wang, F., Zhao, Q., Liu, J., Cheng, F., 2018. Involvement of NADPH oxidase isoforms in the production of O_2^- manipulated by ABA in the senescing leaves of early-senescence-leaf (esl) mutant rice (*Oryza sativa*). PLoS One 13, 1–17. Doi: 10.1371/journal.pone.0190161.
160. Ludovici, M., Ialongo, C., Reverberi, M., Beccaccioli, M., Scarpari, M., Scala, V., 2014. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis of *Fusarium verticillioides* and maize kernels. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 31, 2026–2033. Doi: 10.1080/19440049.2014.968810.
161. Łukawska-Kuźma, K., Podgórska, A., Rychter, A.M., 2012. Plasma membrane-generated ROS and their possible contribution to leaf cell growth of cucumber (*Cucumis sativus*) MSC16 mitochondrial mutant. Acta Physiol Plant 34, 721–730. Doi: 10.1007/s11738-011-0872-z.
162. Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. Methods Biochem Anal 1, 357–425. Doi: 10.1002/9780470110171.ch14.
163. Maheshwari, R., Dubey, R.S., 2009. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. Plant Growth Regul 59, 37–49. Doi: 10.1007/s10725-009-9386-8.
164. Małecka, A., Tomaszewska, B., 2005. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. Postępy biologii komórki 32, 311–325.
165. Manquían-Cerda, K., Escudey, M., Zúñiga, G., Arancibia-Miranda, N., Molina, M., Cruces, E., 2016. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. Ecotoxicol Environ Saf 133, 316–326. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.029.
166. Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., Pauly, N., 2012. A burst of plant NADPH oxidases. Trends Plant Sci 17, 9–15. Doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.001.
167. Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann Bot 105, 1141–1157. Doi: 10.1093/aob/mcq028.
168. Matraszek, R., 2008. Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. Acta Physiol Plant 30, 361–370. Doi: 10.1007/s11738-007-0131-5.
169. Mazel, A., Levine, A., 2002. Induction of glucosyltransferase transcription and activity during superoxide-dependent cell death in *Arabidopsis* plants. Plant Physiol. Biochem. 40, 133–140. Doi: 10.1016/S0981-9428(01)01351-1.
170. Meychik, N., Nikolaeva, Y., Kushunina, M., Yermakov, I., 2014. Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal-binding sites in plant cell walls? Plant Soil 381, 25–34. Doi: 10.1007/s11104-014-2111-z.
171. Michalak, A., 2006. Heavy metals toxicity phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish J. of Environ. Stud 15, 523–530.

172. Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., Mittler, R., 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2, 1–10. Doi: 10.1126/scisignal.2000448.
173. Mir, M.A., Sirhindi, G., Alyemeni, M.N., Alam, P., Ahmad, P., 2018. Jasmonic acid improves growth performance of soybean under nickel toxicity by regulating nickel uptake, redox balance, and oxidative stress metabolism. *J Plant Growth Regul* 37, 1195–1209. Doi: 10.1007/s00344-018-9814-y.
174. Mishra, P., Dubey, R.S., 2011. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul* 64, 251–261. Doi: 10.1007/s10725-011-9566-1.
175. Mittler, R., 2017. ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22, 11–19. Doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
176. Molins-Lagua, C., Meseguer-Lloret, S., Moliner-Martinez, Y., Campíns-Falcó, P., 2006. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25, 282–290. Doi: 10.1016/J.TRAC.2005.12.002.
177. Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58, 459–481. Doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
178. Montillet, J.L., Cacas, J.L., Garnier, L., Montané, M.H., Douki, T., Bessoule, J.J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J.P., Vial, A., Triantaphylidès, C., 2004. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses. *Plant Journal* 40, 439–451. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02223.x.
179. Morales, M., Munné-Bosch, S., 2019. Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiol* 180, 1246–1250. Doi: 10.1104/pp.19.00405.
180. Moreira, E., Coimbra, S., Melo, P., 2022. Glutamine synthetase: an unlikely case of functional redundancy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 24, 713–720. Doi: 10.1111/plb.13408.
181. Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I., 2009. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 511–517. Doi: 10.1016/j.plaphy.2008.12.011.
182. Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., Berger, S., 2008. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 768–785. Doi: 10.1105/tpc.107.054809.
183. Murphy, R.C., Zarini, S., 2002. Glutathione adducts of oxyeicosanoids. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68–69, 471–482. Doi: 10.1016/s0090-6980(02)00049-7.
184. Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22, 867–880. Doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.

185. Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsaftaris, A., Labrou, N.E., 2017. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep* 36, 791–805. Doi: 10.1007/s00299-017-2139-7.
186. Nouairi, I., Ammar, W. Ben, Youssef, N. Ben, Daoud, D.B.M., Ghorbal, M.H., Zarrouk, M., 2006. Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science* 170, 511–519. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.10.003.
187. Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A., Ghorbal, M.H., 1997. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* 45, 1343–1350. Doi: 10.1016/S0031-9422(97)00159-3.
188. Pál, M., Leskó, K., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G., 2007. Cadmium-induced changes in the membrane lipid composition of maize plants. *Cereal Res Commun* 35, 1631–1642. Doi: 10.1556/CRC.35.2007.4.10.
189. Pandey, N., Sharma, C.P., 2002. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163, 753–758. Doi: 10.1016/S0168-9452(02)00210-8.
190. Pandey, V.P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U.N., 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 6, 1–16. Doi: 10.4172/2161-1009.1000308.
191. Pandhair, V., Sekhon, B.S., 2006. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. *J Plant Biochem Biotechnol* 15, 71–78. Doi: 10.1007/BF03321907.
192. Parlak, K.U., 2016. Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 76, 1–5. Doi: 10.1016/j.njas.2012.07.001.
193. Phua, S.Y., De Smet, B., Remacle, C., Chan, K.X., Van Breusegem, F., 2021. Reactive oxygen species and organellar signaling. *J Exp Bot* 72, 5807–5824. Doi: 10.1093/jxb/erab218.
194. Pietrini, F., Iori, V., Cheremisina, A., Shevyakova, N.I., Radyukina, N., Kuznetsov, V. V., Zacchini, M., 2015. Evaluation of nickel tolerance in *Amaranthus paniculatus* L. plants by measuring photosynthesis oxidative status antioxidative response and metal-binding molecule content. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 482–494. Doi: 10.1007/s11356-014-3349-y.
195. Prajapati, D.H., Ausma, T., de Boer, J., Hawkesford, M.J., De Kok, L.J., 2020. Nickel toxicity in *Brassica rapa* seedlings: impact on sulfur metabolism and mineral nutrient content. *Journal fur Kulturpflanzen* 72, 473–478. Doi:10.5073/JfK.2020.09.03.
196. Quaranta, A., Revol-Cavalier, J., Wheelock, C.E., 2022. The octadecanoids: an emerging class of lipid mediators. *Biochem Soc Trans* 50, 1569–1582. Doi: 10.1042/BST20210644.

197. Racchi, M.L., 2013. Antioxidant defenses in plants with attention to prunus and citrus spp. *Antioxidants* 2, 340–369. Doi: 10.3390/antiox2040340.
198. Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., Kawai, S., 2005. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *J Plant Nutr* 28, 393–404. Doi: 10.1081/PLN-200049149.
199. Rajput, V.D., Harish, Singh, R.K., Verma, K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F.R., Meena, M., Gour, V.S., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., 2021. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 10, 1–28. Doi: 10.3390/biology10040267.
200. Rampazzo, M.V., Cunha, M.L.O., de Oliveira, L.C.A., Silva, V.M., Lanza, M.G.D.B., de Melo, A.A.R., dos Reis, A.R., 2022. Physiological roles of nickel on antioxidant and nitrogen metabolism increasing the yield of sugarcane plants. *J Soil Sci Plant Nutr* 22, 4438–4448. Doi: 10.1007/s42729-022-01045-x.
201. Reda, M., Kłobus, G., Buczek, J., 2000. Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej. *Postepy Biochem* 46, 99–106.
202. Rehman, M.Z.U., Rizwan, M., Ali, S., Fatima, N., Yousaf, B., Naeem, A., Sabir, M., Ahmad, H.R., Ok, Y.S., 2016. Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. *Ecotoxicol Environ Saf* 133, 218–225. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.023.
203. Reszczyńska, E., Hanaka, A., 2020. Lipids Composition in plant membranes. *Cell Biochem Biophys* 78, 401–414. Doi: 10.1007/s12013-020-00947-w.
204. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2, 152–159. Doi: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2.
205. Ritter, A., Dittami, S.M., Goulitquer, S., Correa, J.A., Boyen, C., Potin, P., Tonon, T., 2014. Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol* 14, 1–17. Doi: 10.1186/1471-2229-14-116.
206. Rizwan, M., Imtiaz, M., Dai, Z., Mehmood, S., Adeel, M., Liu, J., Tu, S., 2017. Nickel stressed responses of rice in Ni subcellular distribution, antioxidant production, and osmolyte accumulation. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 20587–20598. Doi: 10.1007/s11356-017-9665-2.
207. Rizwan, M., Usman, K., Alsafran, M., Al Jabri, H., Samreen, T., Saleem, M.H., Tu, S., 2022. Nickel Toxicity Interferes with $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ uptake and nitrogen metabolic enzyme activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants* 11, 1–11. Doi: 10.3390/plants11111401.
208. Rodacka, A., Gerszon, J., Puchała, M., 2014. Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postepy Hig Med Dosw* 68, 280–290. Doi: 10.5604/17322693.1093929.

209. Roitto, M., Rautio, P., Julkunen-Tiitto, R., Kukkola, E., Huttunen, S., 2005. Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environmental Pollution* 137, 603–609. Doi: 10.1016/j.envpol.2005.01.046.
210. Roldán-Arjona, T., Ariza, R.R., 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* 681, 169–179. Doi: 10.1016/j.mrrev.2008.07.003.
211. Ryan, E., Fottrell, P.F., 1974. Subcellular localization of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. *Phytochemistry* 13, 2647–2652. Doi: 10.1016/0031-9422(74)80218-9.
212. Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. *Environ Exp Bot* 131, 1–9. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.06.010.
213. Sajwan, K.S., Ornes, W.H., Youngblood, T. V., Alva, A.K., 1996. Utake of soil applied cadmium, nickel and selenium by bush beans. *Water Air Soil Pollut* 91, 209–217. Doi: 10.1007/BF00666258.
214. Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K., Yamasaki, H., 2000. Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 949–954. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4053>
215. Sangwan, P., Kumar, V., Joshi, U.N., 2014. Effect of chromium (VI) toxicity on enzymes of nitrogen metabolism in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Enzyme Res* 2014, 1–9. Doi: 10.1155/2014/784036.
216. Santino, A., Stefania, D.D., Santino, A., Bonsegna, S., Domenico, S. De, Poltronieri, P., 2010. Plant oxylipins and their contribution to plant defence. *Curr Top Plant Biol* 11, 103–111.
217. Savchenko, T., Tikhonov, K., 2021. Oxidative stress-induced alteration of plant central metabolism. *Life* 11, 1–19. Doi: 10.3390/life11040304.
218. Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O.M., Klimov, V. V., 2014. Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochemistry* 79, 362–375. Doi: 10.1134/S0006297914040051.
219. Scala, V., Giorni, P., Cirlini, M., Ludovici, M., Visentin, I., Cardinale, F., Fabbri, A.A., Fanelli, C., Reverberi, M., Battilani, P., Galaverna, G., Dall'Asta, C., 2014. LDS1-produced oxylipins are negative regulators of growth, conidiation and fumonisin synthesis in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Front Microbiol* 5, 1–14. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00669.
220. Schmid-Siebert, E., Stepushenko, O., Glauser, G., Farmer, E.E., 2016. Membranes as structural antioxidants: Recycling of malondialdehyde to its source in oxidation-sensitive chloroplast fatty acids. *J Biol Chem* 291, 13005–13013. Doi: 10.1074/jbc.M116.729921.
221. Schuck, S., Kallenbach, M., Baldwin, I.T., Bonaventure, G., 2014. The *Nicotiana attenuata* GLA1 lipase controls the accumulation of *Phytophthora parasitica*-induced oxylipins and defensive secondary metabolites. *Plant Cell Environ* 37, 1703–1715. Doi: 10.1111/pce.12281.

222. Seregin, I. V., Ivanova, T. V., Voronkov, A.S., Kozhevnikova, A.D., Schat, H., 2023. Zinc- and nickel-induced changes in fatty acid profiles in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and non-accumulator *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 197, 1–21. Doi: 10.1016/j.plaphy.2023.107640.
223. Seregin, I. V., Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53, 257–277. Doi: 10.1134/S1021443706020178
224. Seta, A., Skórzyńska-Polit, E., Szczuka, E., Giełwanowska, I., 2009. Lipoksygenaza w komórkach roślinnych. *Postępy Biologii Komórki* 36, 69–83.
225. Shahrtash, M., 2013. Plant glutathione S-transferases function during environmental stresses: a review article. *Romanian Journal of Biology - Plant Biology* 58, 19–25.
226. Shahzad, B., Tanveer, M., Rehman, A., Cheema, S.A., Fahad, S., Rehman, S., Sharma, A., 2018. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - a review. *Plant Physiology and Biochemistry* 132, 641–651. Doi: 10.1016/j.plaphy.2018.10.014.
227. Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H., Kang, C.M., 2008. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int J Biol Sci* 4, 8–14. Doi: 10.7150/ijbs.4.8.
228. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012, 1–26. Doi: 10.1155/2012/217037.
229. Sharma, P., Shanker Dubey, R., 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol* 162, 854–864. Doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.011.
230. Sharma, R.K., Agrawal, M., 2005. Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol* 26, 301–313.
231. Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A., Hayat, S., 2022. Specific roles of lipooxygenases in development and responses to stress in plants. *Plants* 11, 1–18. Doi: 10.3390/plants11070979.
232. Singh, S., Yadav, V., Arif, N., Singh, V.P., Dubey, N.K., Ramawat, N., Prasad, R., Sahi, S., Tripathi, D.K., Chauhan, D.K., 2020. Heavy metal stress and plant life: uptake mechanisms, toxicity, and alleviation, in: *Plant life under changing environment: responses and management*. Elsevier, ss. 271–287. Doi: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00001-1.
233. Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158. Doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.
234. Skórzyńska-Polit, E., 2007. Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and changes under heavy metal stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76, 49–54. Doi: 10.5586/asbp.2007.006.

235. Skutnik-Radziszewska, A., Zalewska, A., 2020. Salivary redox biomarkers in the course of caries and periodontal disease. *Applied Sciences* 10, 1–33. Doi: 10.3390/APP10186240.
236. Słomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Sobczak, M., Bartoszewski, G., 2021. Transcriptome profiling of cucumber (*Cucumis sativus* L.) early response to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans. *Int J Mol Sci* 22, 1–18. Doi: 10.3390/ijms22084192.
237. Smirnoff, N., Arnaud, D., 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* 221, 1197–1214. Doi: 10.1111/nph.15488.
238. Sobati-Nasab, Z., Alirezalu, A., Noruzi, P., 2021. Effect of foliar application of nickel on physiological and phytochemical characteristics of pot marigold (*Calendula officinalis*). *J Agric Food Res* 3, 1–7. Doi: 10.1016/j.jafr.2021.100108.
239. Soliman, M., Alhaithloul, H.A., Hakeem, K.R., Alharbi, B.M., El-Esawi, M., Elkelish, A., 2019. Exogenous nitric oxide mitigates nickel-induced oxidative damage in eggplant by upregulating antioxidants, osmolyte metabolism, and glyoxalase systems. *Plants* 8, 1–17. Doi: 10.3390/plants8120562.
240. Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* 85, 85–89. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb05267.x.
241. Sreekanth, T.V.M., Nagajyothi, P.C., Lee, K.D., Prasad, T.N.V.K.V., 2013. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology* 10, 1129–1140. Doi: 10.1007/s13762-013-0245-9.
242. Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P., 1985. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol Plant* 63, 293–298. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb04268.x.
243. Sugimoto, M., Sakamoto, W., 1997. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genet. Syst* 72, 311–316. Doi: 10.1266/ggs.72.311.
244. Su, L.J., Zhang, J.H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.Y., 2019. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 1–14. Doi: 10.1155/2019/5080843.
245. Sytar, O., Cai, Z., Brestic, M., Kumar, A., Prasad, M.N.V., Taran, N., Smetanska, I., 2013. Foliar applied nickel on buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) induced phenolic compounds as potential antioxidants. *Clean* 41, 1129–1137. Doi: 10.1002/clen.201200512.
246. Szymańska, M., Matraszek, R., 2005. Reaction of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) to nickel conditioned by the way of metal penetration. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 4, 139–152.
247. Ślesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* 54, 39–50.

248. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11, 1187–1194. Doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x
249. Tiwari, S., Lata, C., 2018. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Front Plant Sci* 9, 1–12. Doi: 10.3389/fpls.2018.00452.
250. Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., Mueller, M.J., 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* 148, 960–968. Doi: 10.1104/pp.108.125690.
251. Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal Behav* 7, 1621–1633. Doi: 10.4161/psb.22455.
252. Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. Doi: 10.3390/nu2121231.
253. Tugbaeva, A., Ermoshin, A., Wuriyangan, H., Maleva, M., Borisova, G., Kiseleva, I., 2022. Copper Stress Enhances the Lignification of Axial Organs in *Zinnia elegans*. *Horticulturae* 8, 1–13. Doi: 10.3390/horticulturae8060558.
254. Unger, Ch., Kleta, S., Jandl, G., Tiedemann, A., 2005. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal Phytopathology* 153, 15–26. Doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00922.x.
255. Valivand, M., Amooaghaie, R., 2021. Foliar spray with sodium hydrosulfide and calcium chloride advances dynamic of critical elements and efficiency of nitrogen metabolism in *Cucurbita pepo* L. under nickel stress. *Sci Hortic* 283, 1–10. Doi: 10.1016/j.scienta.2021.110052.
256. Vargas-Madriz, Á.F., Kuri-García, A., Vargas-Madriz, H., Chávez-Servín, J.L., Ferriz-Martínez, R.A., Hernández-Sandoval, L.G., Guzmán-Maldonado, S.H., 2020. Phenolic profile and antioxidant capacity of *Pithecellobium dulce* (Roxb) Benth: a review. *J Food Sci Technol* 57, 4316–4336. Doi: 10.1007/s13197-020-04453-y.
257. Verdoni, N., Mench, M., Cassagne, C., Bessoule, J.-J., 2001. Fatty acid composition of tomato leaves as biomarkers of metal-contaminated soils. *Environ Toxicol Chem* 20, 382–388. Doi: 10.1002/etc.5620200220.
258. Verstraeten, S. V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2003. Flavan- 3- ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med* 34, 84–92. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)01185-1.
259. Wadsworth, G.J., 1997. The plant aspartate aminotransferase gene family. *Physiol Plant* 100, 998–1006. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00028.x.
260. Walker, M.C., Van der Donk, W.A., 2016. The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43, 419–430. Doi: 10.1007/s10295-015-1665-y.

261. Wang, M., Shen, Q., Xu, G., Guo, S., 2014. New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells, 1st ed, International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc. Doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00001-3.
262. Wang, Q., Sun, Y., Wang, F., Huang, P.C., Wang, Y., Ruan, X., Ma, L., Li, X., Kolomiets, M. V., Gao, X., 2021. Transcriptome and oxylipin profiling joint analysis reveals opposite roles of 9-oxylipins and jasmonic acid in maize resistance to gibberella stalk rot. *Front Plant Sci* 12, 1–12. Doi: 10.3389/fpls.2021.699146.
263. Wang, X., Zhang, D., Cui, N., Yu, Y., Yu, G., Fan, H., 2018. Transcriptome and miRNA analyses of the response to *Corynespora cassiicola* in cucumber. *Sci Rep* 8, 1–16. Doi: 10.1038/s41598-018-26080-6.
264. Wang, Y., Zhang, X., Huang, G., Feng, F., Liu, X., Guo, R., Gu, F., Zhong, X., Mei, X., 2020. Dynamic changes in membrane lipid composition of leaves of winter wheat seedlings in response to PEG-induced water stress. *BMC Plant Biol* 20, 1–15. Doi: 10.1186/s12870-020-2257-1.
265. Waszczak, C., Carmody, M., Kangasjärvi, J., 2018. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu Rev Plant Biol* 69, 209–236. Doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040322.
266. Watt, R.K., Ludden, P.W., 1999. Nickel-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 604–625. Doi: 10.1007/s000180050456.
267. Weber, H., Chételat, A., Reymond, P., Farmer, E.E., 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* 37, 877– 888. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2003.02013.x.
268. Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144, 307–313. Doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
269. Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., Cai, Y., 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Res Int* 2019, 21–27. Doi: 10.1155/2019/9732325.
270. Xiong, Z.T., Liu, C., Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicol Environ Saf* 64, 273–280. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.02.003.
271. Yadav, R.K., Singh, M., Roy, S., Ansari, M.N., Saeedan, A.S., Kaithwas, G., 2018. Modulation of oxidative stress response by flaxseed oil: role of lipid peroxidation and underlying mechanisms. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 135, 21–26. Doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.02.003.
272. Yagi, K., 1982. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance, lipid peroxides in biology and medicine, in: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*. Elsevier, ss. 223–242. Doi: 10.1016/b978-0-12-768050-7.50020-2.

273. Yalcinkaya, T., Uzilday, B., Ozgur, R., Turkan, I., Mano, J., 2019. Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): Their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses. *Environ Exp Bot* 165, 139–149. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.06.004.
274. Yilmaz, D.D., Parlak, K.U., 2011. Antioxidative parameters in the opposite-leaved pondweed (*Gronlencia densa*) in response to nickel stress. *Chemical Speciation and Bioavailability* 23, 71–79. Doi: 10.3184/095422911X13026931812524.
275. Yoneyama, T., Suzuki, A., 2019. Exploration of nitrate-to-glutamate assimilation in non-photosynthetic roots of higher plants by studies of ¹⁵N-tracing, enzymes involved, reductant supply, and nitrate signaling: a review and synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 136, 245–254. Doi: 10.1016/j.plaphy.2018.12.011.
276. Young, T.A., Cunningham, C.C., Bailey, S.M., 2002. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys* 405, 65–72. Doi: 10.1016/S0003-9861(02)00338-7.
277. Yu, L., Zhou, C., Fan, J., Shanklin, J., Xu, C., 2021. Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *Plant Journal* 107, 37–53. Doi: 10.1111/tpj.15273.
278. Zeb, A., 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem* 44, 1–22. Doi: 10.1111/jfbc.13394.
279. Zemanová, Veronika, Pavlík, M., Kyjaková, P., Pavlíková, D., 2015a. Fatty acid profiles of ecotypes of hyperaccumulator *Noccaea caerulea* growing under cadmium stress. *J Plant Physiol* 180, 27–34. Doi: 10.1016/j.jplph.2015.02.012.
280. Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., Kyjaková, P., 2015b. Changes in the contents of amino acids and the profile of fatty acids in response to cadmium contamination in spinach. *Plant Soil Environ* 61, 285–290. Doi: 10.17221/274/2015-PSE.
281. Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8, 33–42. Doi: 10.1016/j.cofs.2016.02.002.
282. Zhang, J., Liao, W., 2019. Protein S-nitrosylation in plant abiotic stresses. *Functional Plant Biology* 47, 1–10. Doi: 10.1071/FP19071.
283. Zhang, K., Li, S., Xu, Y., Zhou, Y., Ran, S., Zhao, H., Huang, W., Xu, R., Zhong, F., 2022. Effect of nickel ions on the physiological and transcriptional responses to carbon and nitrogen metabolism in tomato roots under low nitrogen levels. *Int J Mol Sci* 23, 1–12. Doi: 10.3390/ijms231911398.
284. Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., Salts, Y., Shabtai, S., Ben-Hayyim, G., 2005. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant Journal* 44, 361–371. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02536.x.
285. Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., Zhang, Yongqiang, 2022. A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Nat Prod Commun* 17, 1–14. Doi: 10.1177/1934578X211069721.

286. Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W., Wang, X., 2009. Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2357–2377. Doi: 10.1105/tpc.108.062992.
287. Zhukovsky, M.A., Filograna, A., Luini, A., Corda, D., Valente, C., 2019. Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Lett* 593, 2428–2451. Doi: 10.1002/1873-3468.13563.