



Marian J. Giertych

Fenole jako wskaźnik reakcji sosny zwyczajnej na warunki skażonego środowiska

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Doc. dr hab. Piotra Karolewskiego
w Zakładzie Ekologii
Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku

Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

1998

Marian J. Gierlich

Fenole jako wskaźnik reakcji sosny zwyczajnej
na warunki skażonego środowiska



VIII - 108

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Doc. dr hab. Piotra Karłowicza
w Zakładzie Ekologii
Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku

Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

1998

Podziękowanie

Panu Docentowi dr hab. Piotrowi Karolewskiemu składam podziękowanie za pomoc w wyborze tematu oraz wszelkie uwagi w trakcie prowadzenia badań i pisania pracy.

Pragnąłbym również podziękować tym wszystkim, którzy swoją pomocą i cennymi uwagami przyczynili się do powstania tej pracy, a w szczególności: mojemu ojcu Maciejowi Giertychowi, Panu Doc. dr hab. Jackowi Oleksynowi, Panu Dr Pawłowi Chmielarzowi za cenne uwagi i przeczytanie manuskryptu, Panu Doc. dr hab. Antoniemu Wernerowi, Panu Dr Markowi G. Tjoelkerowi, Panu Dr Ludwikowi O. De Temmermanowi i Pani Mgr Romie Żytkowiak za przeprowadzenie wspólnych badań, Panu Prof. dr hab. Ryszardowi Siweckimu za pomoc w przeprowadzeniu części badań za granicą oraz Pani Annie Niemir za pomoc w pracach laboratoryjnych.

Chciałbym również podziękować mojej rodzinie za wsparcie i cierpliwość.

Spis treści

1. WSTĘP.....	1
2. CEL PRACY.....	7
3. METODY.....	8
3.1. Analizy związków fenolowych.....	8
3.1.1. Przygotowanie materiału do analiz związków fenolowych.....	8
3.1.2. Ekstrakcja materiału roślinnego.....	11
3.1.3. Oznaczanie zawartości sumy związków fenolowych (SF).....	11
3.1.4. Oznaczanie zawartości orto-dwufenoli (o-DF).....	12
3.1.5. Oznaczanie zawartości meta-dwufenoli (m-DF).....	13
3.1.6. Oznaczanie zawartości fenoli nierozpuszczalnych.....	14
3.1.7. Analiza histochemiczne igieł.....	14
3.2. Inne pomiary zastosowane w badaniach.....	15
3.2.1. Natężenie fotosyntezy, oddychania i transpiracji.....	15
3.2.2. Zawartość cukrów niestrukturalnych.....	15
3.2.3. Zawartość azotu.....	15
3.2.4. Zawartość siarki.....	15
3.2.5. Zawartość fluoru.....	15
3.2.5. Zawartość pierwiastków: fosfor, potas, wapń, magnez, mangan, żelazo, bor, miedź, cynk, aluminium, ołów, kadm, chrom, nikiel i kobalt.....	16
3.2.6. Pomiary powierzchni igieł i korzeni.....	16
3.3. Metody statystyczne.....	16
4. WYNIKI.....	17
4.1. Kinetyka i charakter zmian zawartości związków fenolowych pod wpływem różnych zanieczyszczeń - toksycznych gazów i metali.....	17
4.1.1. Cel.....	17
4.1.1.1. Wpływ SO ₂ na zawartość fenoli u siewek sosny.....	17
4.1.1.1.1. Doświadczenie I - wpływ stężenia SO ₂	18
4.1.1.1.1.1. Materiał i metody.....	18
4.1.1.1.1.2. Wyniki.....	19
4.1.1.1.2. Doświadczenie II - wpływ czasu ekspozycji.....	20
4.1.1.1.2.1. Materiał i metody.....	20

4.1.1.1.2.2. Wyniki.....	21
4.1.1.1.3. Doświadczenie III - wpływ SO ₂ na siewki sosny o zróznicowanej wrażliwości.....	21
4.1.1.1.3.1. Materiał i metody.....	21
4.1.1.1.3.2. Wyniki.....	22
4.1.1.2. Wpływ jonów toksycznych metali na zawartość fenoli u siewek sosny.....	25
4.1.1.2.1. Doświadczenie I- wpływ jonów glinu, manganu, ołowiu i kadmu.....	26
4.1.1.2.1.1. Materiał i metody.....	26
4.1.1.2.1.2. Wyniki.....	27
4.1.1.2.2. Doświadczenie II - wpływ azotanu glinu.....	30
4.1.1.2.2.1. Materiał i metody.....	30
4.1.1.2.2.2. Wyniki.....	30
4.1.1.3. Wpływ skażenia środowiska na poziom związków fenolowych w igłach sosny zwyczajnej.....	33
4.1.1.3.1. Materiał i metody.....	33
4.1.1.3.2. Wyniki.....	35
4.2. Wpływ wieku igieł na zmiany poziomu fenoli u drzew w stresie.....	39
4.2.1. Cel.....	39
4.2.1.1. Doświadczenie I - sosna zwyczajna.....	39
4.2.1.1.1. Materiał i metody.....	39
4.2.1.1.2. Wyniki.....	40
4.2.1.2. Doświadczenie II - sosna bośniacka.....	41
4.2.1.2.1. Materiał i metody.....	41
4.2.1.2.2. Wyniki.....	41
4.2.1.3. Doświadczenie III - sosna czarna.....	43
4.2.1.3.1. Materiał i metody.....	43
4.2.1.3.2. Wyniki.....	43
4.3. Modyfikujący wpływ czynników zewnętrznych (nawożenia, światła) na poziom fenoli u roślin w warunkach stresu.....	49
4.3.1. Cel.....	49
4.3.1.1. Wpływ nawożenia.....	49

4.3.1.1.1	Doświadczenie I - laboratoryjne.....	49
4.3.1.1.1.1	Materiał i metody.....	49
4.3.1.1.1.2	Wyniki.....	50
4.3.1.1.2	Doświadczenie II - terenowe.....	53
4.3.1.1.2.1	Materiał i metody.....	53
4.3.1.1.2.2	Wyniki.....	53
4.3.1.2	Wpływ oświetlenia	55
4.3.1.2.1	Doświadczenie I - laboratoryjne.....	55
4.3.1.2.1.1	Materiał i metody.....	55
4.3.1.2.1.2	Wyniki.....	57
4.3.1.2.2	Doświadczenie II - terenowe.....	63
4.3.1.2.2.1	Materiał i metody.....	63
4.3.1.2.2.2	Wyniki.....	63
4.3.1.3	Wpływ pory dnia i zacielenia.....	66
4.3.1.3.1	Materiał i metody.....	66
4.3.1.3.2	Wyniki.....	66
4.4.	Poziom związków fenolowych a stopień wrażliwości drzew na zanieczyszczenia przemysłowe.....	68
4.4.1.	Cel.....	68
4.4.1.1.	Doświadczenie proveniencyjne na czterech powierzchniach.....	68
4.4.1.1.1.	Materiał i metody.....	68
4.4.1.1.2.	Wyniki.....	69
4.4.1.2.	Zmienność międzygatunkowa w zawartości fenoli, a wrażliwość na zanieczyszczenia.....	74
4.4.1.2.1.	Materiał i metody.....	74
4.4.1.2.2.	Wyniki.....	74
4.5.	Udział związków fenolowych w powstawaniu uszkodzeń igieł wywoływanych czynnikami abiotycznymi.....	76
4.5.1.	Cel.....	76
4.5.1.1.	Doświadczenie I - analiza uszkodzonych igieł.....	76
4.5.1.1.1.	Materiał i metody.....	76
4.5.1.1.2.	Wyniki.....	77

4.5.1.2. Doświadczenie II - analiza rozkładu zawartości fenoli w igłach wizualnie nie uszkodzonych.....	79
4.5.1.2.1. Materiał i metody.....	79
4.5.1.2.2. Wyniki.....	79
5. DYSKUSJA.....	82
5.1. Kinetyka i charakter zmian zawartości związków fenolowych pod wpływem różnych zanieczyszczeń - toksycznych gazów i metali.....	82
5.2. Wpływ wieku igieł na zmiany poziomu fenoli u drzew w stresie.....	92
5.3. Modyfikujący wpływ czynników zewnętrznych (nawożenia, światła) na poziom fenoli u roślin w warunkach stresu.....	95
5.4. Poziom związków fenolowych a stopień wrażliwości drzew na zanieczyszczenia przemysłowe.....	99
5.5. Udział związków fenolowych w powstawaniu uszkodzeń igieł wywoływanych czynnikami abiotycznymi.....	101
6. WNIOSKI.....	103
7. LITERATURA.....	105

1. WSTĘP

Stały rozwój przemysłu powoduje często nieodwracalne zmiany w środowisku naturalnym. Zwiększa się ilość terenów zurbanizowanych, stale poszerza się sieć dróg i wzrasta liczba różnorodnych zakładów przemysłowych. W ostatnich kilkunastu latach, głównie w wyniku zmian technologicznych, wprowadzenia bezołowiowego paliwa itd. uległa obniżeniu emisja różnych szkodliwych substancji, zarówno w Polsce jak i na świecie. Jednak obciążenie środowiska jest nadal bardzo duże, a zgromadzone w glebie toksyczne zanieczyszczenia długo jeszcze wpływać będą na roślinność. Istnieje więc konieczność poszukiwania metod oceny stanu skażenia środowiska, w tym również przy pomocy różnego rodzaju bioindykatorów. Bioindykacja może być prowadzona na trzech poziomach: ekosystemu - stosuje się w tym celu ocenę stanu całych zbiorowisk roślinnych (Dyguś 1996), organizmu - nekrozy, chlorozy na roślinach wskaźnikowych np. mietliczkach (Borowiec i Zabłocki 1992), mchach (Rachwald 1996) oraz komórkowym - pomiar zawartości toksycznych pierwiastków (fluoru, siarki i innych) w liściach, igłach, korzeniach czy innych organach roślinnych (Malzahn 1996; Magnuski i in. 1996, Dmuchowski i Bytnerowicz 1995).

Inną metodą jest bioindykacja na poziomie fizjologiczno-biochemicznym, polegająca na ocenie zmian zawartości metabolitów roślinnych, wywołanych przez skażenie środowiska. Wykorzystywane są w tym celu między innymi pomiary takich metabolitów jak: chlorofil (Theisen i in. 1994; Mikkelsen i in. 1995; Tjoelker i in. 1995), prolina (Karolewski 1989), putrescyna (Langebartels i in. 1990). Wielu autorów podaje również, że do celów bioindykacyjnych dobrze nadają się związki fenolowe (Yee-Meiler 1977; Zobel i Nighswander 1991; Richter i Wild 1994).

Związki fenolowe to grupa metabolitów wtórnych, strukturalnie bardzo zróżnicowanych. Zawiera ona zarówno stosunkowo proste jednopierścieniowe pochodne benzenu czy izopropylenu, jak i bardziej złożone związki pochodne: alkoholi, estrów, kwasów, aldehydów i stilbenu, amin i aminokwasów oraz flawonoidy i antocyjaniny. Fenole wchodzą również w skład polimerów - lignin i tanin (Thomson 1964). Już sama różnorodność fenoli świadczy o tym, że spełniają one w roślinie bardzo różne funkcje. Ich rola nie zawsze jest dobrze poznana. Wiadomo, że pełnią one istotne funkcje regulacyjne np. w procesie kiełkowania nasion (Iwanowska i in. 1994), w trakcie kwitnienia (Yanosaka i in. 1991), w procesie dojrzewania (Burda i in. 1990) i mogą również modyfikować proces transportu membranowego w komórkach (Erdei i in. 1994). Dobrze udokumentowana jest rola związków fenolowych w procesach obronnych przed wpływem czynników biotycznych, takich jak: grzyby, nicienie czy owady. Zagadnienia te zostały dobrze rozpoznane i zebrane w podsumowujących opracowaniach (Nicholson i Hammerschmidt 1992, Bennett i Wallsgrove 1994).

Niejednokrotnie stwierdzano, podobne jak w przypadku czynników biotycznych, zmiany poziomu związków fenolowych wywołane przez abiotyczne czynniki stresowe, takie jak: uszkodzenia mechaniczne (Łobarzewski 1981, Hoque 1982), wysoka temperatura (Siegelman 1964, Forrest 1975), niska temperatura. (Pukacki i Pukacka 1987) i zanieczyszczenie środowiska (Yee-Meiler 1974, Bucker i in. 1993, Booker i in. 1996). Ponieważ rośliny reagują na zanieczyszczenia zmianami także w metabolizmie związków fenolowych, stwarza to możliwość zastosowania pomiarów zawartości tych związków w bioindykacji skażenia środowiska, jak również do oceny wrażliwości gatunków, populacji czy osobników na zanieczyszczenia. W celach bioindykacyjnych stosowane są pomiary zawartości poszczególnych fenoli np. katechiny (Kettrup i in. 1991; Lavola i in. 1994; Wild i Schmitt 1995; Booker i in. 1996). Są one jednak pracochłonne i wymagają stosunkowo

drogiej, specjalistycznej aparatury typu wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Wydaje się, że z powodzeniem można stosować do tych celów pomiary poziomu jednej grupy związków fenolowych lub ich ogólnej puli, które są tańsze i łatwiejsze metodycznie. Przykładami zastosowania pomiarów zawartości fenoli, oznaczanych sumarycznie, w bioindykacji różnego rodzaju skażeń, mogą być prace Yee-Meiler (1974; 1977; 1978) - badania wpływu związków fluoru na kilka gatunków drzew w tym sosny zwyczajnej, Grilla i wsp. (1975) - badania wpływu dwutlenku siarki na świerk pospolity, Tingeya i wsp. (1976) - badania wpływu ozonu na sosnę żółtą.

Zmiany zawartości związków fenolowych są stosunkowo czułym, lecz mało specyficznym wskaźnikiem skażeń. Ponadto zmiany poziomu, tak poszczególnych fenoli, jak i ich sumy, następujące pod wpływem zanieczyszczeń, zależą również od szeregu innych czynników wewnętrznych, a także zewnętrznych. Do czynników wewnętrznych zaliczyć możemy takie jak: wiek rośliny i stadium jej rozwoju, rodzaj organu itd. Aerts i Baumann (1994) stwierdzili, że wraz z rozwojem liścieni siewek kawy (*Coffea arabica* L.) spadała w nich zawartość kwasu chlorogenowego, przy jednoczesnym wzroście ilości polimerów fenolowych związanych ze ścianami komórkowymi. Natomiast w liściach, kwasy chlorogenowy i kawowy akumulowały się w sposób ciągły podczas ich rozwoju. W przypadku świerka Esterbauer i wsp. (1975) stwierdzili, że poziom fenoli zwiększał się w czasie wzrostu igieł, w ciągu pierwszego roku. Przez następne 3 lata pozostawał na stosunkowo stałym poziomie. Odwrotne wyniki uzyskali Dawra i wsp. (1988) badając u 3 gatunków dębów *Quercus incana*, *Q. semecarpifolia* i *Q. ilex* poziom związków fenolowych - ogólnie oznaczanych fenoli, tanin oraz fenoli związanych z białkami. U pierwszych dwóch z wymienionych gatunków, młodsze liście miały istotnie więcej całkowitej puli związków fenolowych i fenoli związanych z białkami, niż liście starsze. Potwierdzają to częściowo badania Julkunen-Tiitto (1989), gdzie największe ilości glikozydów fenolowych

stwierdzono w niedojrzałych liściach wierzb. Fenolowe taniny akumulowały się podczas lata, a glikozydy fenolowe były w największej ilości na początku sezonu wegetacyjnego. Podobnie u kilku badanych gatunków akacji zawartość wolnych fenoli była wyższa w młodych liściach oraz niedojrzałych owocach i nasionach, natomiast niższa w dojrzałych liściach i strąkach (Ernst i in. 1991). Według autorów spadek zawartości fenoli w ciągu roku ma charakter falowy i może być związany ze zmianami klimatycznymi. Również Nerg i wsp. (1994) stwierdzili w igłach siewek sosny zwyczajnej, Niemann (1976) w igłach modrzewia (*Larix leptolepis*), Strack i wsp. (1989) w igłach świerka pospolitego, a Weiss i wsp. (1995) w korze świerka, najwyższą zawartość wolnych fenoli na wiosnę, a najniższą jesienią. Wynika stąd, że zmiany w poziomie fenoli uzależnione są od rodzaju związków fenolowych, gatunku rośliny i okresu w sezonie wegetacyjnym.

Na zawartość fenoli istotny wpływ mogą mieć również pewne czynniki zewnętrzne takie jak: warunki siedliskowe, w tym nawożenie, oświetlenie czy temperatura. Dobrze udokumentowany jest wpływ nawożenia azotowego powodujący obniżenie poziomu fenoli (Julkunen-Tiitto 1989; Balsberg-Påhlsson 1992; Hakulinen i in. 1995). Brak jest jednak w literaturze informacji o wpływie nawożenia wapniowego na poziom fenoli, podczas gdy wiadomo, że również pH podłoża wywiera znaczący wpływ na zawartość fenoli. Northup i wsp. (1995) wykazali, że ze wzrostem kwasowości gleby wzrastała zawartość skondensowanych tanin i sumy fenoli w igłach sosen *Pinus contorta* i *P. muricata*. Również inne czynniki, takie jak oświetlenie, mogą wpływać na poziom fenoli. Siegelman (1964) podaje, że rośliny rosnące w większym, naturalnym oświetleniu mają wyższy poziom fenoli niż rosnące w cieniu. Natomiast Kar i Mishra (1976) podają, że ciemność stymuluje produkcję związków fenolowych w liściach ryżu. Tak więc wpływ oświetlenia wymaga dalszych badań i wyjaśnień w szczególności u roślin drzewiastych. Ocena znaczenia wpływu czynników, zarówno wewnętrznych jak i zewnętrznych, na zmiany poziomu

związków fenolowych wywołane przez zanieczyszczenia, jest niezbędna w kontekście zastosowania tych związków w bioindykacji.

Badania wpływu poszczególnych czynników wpływających na metabolizm związków fenolowych, są także pomocne w wyjaśnianiu mechanizmów reakcji roślin na warunki skażonego środowiska. Fenole biorą bowiem udział zarówno w procesach obronnych jak i degradacyjnych (Rubin i Arcichowska 1971). W procesach obronnych roślin fenole mogą spełniać rolę czynną lub bierną (Nicholson i Hammerschmidt 1992). Obrona bierna polega na tym, że organizmy lub organy rośliny posiadające wyższą zawartość fenoli są mniej narażone na atak owadów czy wpływ zanieczyszczeń. Przykładem tego typu strategii obronnej może być stwierdzona przez Hendry i wsp. (1994), ścisła zależność między trwałością nasion w glebie a zawartością orto-dwufenoli oraz między zawartością protein i orto-dwufenoli. Autorzy wnioskują, że orto-dwufenole odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu trwałości nasion w glebie, prawdopodobnie poprzez wstrzymanie lub zmniejszenie ich rozkładu przez mikroorganizmy jak również przez obronę przed roślinożercami. Podobnie Bergvinson i wsp. (1994) twierdzą, że głównym czynnikiem odporności kukurydzy na owady jest stwardnienie liści, spowodowane wzmocnieniem ścian komórkowych przez odkładające się związki fenolowe, głównie ligniny. Obrona czynna polega na takiej zmianie metabolizmu rośliny pod wpływem czynnika stresowego, aby ograniczyć szkodliwe działanie tego czynnika. W przypadku czynników biotycznych reakcja polega najczęściej na wzroście zawartości związków fenolowych, w celu ograniczenia atrakcyjności rośliny dla patogena czy roślinożercy lub odizolowaniu zdrowej części rośliny od zarażonej. Wzrost zawartości fenoli stwierdzono pod wpływem takich czynników biotycznych jak wirusy (Simons i Ross 1971), grzyby (Klepzig i in. 1995), owady (Feeny i Bostock 1968) i nicienie (Feldman i Hanks 1968). Hasemann i wsp. (1990) stwierdzili, że komórki szparkowe i epidermalne dwulettnich igieł

świerka wykazują wzrost przebarwień spowodowanych odkładaniem się fenoli oraz, że ze wzrostem uszkodzeń igieł zawartość fenoli wzrasta we wszystkich rodzajach komórek. Autorzy ci twierdzą ponadto, że fenole są aktywnymi antyutleniaczami, a akumulacja defensywnych związków fenolowych może być stymulowana przez nienormalną kompartmentację komórek i jest znana jako mechanizm obronny przed wpływem czynników biotycznych i abiotycznych. Glazener (1982) podaje, że zawartość związków fenolowych i aktywność amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL) wzrastały w komórkach epidermy owoców pomidorów po zainfekowaniu ich przez *Borytis cinerea*. Badania ścian komórkowych wskazały na ich zwiększoną lignifikację i zahamowanie penetracji patogena. Ponadto związki fenolowe pełnią często rolę przenośników elektronów w końcowych reakcjach utleniania. W sytuacjach stresowych, gdy jest zwiększone zapotrzebowanie na energię, ich rola wzrasta (Rubin i Arcichowska 1971). Wśród fitoaleksyn dużą grupę związków fenolowe (Skrzypczak i Thiem 1987), a wyzwalaczami fitoaleksyn (elicitorami) są nie tylko czynniki pochodzenia biologicznego, ale i abiotycznego: jony toksycznych metali, fluorki oraz inne niekorzystne czynniki środowiska i uszkodzenia mechaniczne tkanek roślin. Tak więc rola fenoli w procesach obronnych jest stosunkowo dobrze poznana, ale przede wszystkim w przypadku wpływu czynników biotycznych. Niewiele jest jednak danych wyjaśniających te mechanizmy w warunkach stresu abiotycznego w tym wpływu toksycznych zanieczyszczeń, a szczególnie u roślin drzewiastych.

2. CEL PRACY

Podstawowym celem pracy jest określenie możliwości wykorzystania pomiaru zawartości związków fenolowych w igłach sosny zwyczajnej, jako wskaźnika skażenia środowiska. Wielu autorów stosuje w swoich badaniach fenole jako wskaźniki, jednakże każdy bioindykator powinien spełniać pewne kryteria. Zostały one bardzo dobrze określone w pracy Wilda i Schmitta (1995). Mówią oni, że aby biochemiczny wskaźnik mógł być użyty w obserwacjach terenowych, musi spełniać pewne określone warunki. Ponieważ próbki badanych drzew muszą być pobierane w kolejnych latach, a w ramach okresu pobierania próbek o różnych porach dnia, mierzony parametr powinien charakteryzować się małą zmiennością w przebiegu rocznym i dziennym. Dodatkowo pomiary muszą cechować się dużą powtarzalnością, a oznaczanie powinno być szybkie i tanie. Ponadto konieczna jest możliwość określania danego parametru w „konserwowanych” (np. zamrażanych) próbkach igieł.

Pomiar zawartości sumy związków fenolowych spełnia niektóre z wymienionych wyżej kryteriów, jest na przykład szybki i tani. Określenie czy spełnia pozostałe kryteria było przedmiotem prezentowanych w tej pracy badań. Ponadto starano się zbadać wpływ na zmiany zawartości fenoli innych czynników, mogących modyfikować oddziaływanie skażonego środowiska.

Drugim celem jaki starałem się zrealizować było zbadanie czy istnieje zależność między zawartością fenoli a wrażliwością drzew sosny na skażenia, jak ma to niejednokrotnie miejsce w przypadku wpływu biotycznych czynników stresowych.

Poza tym niektóre z przeprowadzonych doświadczeń stały się pomocne w wyjaśnieniu mechanizmów reakcji drzew na zanieczyszczenia i roli jaką odgrywają w nich związki fenolowe.

3.METODY

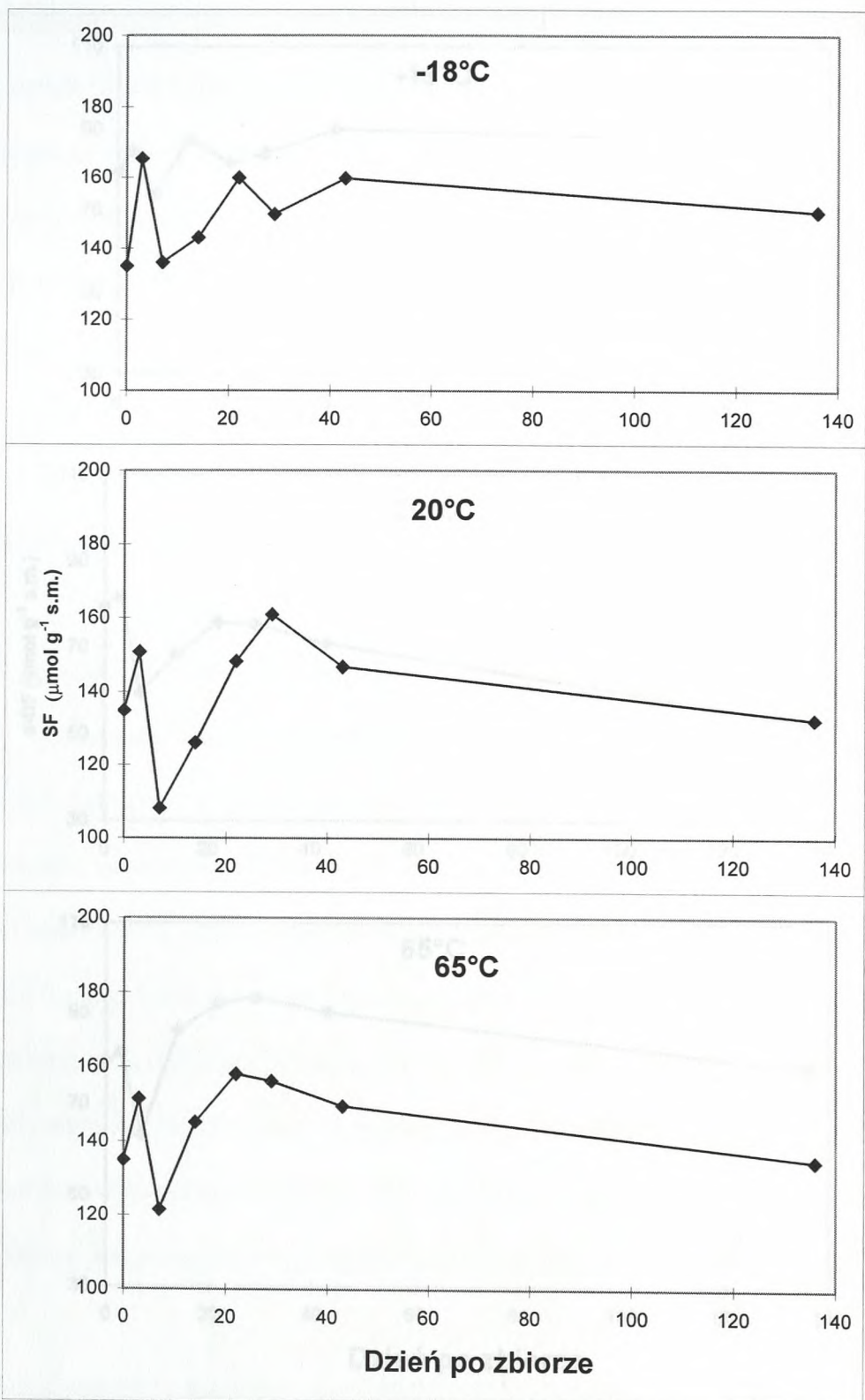
3.1 Analizy związków fenolowych

3.1.1. Przygotowanie materiału do analiz związków fenolowych.

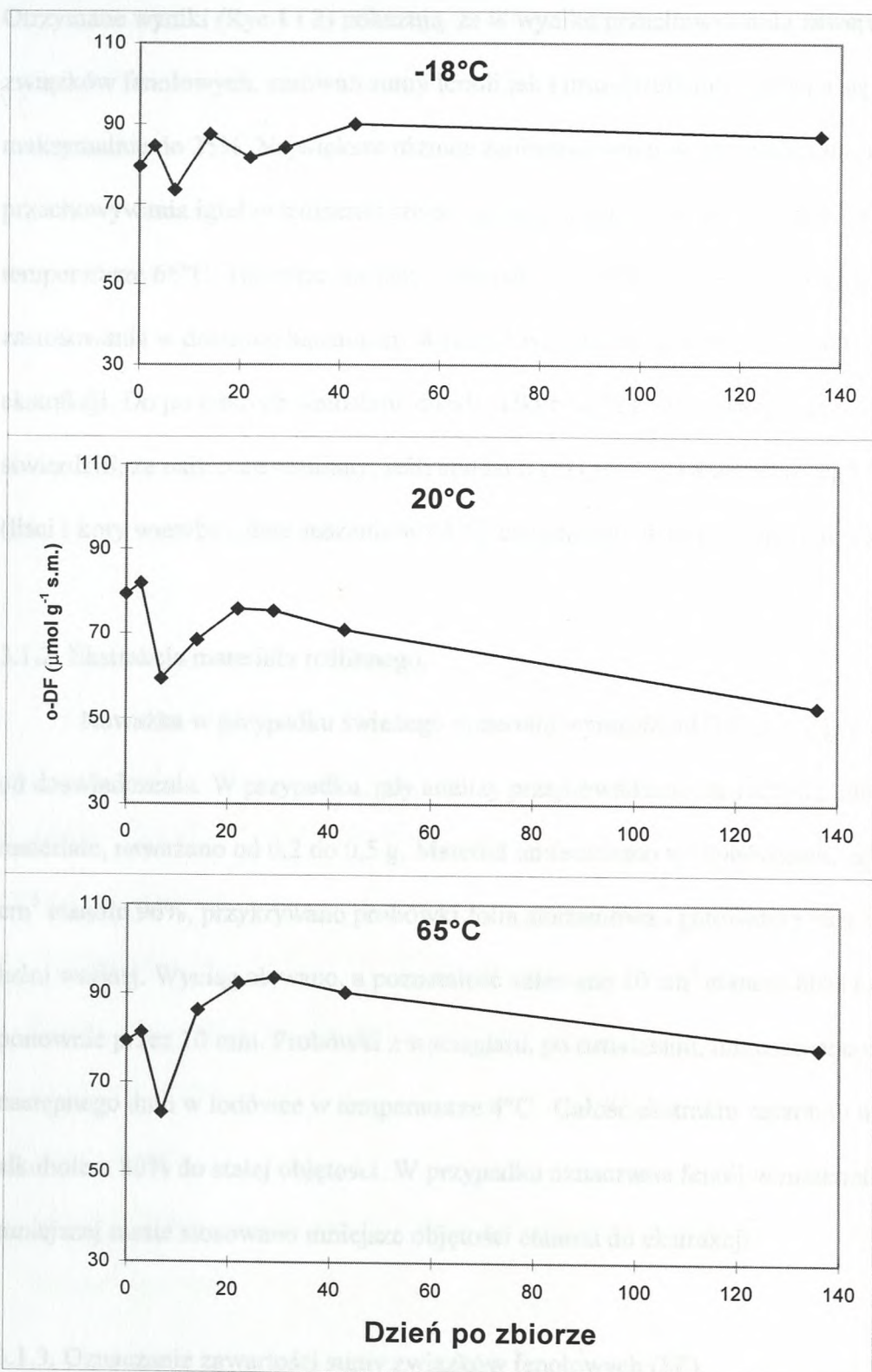
Większość prac wykonana została na igłach bądź ich fragmentach, a część na korzeniach. W początkowej fazie badań wszystkie analizy wykonywane były na materiale świeżym. Pocięty materiał poddawano dwukrotnej ekstrakcji w etanolu i homogenizowano w moździerzach. W celu zwiększenia ilości prób zrezygnowano z homogenizowania po ekstrakcji, natomiast cięto materiał na bardzo drobne odcinki maksymalnie 5 mm i w takiej postaci poddawano ekstrakcji. Ponieważ zawartości stwierdzone w materiale ciętym były niższe niż w homogenizowanym, co stwierdzono eksperymentalnie, w końcowych obliczeniach uwzględniano wyznaczony doświadczalnie współczynnik.

Następnie, w celu umożliwienia wykonywania analiz przy większej liczbie powtórzeń i niekoniecznie zaraz po zbiorze materiału, wykonano doświadczenie metodyczne polegające na analizie większej porcji jednolitego materiału (igieł sosny zwyczajnej z jednego drzewa) i przechowywaniu go w różnych warunkach. Zastosowano trzy warianty przechowywania igieł. W pierwszym przechowywano je w temperaturze -18°C, w drugim przechowywano igły w temperaturze pokojowej ok. 20°C, gdzie stopniowo ulegały one wysuszeniu i w trzecim wariantcie igły suszono w temperaturze 65°C w ciągu trzech dni, a następnie przechowywano w temperaturze pokojowej.

Wykonano analizę materiału świeżego oraz przechowywanego po 3, 7, 14, 22, 29, 43 i 136 dniach od zbioru, w trzech wariantach przechowywania. Wszystkie wyniki przeliczono na zawartość związków fenolowych w suchej masie.



Ryc. 1. Zawartość sumy fenoli (SF) w igłach sosny zwyczajnej przechowywanych w temperaturze: -18°C; 20°C i 65°C wyrażona w μmolach kwasu chlorogenowego na g suchej masy.



Ryc. 2. Zawartość orto-dwufenoli (o-DF) w igłach sosny zwyczajnej przechowywanych w temperaturze: -18°C; 20°C i 65°C, wyrażona w μmolach kwasu chlorogenowego na g suchej masy.

Otrzymane wyniki (Ryc.1 i 2) pokazują, że w wyniku przechowywania zawartość związków fenolowych, zarówno sumy fenoli jak i orto-dwufenoli, zmienia się maksymalnie do 25%. Największe różnice zaobserwowano w przypadku suszenia i przechowywania igieł w temperaturze pokojowej, a najmniejsze w materiale suszonym w temperaturze 65°C. Tak więc wariant z suszeniem w 65°C wybrano jako najlepszy do zastosowania w dalszych badaniach. Wysuszony materiał mielono w młynku i poddawano ekstrakcji. Do podobnych wniosków doszli Julkunen-Tiitto i Tahvanainen (1989), którzy stwierdzili, że najlepsze rezultaty, jeśli chodzi o przygotowywanie zebranego materiału (liści i kory wierzby), daje suszenie w 65°C, ewentualnie w temperaturze pokojowej.

3.1.2. Ekstrakcja materiału roślinnego.

Naważka w przypadku świeżego materiału wynosiła od 0,5 do 1,0 g w zależności od doświadczenia. W przypadku, gdy analizy przeprowadzano na suchym, zmielonym materiale, naważano od 0,2 do 0,5 g. Materiał umieszczano w probówkach, zalewano 10 cm³ etanolu 96%, przykrywano probówki folią aluminiową i gotowano przez 15 min na łaźni wodnej. Wyciąg zlewano, a pozostałość zalewano 10 cm³ etanolu 80% i gotowano ponownie przez 10 min. Probówki z wyciągami, po ostudzeniu, umieszczano do następnego dnia w lodówce w temperaturze 4°C. Całość ekstraktu sączono i uzupełniano alkoholem 80% do stałej objętości. W przypadku oznaczania fenoli w materiale o mniejszej masie stosowano mniejsze objętości etanolu do ekstrakcji.

3.1.3. Oznaczanie zawartości sumy związków fenolowych (SF).

Sumę związków fenolowych oznaczano kolorymetrycznie przy użyciu odczynnika Folin i Ciocalteu's Phenol Reagent (SIGMA F-9252) metodą Johnsona i Schaala (1957), nieznacznie zmodyfikowaną przez Singeltona i Rossiego (1965). W tym celu pobierano po

1 cm³ surowych wyciągów i rozcieńczano je 80% etanolem w stosunku 1:5, w przypadku, gdy stwierdzono eksperymentalnie, że stężenie fenoli było zbyt duże lub za małe, modyfikowano odpowiednio rozcieńczenie. Z rozcieńczonego wyciągu pobierano po 1 cm³ i dodawano 7,3 cm³ wody destylowanej i następnie 0,2 cm³ odczynnika Folin i Ciocalteu's Phenol Reagent. Po ok. 3 minutach od dodania odczynnika Folina, dodawano 2 cm³ 10% Na₂CO₃. Próby umieszczano w ciemności na 2 godziny. Odczyt transmisji dokonywano przy długości fali λ=660 nm, przy wykorzystaniu spektrofotometru SPEKOL (Carl Zeiss Jena). Stężenie odczytywano z krzywej wzorcowej, która była przygotowywana na bazie kwasu chlorogenowego. Zawartość obliczano ze wzoru :

$$z = \frac{c \times V \times h}{m}$$

z - zawartość wyrażona w mikromolach kwasu chlorogenowego w jednym gramie materiału roślinnego

c - stężenie odczytane z krzywej wzorcowej lub wyliczone ze wzoru krzywej regresji (μmole kwasu chlorogenowego cm⁻³ roztworu)

V- objętość ekstraktu (cm³)

m- masa naważki (g)

h - współczynnik uwzględniany we wzorze, gdy świeży materiał był tylko cięty, a nie homogenizowany

3.1.4. Oznaczanie zawartości orto-dwufenoli (o-DF)

Do oznaczania orto-dwufenoli stosowano metodę Johnsona i Schaala (1957) z użyciem odczynnika Arnowa (5 g azotynu sodowego i 5 g molibdenianu sodowego

rozpuszczonego w 50 cm³ wody destylowanej). Do 0,5 cm³ surowego wyciągu dodawano 0,5 cm³ HCl (0,5N), następnie 0,5 cm³ odczynnika Arnowa i 5 cm³ wody destylowanej. Bezpośrednio przed odczytem transmisji (ok. 30 s) dodawano 1 cm³ NaOH (1N). Transmisję mierzono przy długości fali $\lambda=515$ nm. Odczynnik Arnowa ze względu na jego krótką trwałość przygotowano bezpośrednio przed analizą. Stężenie o-DF odczytywano z krzywej wzorcowej, która była przygotowywana również na bazie kwasu chlorogenowego. Zawartość obliczano z analogicznego wzoru jak SF.

3.1.5. Oznaczanie zawartości meta-dwufenoli

Oznaczanie zawartości meta-dwufenoli (m-DF) wykonywano zgodnie z metodą podaną przez Swaina i Hillisa (1959). Surowy etanolowy wyciąg był rozcieńczany tak, aby w próbce nie było więcej niż 0,1 cm³ alkoholu. Z rozcieńczonego wyciągu pobierano po 0,5 cm³ do kolbek stożkowych i dodawano 1,5 cm³ wody destylowanej. Następnie w ciągu 10-15 sek. dodawano 4 cm³ roztworu waniliny (1 g waniliny rozpuszczonej w 100 cm³ 70% kwasu siarkowego, przygotowywany w przeddzień pomiarów). Kolbki wytrząsano w zimnej łaźni wodnej, tak aby temperatura nie wzrosła powyżej 35°C. Po dokładnym wymieszaniu, kolbki pozostawiono w temperaturze pokojowej na dokładnie 15 min. Pomiar transmisji dokonywano względem próby kontrolnej (4 cm³ odczynnika waniliny i 2 cm³ wody) przy długości fali $\lambda=500$ nm. Krzywą wzorcową przygotowano na bazie katechiny. Zawartość obliczano ze wzoru analogicznego jak SF i przedstawiano jako μmol katechiny w 1g materiału roślinnego.

3.1.6. Oznaczanie zawartości fenoli nierozpuszczalnych

Zawartość fenoli nierozpuszczalnych oznaczano metodą opisaną przez Stracka i in. (1989). Pozostałość po ekstrakcji fenoli rozpuszczalnych homogenizowano w niewielkiej ilości metanolu i przenoszono do probówek wirówkowych, dodając resztę metanolu do całkowitej objętości 10 cm³. Wytrząsano przez 15 min i odwirowano. Roztwór zlewano i 3 krotnie dodawano po 10 cm³ wody destylowanej, wytrząsano przez 15 min i wirowano. Czynności te (wytrząsanie i wirowanie) powtarzano dodając pięciokrotnie metanol, dwukrotnie aceton i dwukrotnie etanol. Pozostałość suszono w 60°C przez 1 godzinę i przenoszono do zwykłej probówki. Dodawano do niej 4 cm³ gorącego (80°C) roztworu 1,0 M wodorotlenku sodowego, po wymieszaniu probówki pozostawiono do następnego dnia na wytrząsarce. Po odwirowaniu pobierano 1,0 cm³ roztworu, dodając w celu zakwaszenia 0,1 cm³ kwasu ortofosforowego. Dalszy tok analizy przebiegał podobnie jak w przypadku oznaczania zawartości sumy rozpuszczalnych związków fenolowych.

3.1.7. Analiza histochemiczna igieł

W celu wykazania obecności tanin stosowano metodę Johanssona (1940), gdzie igły były traktowane 10% wodnym roztworem FeCl₂ przez 10 min lub metodę Jensena (1962), gdzie igły traktowano 1,0% roztworem siarczynu lub chlorku żelazowego w 0,1N HCl. Następną procedurą było umieszczanie igieł w 10% formalinie zawierającej 2,0% siarczanu żelazowego. Po przesączeniu i osuszeniu w parafinie, igły były cięte przy pomocy mikrotomu na 10 μm skrawki. W obu metodach niebieskie strącenia wskazują na obecność tanin. Do wykazania obecności tanin katecholowych stosowano metodę Jensena (1962). Świeże skrawki były traktowane równymi objętościami odczynników w następującej kolejności: 10% roztworem azotanu sodu, 20% roztworem mocznika, 10% kwasem octowym i po 3-4 minutach 2 N roztworem wodorotlenkiem sodu. Intensywność

czerwonego zabarwienia komórek miększu świadczyła o zawartości fenoli. Dla wykazania obecności polifenoli, skrawki były podbarwiane w błękitie toluidynowym w kwaśnym buforze o pH 4,0 według metody podanej przez Federa i O'Brien (1968). Stopień lignifikacji był określany przy pomocy reakcji Wiesnera (floroglucinol + HCl), a suberinizacji przez podbarwienie Sudanem IV, według Jensena (1962).

3.2. Inne pomiary zastosowane w badaniach.

3.2.1. Pomiary natężenia fotosyntezy netto, oddychania ciemniowego i transpiracji dokonywane były przy pomocy przenośnego analizatora gazowego w podczerwieni LCA-3 (Analytical Development Corporation - /ADC/ Hoddesdon; Anglia) i kamer Parkinsona PLC-B dla fotosyntezy i PLC-C dla oddychania. Wyniki przeliczane były na powierzchnię według wzorów podanych przez Oleksyna i wsp. (1992)

3.2.2. Zawartość cukrów niestrukturalnych określano nieznacznie zmodyfikowanymi metodami, opisanymi przez Haissiga i Dicksona (1979) oraz Hansena i Møllera (1975). Cukry rozpuszczalne ekstrahowano z igieł mieszaniną metanol-chloroform-woda, a w pozostałości - skrobię przekształcano do glukozy, drogą hydrolizy przy pomocy amyloglukozydazy i utleniano przy użyciu kompleksu peroksydaza - oksydaza glukozydowa. Stężenie cukrów oznaczano kolorymetrycznie, wykorzystując spektrofotometr Beckman 610, po przeprowadzeniu reakcji barwnych z anthronem (cukry rozpuszczalne) i dianizydyną (skrobia).

3.2.3. Zawartość azotu określana była metodą Kjeldahla przy użyciu aparatury Buchi 322.

3.2.4. Zawartość siarki określano metodą chromatografii gazowej z rozróżnieniem na siarkę organiczną i nieorganiczną stosując chromatograf (Dionex 2000i).

3.2.5. Zawartość fluoru oznaczano potencjometrycznie przy zastosowaniu elektrody jonowymiennej metodą opisaną przez Roosta i Sigga (1978).

3.2.5. Zawartość takich pierwiastków jak: fosfor, potas, wapń, magnez, mangan, żelazo, bor, miedź, cynk, glin, ołów, kadm, chrom, nikiel i kobalt, wyznaczana była przy pomocy spektrometru absorpcji plazmowej (ICP Emission Spectrometr Liberty 200 - Varian).¹

3.2.6. Pomiary powierzchni igieł i korzeni wykonano przy zastosowaniu układu do pomiaru powierzchni AgVision firmy Decagon Devices, USA.

3.3. Metody statystyczne

W pracy wnioskowanie statystyczne oparto na dwóch podstawowych metodach: analizie wariancji i istotności współczynników korelacji. W jednym przypadku zastosowano analizę grupowania metodą Warda. Do obliczeń używano przede wszystkim programu Statistix 4,0, a także w przypadkach bardziej skomplikowanych modeli analizy wariancji i w analizie grupowania, programu Statistica 5,0.

¹ Zawartość pierwiastków w materiale roślinnym oznaczano we współpracy z dr L.O. De Temmermanem. Badania przeprowadzono w Instytucie Badań Chemicznych w Tervuren (Belgia). Metody zostały bardziej szczegółowo opisane w pracy (Giertych i in. 1997)

4. WYNIKI

4.1. Kinetyka i charakter zmian zawartości związków fenolowych pod wpływem różnych zanieczyszczeń - toksycznych gazów i metali.

4.1.1. Cel

Celem opisywanych poniżej doświadczeń było określenie w jaki sposób zanieczyszczenie środowiska wpływa na zawartości związków fenolowych. Starano się stwierdzić czy różne czynniki działają podobnie oraz czy zmiany zawartości fenoli w warunkach terenowych mają podobny charakter jak te, które obserwujemy w doświadczeniach laboratoryjnych. Ze względu na brak wystarczających danych literaturowych koniecznym było również określenie zmienności sezonowej w poziomie związków fenolowych, zarówno w warunkach stresowych jak i kontrolnych. Wykonano szereg doświadczeń terenowych i laboratoryjnych, w których przebadano wpływ następujących czynników: SO_2 , jonów toksycznych metali (Al, Cd, Mn, Pb) - w warunkach laboratoryjnych oraz wpływ skażenia związkami siarki, fluoru i glinu - w warunkach terenowych.

4.1.1.1. Wpływ SO_2 na zawartość fenoli u siewek sosny

Wykonano trzy doświadczenia, w których w warunkach kontrolowanych badano oddziaływanie dwutlenku siarki na zmiany zawartości fenoli. W pierwszym doświadczeniu zastosowano zmienne stężenia SO_2 przy stałym czasie ekspozycji. W drugim doświadczeniu zmienną był czas, a stężenie gazu utrzymywano na stałym poziomie. W kolejnych badaniach zmniejszono dawkę SO_2 do poziomu spotykanego w terenach

skażonych, przy jednoczesnym wydłużeniu czasu ekspozycji.

4.1.1.1.1. Doświadczenie I - wpływ stężenia SO₂ na siewki sosny

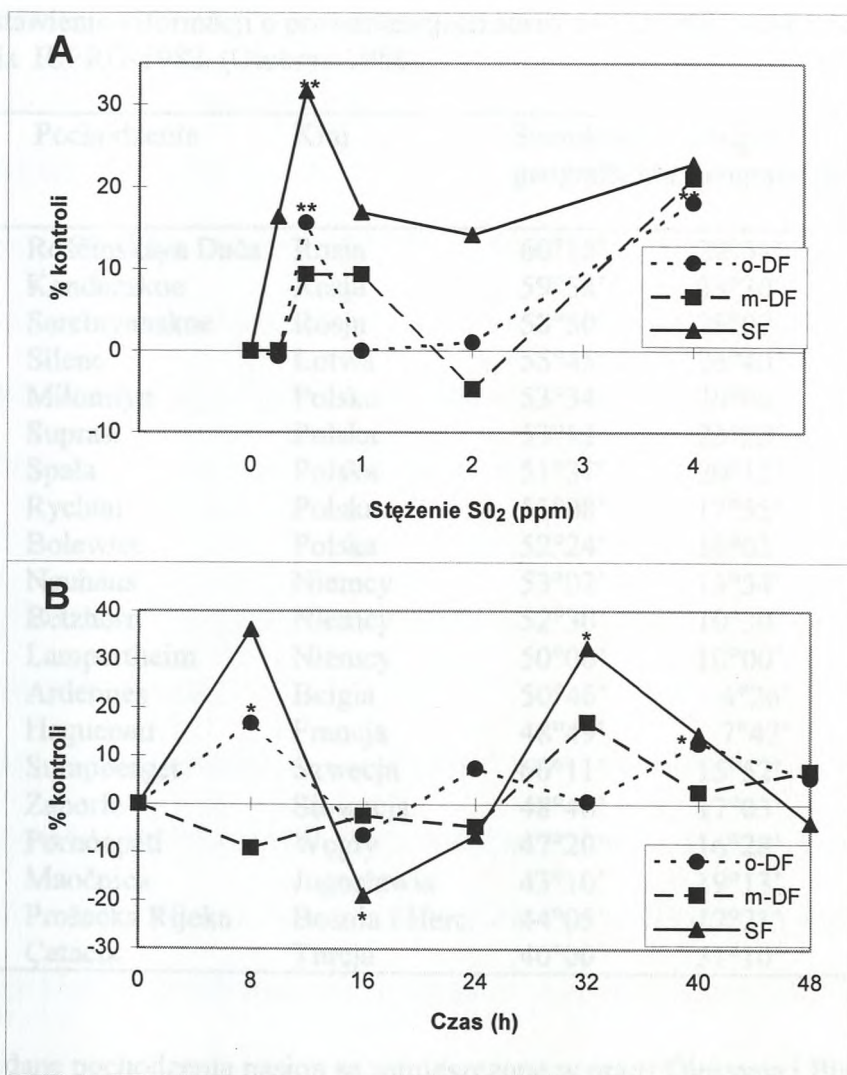
4.1.1.1.1.1. Materiał i metody

Kilkumiesięczne siewki sosny zwyczajnej zostały wyhodowane w warunkach szklarniowych z nasion zebranych z drzew klonu, oznaczanego w Instytucie Dendrologii PAN numerem K-11-03, z plantacji nasiennej w lesie doświadczalnym „Zwierzyniec” koło Kórnika. Nasiona na początku maja wysiano pojedynczo do doniczek w podłoże składające się z gleby leśnej zmieszanej z torfem (3:1). Siewki poddano krótkotrwałemu (6 h) działaniu SO₂ w jednym z następujących stężeń: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 i 4,0 ppm. Codziennie inna partia siewek była ekspozowana na gaz o określonym powyżej stężeniu. Eksperyment przeprowadzono w październiku w ciągu jednego tygodnia, a grupa siewek kontrolnych analizowana była tylko pierwszego dnia. Ekspozycję przeprowadzano w specjalnych komorach z regulowaną wilgotnością, oświetleniem, temperaturą oraz stężeniem gazu, opisanych w pracach Białoboka i wsp. (1978), Karolewskiego (1983), Giertycha i Karolewskiego (1993). Podczas eksperymentu stosowano naturalne oświetlenie (184-322 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperaturę w komorach utrzymywano w granicach 18-24°C, a wilgotność względną w zakresie 65-80%. Każdy wariant doświadczenia reprezentowany był przez 5 siewek (powtórzenia). Badano zawartość fenoli rozpuszczalnych w następujących grupach: orto-dwufenole (o-DF), meta-dwufenole (m-DF) i suma związków fenolowych (SF).

Ryc. 3. Zmiany zawartości związków fenolowych (o-DF, m-DF i SF) w igłach sosny zwyczajnej wywołane działaniem SO₂ przy różnych stężeniach gazu (A) i różnym czasie traktowania (B), średnie dla obu badanych populacji, w stosunku do kontroli. ** - p < 0,05; * - p < 0,1.

4.1.1.1.1.2. Wyniki

Wyniki tego doświadczenia wskazują, że działanie dwutlenku siarki na bardzo młode, kilkumiesięczne siewki sosny powoduje zmiany zawartości o-DF i SF. Nie stwierdzono istotnych zmian w zawartości m-DF. Kierunek tych zmian jest podobny u wszystkich badanych grup fenoli i nie ma on charakteru liniowego. Wzrost zawartości był obserwowany przy stężeniach 0,5 i 4,0 ppm SO₂, natomiast poziom fenoli w igłach po działaniu SO₂ w stężeniach 0,25; 1,0 i 2,0 ppm nie odbiegał istotnie od kontroli (Ryc. 3A).



Ryc. 3. Zmiany zawartości związków fenolowych (o-DF, m-DF i SF) w igłach sosny zwyczajnej wywołane działaniem SO₂ przy różnych stężeniach gazu (A) i różnym czasie traktowania (B), średnie dla obu badanych populacji, w stosunku do kontroli. ** - $p < 0.05$; * - $p < 0.1$.



4.1.1.1.2. Doświadczenie II - wpływ czasu ekspozycji

4.1.1.1.2.1. Materiał i metody

W doświadczeniu użyto 2 letnie siewki sosny zwyczajnej dwóch europejskich proveniencji (nr 9 Bolewice - Polska i nr 15 Sumpberget - Szwecja). Nasiona zostały zebrane w ramach doświadczenia IUFRO -1982, a podawane numery odpowiadają numeracji przyjętej w tym doświadczeniu (Tab. 1).

Tabela 1. Zestawienie informacji o proveniencjach sosny zwyczajnej rosnących w ramach doświadczenia IUFRO-1982. (Oleksyn 1988).

Numer Proveniencji	Pochodzenie	Kraj	Szerokość geograficzna	Długość geograficzna	Wysokość nad poziom morza (m)
1	Roščinskaya Dača	Rosja	60°15'	29°54'	80
2	Kondežskoe	Rosja	59°58'	33°30'	70
3	Serebrianskoe	Rosja	58°50'	29°07'	80
4	Silene	Łotwa	55°45'	26°40'	165
5	Miłomłyn	Polska	53°34'	20°00'	110
6	Supraśl	Polska	53°12'	23°22'	160
7	Spała	Polska	51°37'	20°12'	160
8	Rychtal	Polska	51°08'	17°55'	190
9	Bolewice	Polska	52°24'	16°03'	90
10	Neuhaus	Niemcy	53°02'	13°54'	40
11	Betzhorn	Niemcy	52°30'	10°30'	650
12	Lampertheim	Niemcy	50°00'	10°00'	95-100
13	Ardenes	Belgia	50°46'	4°26'	110
14	Haguenau	Francja	48°49'	7°47'	130-180
15	Sumpberget	Szwecja	60°11'	15°52'	185
16	Zahorie	Słowacja	48°46'	17°03'	160
17	Pornóapáti	Węgry	47°20'	16°28'	400
18	Maočnica	Jugosławia	43°10'	19°13'	1200
19	Prošacka Rijeka	Bośnia i Herc.	44°05'	17°21'	800-970
20	Çatacik	Turcja	40°00'	31°10'	1380-1420

Szczegółowe dane pochodzenia nasion są zamieszczone w pracy Oleksyna i Białoboka (1986). Proveniencje różnią się wrażliwością na zanieczyszczenia przemysłowe (Oleksyn i in. 1988). Siewki zostały poddane działaniu dwutlenku siarki w stężeniu 0,75 ppm w analogicznych warunkach jak w poprzednim doświadczeniu. Eksperyment trwał 48 godzin,

co osiem godzin pobierano do analiz po 4 siewki poddawane wpływowi gazu i 4 kontrolne z każdej proveniencji. Ekstrakcję przeprowadzono bezpośrednio po zebraniu igieł.

Zawartość o-DF, m-DF i SF analizowano podobnie jak w poprzednim doświadczeniu.

4.1.1.1.2.2. Wyniki

Populacje różniły się poziomem fenoli, przy czym siewki proveniencji tolerancyjnej miały większą zawartość fenoli we wszystkich badanych grupach tych związków. Nie stwierdzono istotnych zmian zawartości fenoli u populacji tolerancyjnej, natomiast u populacji wrażliwej dwutlenek siarki powodował istotne względem kontroli zmiany w zawartości o-DF i SF. Charakter tych zmian był podobny do tych jakie stwierdzono w pierwszym z opisywanych doświadczeń. Rośliny poddane mniejszej dawce gazu - krótszej ekspozycji, wykazywały wzrost zawartości, następnie po dłuższej ekspozycji stwierdzono spadek i ponowny wzrost zawartości fenoli (Ryc. 3B). Wyniki obu doświadczeń zostały opublikowane w pracy Giertycha i Karolewskiego (1993).

4.1.1.1.3. Doświadczenie III - wpływ SO₂ na siewki sosny o zróżnicowanej wrażliwości

4.1.1.1.3.1. Materiał i metody

W kolejnym doświadczeniu do badań użyto 2-letnie siewki będące potomstwem uzyskanym w wyniku kontrolowanych krzyżowań trzech klonów sosny zwyczajnej, o różnym stopniu wrażliwości na zanieczyszczenia przemysłowe (Białobok i Karolewski 1978). Kolekcja klonów została założona ze szczepów zebranych, w pobliżu hut na Górnym Śląsku, z drzew różniących się tolerancją na zanieczyszczenia - od zamierających do nie wykazujących widocznych objawów uszkodzeń (Rachwał 1996). Do analiz wybrano trzy klony: wrażliwy - nr 9, tolerancyjny - nr 4 i o właściwościach pośrednich - nr 6. Na drzewach tych trzech klonów przeprowadzono kontrolowane zapylenie, krzyżując je

między sobą. Po dwóch latach zebrano nasiona, z których otrzymano siewki stanowiące materiał wyjściowy dla szeregu doświadczeń laboratoryjnych, przy czym wyniki odnoszone były zwykle do drzew matecznych, na których przeprowadzano analogiczne analizy. Nasiona zostały wysiane w szklarni do doniczek w podłoże gleba leśna : torf (3:1). Po ok. 6 miesiącach przesadzono siewki pojedynczo do doniczek z analogicznym podłożem, umieszczając je na wolnym powietrzu.

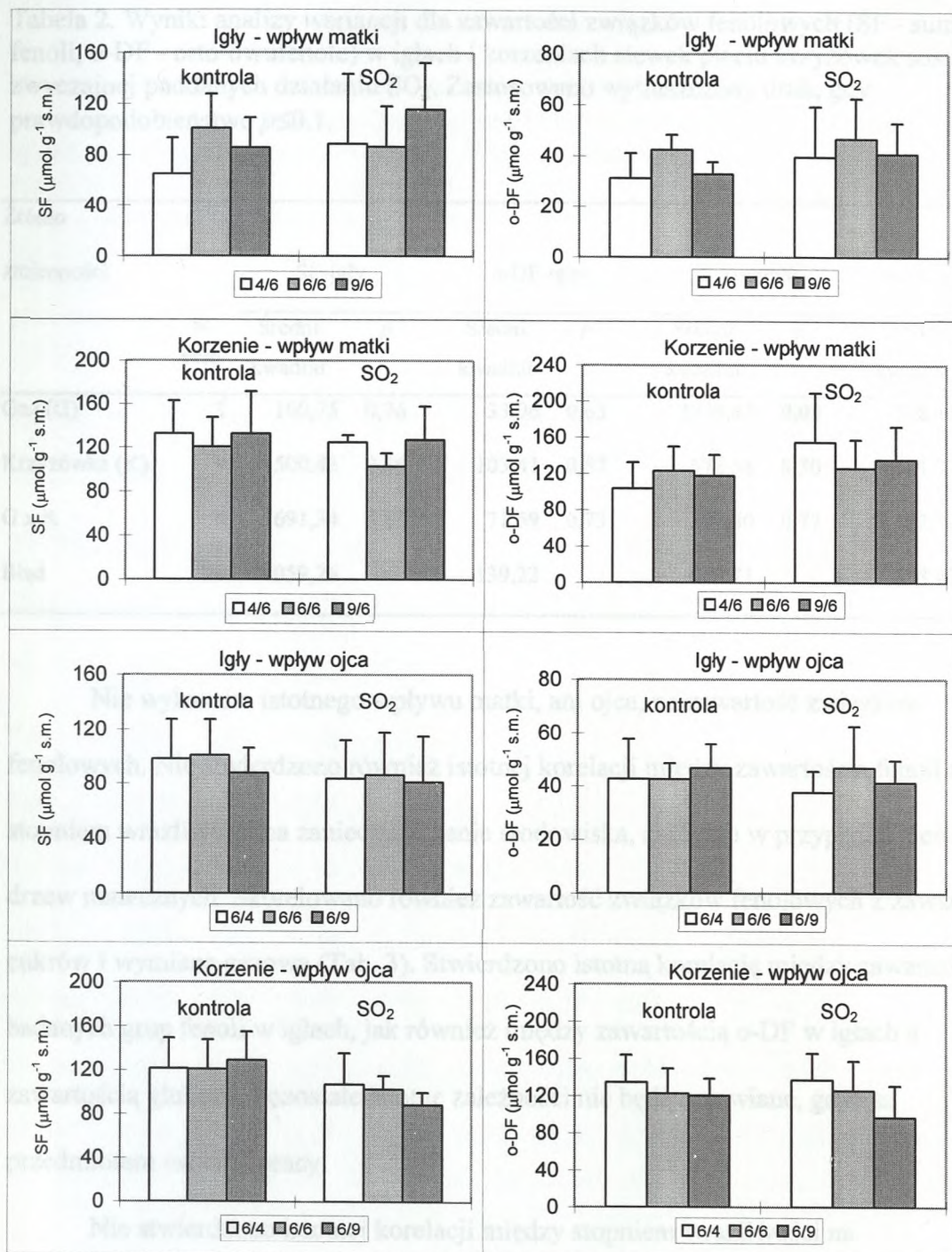
Dysponowano dwoma seriami siewek z kontrolowanych krzyżówek - pierwsza, na której przebadano wpływ matki (3 matki x 1 ojciec; 4/6, 6/6, 9/6) i druga do badania wpływu ojca (1 matka x 3 ojców; 6/4, 6/6^{*}, 6/9), łącznie było to 5 wariantów krzyżówek. Siewki eksponowano na działanie SO₂ o stężeniu 0.25 ppm przez 72 godziny. Każdy wariant doświadczenia reprezentowały 3 siewki (powtórzenia). Analizy dokonywano zarówno w igłach, jak i w korzeniach. Oprócz zawartości orto-dwufenoli i sumy fenoli, które we wszystkich omawianych tutaj wielowątkowych doświadczeniach były przedmiotem moich badań, oznaczano także, na tym samym materiale zawartość cukrów niestrukturalnych (rozpuszczalnych i skrobi) oraz mierzono natężenie fotosyntezy netto (P_N) i oddychania ciemniowego (R_D).

4.1.1.1.3.2. Wyniki

Po 72-godzinnej ekspozycji siewek sosny na działanie dwutlenku siarki, nie stwierdzono widocznych objawów uszkodzeń igieł takich, jak chlorozy czy nekrozy. Otrzymane wyniki pomiarów zawartości fenoli przedstawiono na Ryc. 4.

Pomiędzy zawartością fenoli w igłach siewek poddanych działaniu gazu i siewek kontrolnych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Natomiast istotnie mniejszym poziomem fenoli charakteryzowały się korzenie siewek poddanych działaniu SO₂ (Tab. 2).

* Krzyżówka 6/6 są to te same siewki, które były analizowane przy wpływie matki.



Ryc 4. Średnie oraz odchylenia standardowe zawartości związków fenolowych (SF i o-DF) w igłach i korzeniach, otrzymane w wyniku działania SO₂ na siewki sosny zwyczajnej pochodzące z kontrolowanych krzyżówek trzech klonów o zróżnicowanej wrażliwości na skażenia (4 - tolerancyjny; 6 - pośredni; 9 - wrażliwy). Przedstawiono osobno wpływ matki i ojca, oraz wyrażono w µmolach kwasu chlorogenowego na g suchej masy.

Tabela 2. Wyniki analizy wariancji dla zawartości związków fenolowych (SF - suma fenoli, o-DF - orto-dwufenole) w igłach i korzeniach siewek pięciu krzyżówek sosny zwyczajnej poddanych działaniu SO₂. Zastosowano wytłuszczony druk, gdy prawdopodobieństwo $p \leq 0.1$.

Zmienneści	St. swob.	SF-igły		o-DF-igły		SF-korzenie		o-DF-korzenie	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
		Gaz (G)	1	100,75	0,76	33,96	0,63	2253,45	0,08
Krzyżówka (K)	4	500,43	0,76	103,41	0,57	578,58	0,50	601,32	0,21
G x K	4	691,34	0,63	71,59	0,73	297,40	0,77	1102,12	0,05
Błąd	20	1059,26		139,22		660,71		378,47	

Nie wykazano istotnego wpływu matki, ani ojca, na zawartość związków fenolowych. Nie stwierdzono również istotnej korelacji między zawartością fenoli a stopniem wrażliwości na zanieczyszczenie środowiska, zarówno w przypadku siewek jak i drzew matecznych. Skorelowano również zawartość związków fenolowych z zawartością cukrów i wymianą gazową (Tab. 3). Stwierdzono istotną korelację między zawartością obu badanych grup fenoli w igłach, jak również między zawartością o-DF w igłach a zawartością glukozy. Pozostałe istotne zależności nie będą omawiane, gdyż są przedmiotem osobnej pracy.

Nie stwierdzono istotnej korelacji między stopniem wrażliwości na zanieczyszczenia a zawartością związków fenolowych w igłach siewek i drzewach matecznych. Najwięcej fenoli zawierały igły średnio wrażliwego klonu. Brak istotnych zmian może być wynikiem stosunkowo niewielkiej dawki dwutlenku siarki jaka została zastosowana w tym doświadczeniu. Szczegółowe wyniki tego doświadczenia zostały zamieszczone w sprawozdaniu z grantu KBN (1997), są także przygotowywane do druku.

Tabela 3. Tablica współczynników korelacji (N=30) między zawartością związków fenolowych, a natężeniem wymiany gazowej i zawartością cukrów (orto-dwufenole w igłach - o-DFig, suma fenoli w igłach - SFig, orto-dwufenole w korzeniach - o-DFko, suma fenoli w korzeniach - SFko, natężenie fotosyntezy netto - P_N, oddychanie ciemniowe igieł - R_Dig -, oddychanie korzeni - R_Dko, stosunek fotosyntezy do oddychania igieł P_N/R_Dig, glukoza w igłach - GLUig, skrobia w igłach - SKRig, glukoza w korzeniach -GLUko, skrobia w korzeniach - SKRko). Zastosowano wytłuszczony druk, gdy prawdopodobieństwo $p \leq 0.05$.

Zmienna	o-DFig	SFig	o-DFko	SFko	P _N	R _D ig	R _D ko	P _N /R _D ig	GLUig	SKRig	GLUko	SKRko
SFig	0,83											
o-DFko	-0,10	-0,10										
SFko	-0,12	0,00	0,28									
P _N	-0,14	0,07	-0,20	0,12								
R _D ig	-0,11	0,05	-0,26	-0,04	0,73							
R _D ko	-0,20	-0,24	-0,14	0,14	0,13	0,02						
P _N /R _D ig	-0,13	0,02	-0,13	0,11	0,91	0,41	0,22					
GLUig	0,38	0,27	0,08	0,33	-0,30	-0,30	-0,10	-0,26				
SKRig	-0,00	-0,00	-0,09	-0,04	-0,16	-0,39	0,06	0,05	-0,06			
GLUko	0,01	-0,15	0,10	-0,22	-0,54	-0,38	-0,04	-0,47	0,22	0,06		
SKRko	0,05	-0,03	0,18	0,12	-0,19	-0,10	0,03	-0,17	0,05	0,28	0,13	

4.1.1.2. Wpływ jonów toksycznych metali na zawartość fenoli u siewek sosny

Wykonano dwa doświadczenia hydroponiczne, w których badano wpływ jonów metali na dwuletnie siewki sosny zwyczajnej. W pierwszym doświadczeniu analizowano wpływ jonów czterech metali (glinu, manganu, ołowiu i kadmu) o zróżnicowanych stężeniach. W drugim badano wpływ długotrwałego oddziaływania azotanu glinu.

4.1.1.2.1 Doświadczenie I - wpływ jonów glinu, manganu, ołowiu i kadmu

4.1.1.2.1.1. Materiał i metody

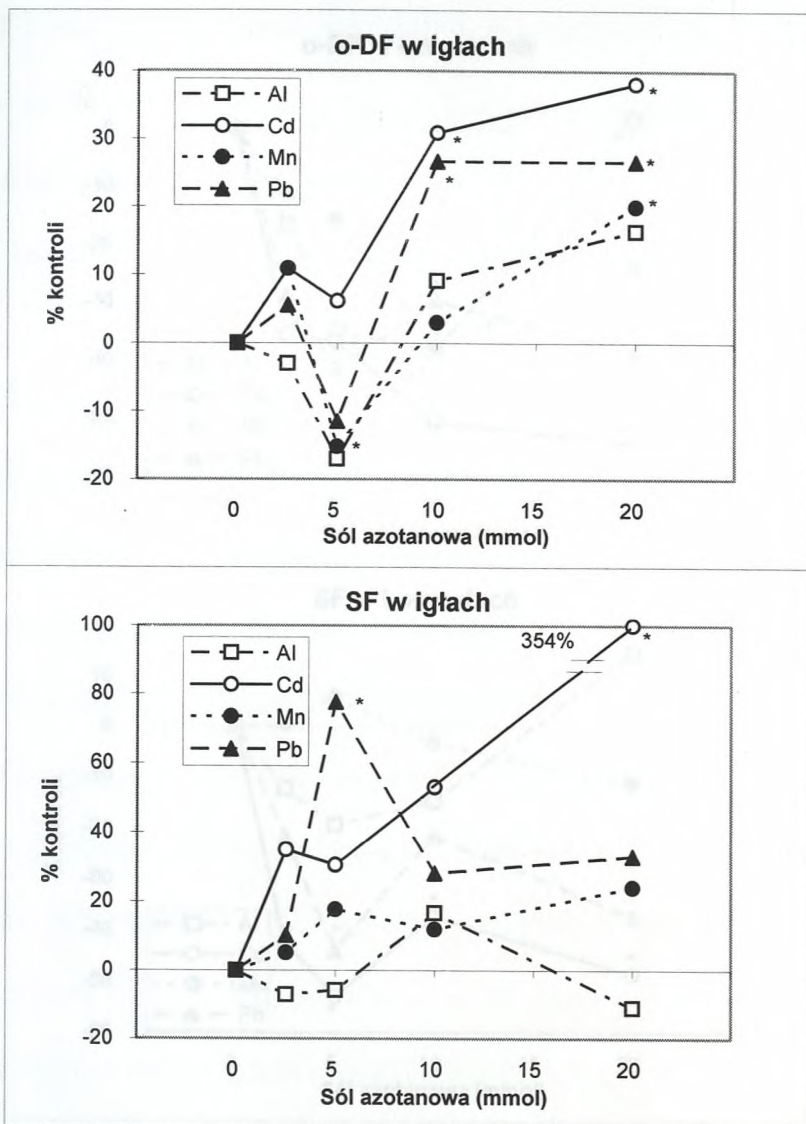
Jednoroczne siewki sosny zwyczajnej pochodzące ze szkółki produkcyjnej hodowano w kulturze hydroponicznej, w warunkach szklarniowych. W maju siewki zostały przeniesione ze szkółki do szklarni i po przepłukaniu korzeni w wodzie destylowanej umieszczono po 20 siewek w 8-litrowych pojemnikach z wodą destylowaną na okres dwóch dni. Następnie wodę zamieniono na pożywkę, przygotowaną na bazie nawozu o nazwie handlowej „Nowokont” i zawierającą następujące ilości poszczególnych składników (w mg dm^{-3}): azot (N) - 140, fosfor (P_2O_5) - 25, potas (K_2O) - 110, wapń (CaO) - 55, magnez (MgO) - 20, siarka (SO_4) - 5, żelazo (Fe) - 0,145, mangan (Mn) - 0,02, bor (B) - 0,015, cynk (Zn) - 0,01, miedź (Cu) - 0,01 i molibden (Mo) - 0,005. Pożywka miała pH 4,2, które było uzyskiwane przez dodawanie odpowiedniej ilości kwasu siarkowego. Co siedem dni pożywka w pojemnikach była zmieniana. Codziennie przez 0,5 h przeprowadzano napowietrzanie pojemników z siewkami. Po okresie ok. 2 miesięcy wzrostu siewki zostały umieszczone pojedynczo w szklanych, 0,25 l pojemnikach, z roztworami azotanów czterech metali: glinu, manganu, ołowiu i kadmu. Zastosowano następujące stężenia: 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; i 20,0 mM dm^{-3} oraz wodę destylowaną - jako kontrolę. Każdy wariant eksperymentu reprezentowany był przez 4 siewki. W czasie trwania hodowli, jak również podczas traktowania roztworami azotanów, korzenie umieszczone w pojemnikach izolowane były od dostępu światła. Siewki poddawano działaniu soli przez 4 dni. Po tym okresie korzenie przepłukano wodą destylowaną i podsuszono bibułą. Następnie mierzono oddychanie korzeni dla wszystkich wariantów stężeniowych przy pomocy analizatora gazowego w podczerwieni ADC. Wyniki przeliczono na $\text{nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ suchej masy. Ponieważ te same próbki korzeni służyły do

określenia oddychania i pomiarów zawartości fenoli, konieczne było eksperymentalne określenie przelicznika: świeża - sucha masa. W tym celu wykonano pomiary świeżej i suchej masy dla kilku próbek. Zawartość związków fenolowych, z rozróżnieniem na sumę fenoli i orto-dwufenole, określano w świeżej masie korzeni i igieł siewek. Analiza zawartości fenoli nie była przeprowadzona dla wariantu doświadczalnego o najmniejszym ($1,0 \text{ mM dcm}^{-3}$) stężeniu soli.

4.1.1.2.1.2. Wyniki

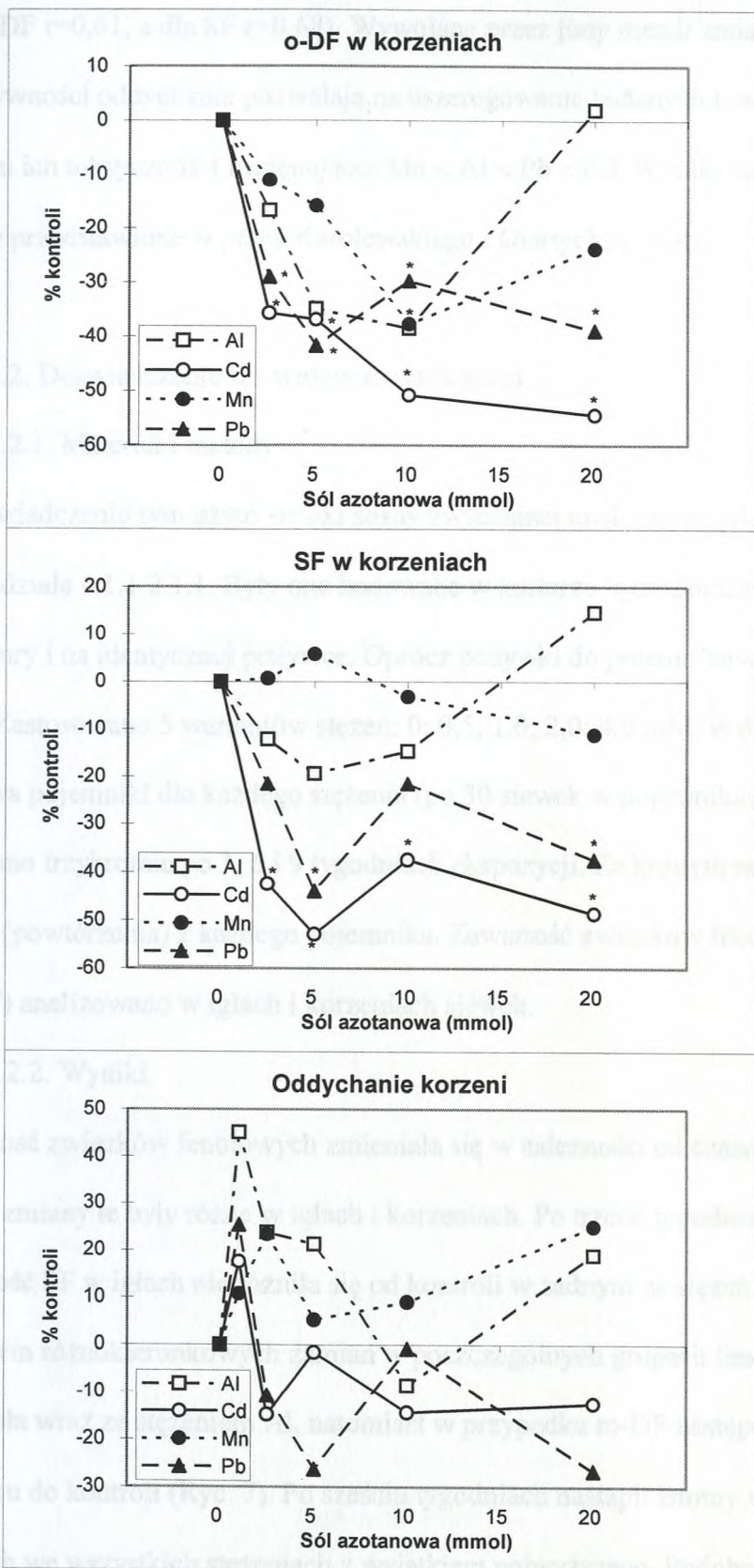
Wpływ soli azotanowych na zawartość związków fenolowych był zależny od rodzaju metalu, stężenia jego jonów i fragmentu analizowanej rośliny. Działanie jonów metali nie miało charakteru liniowego (Ryc. 5). Dla jonów Cd, Pb i Mn zawartość o-DF w igłach przy stężeniu roztworu soli 2,5mM była nieznacznie większa niż w kontroli. Roztwór o kolejno wyższym stężeniu powodował spadek zawartości o-DF dla wszystkich badanych jonów, a w przypadku Pb, Mn i Al nawet poniżej poziomu kontroli. Przy wyższych stężeniach (10 i 20 mM) stwierdzono wzrost poziomu o-DF powyżej kontroli. Wpływ jonów metali na zawartości SF w igłach nie był tak jednoznaczny. Jony Al nie wywołały istotnych zmian, podobnie Mn, z tym że stwierdzono nieznaczny wzrost SF wraz ze wzrostem stężenia jonów tego metalu. Największy wzrost poziomu SF stwierdzono w przypadku wpływu jonów Cd.

Zupełnie odmienna była reakcja korzeni (Ryc. 6). Jony wszystkich badanych metali przy niższych stężeniach ich roztworów powodowały spadek zawartości o-DF, podczas gdy przy wyższych stężeniach zawartość była na niskim poziomie (Cd i Pb) lub wzrastała (Al i Mn). Bardzo podobna była reakcja w zmianach zawartości SF, wyjątek stanowiły jony Mn, które nie wywołały znacznych różnic w poziomie fenoli.



Ryc. 5. Zmiany zawartości fenoli (SF i o-DF), w stosunku do kontroli, w igłach siewek sosny poddanych działaniu soli azotanowych: glinu, kadmu, manganu i ołowiu. Gwiazdka oznacza istotność różnic względem kontroli dla danego stężenia na poziomie $p < 0,05$.

Jony metali powodowały również zmiany w natężeniu oddychania ciemniowego (Ryc. 6). Charakter tych zmian był podobny u wszystkich jonów. Odnotowano wzrost w stężeniach najniższych, spadek w średnich (nawet poniżej poziomu w kontroli) i ponowny wzrost w wyższych stężeniach soli. W przypadku bardziej toksycznych jonów tzn. kadmu i ołowiu, w stężeniach najwyższych zanotowano kolejny spadek oddychania. Zawartość obu grup związków fenolowych jest istotnie skorelowana z wartościami oddychania korzeni



Ryc. 6. Zmiany zawartości fenoli (SF i o-DF) i oddychania korzeni, w stosunku do kontroli, w igłach siewek sosny poddanych działaniu soli azotanowych: glinu, kadmu, manganu i ołowiu. Gwiazdka oznacza istotność różnic względem kontroli dla danego stężenia na poziomie $p < 0,05$.

(dla o-DF $r=0,61$, a dla SF $r=0,68$). Wywołane przez jony metali zmiany zawartości fenoli i intensywności oddychania pozwalają na uszeregowanie badanych jonów w kierunku wzrostu ich toksyczności następująco: $Mn < Al < Pb < Cd$. Wyniki tego doświadczenia zostały przedstawione w pracy Karolewskiego i Giertycha (1994).

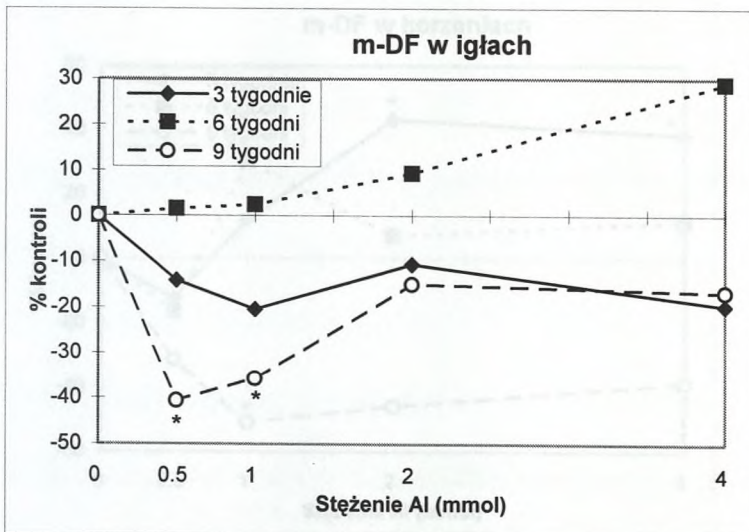
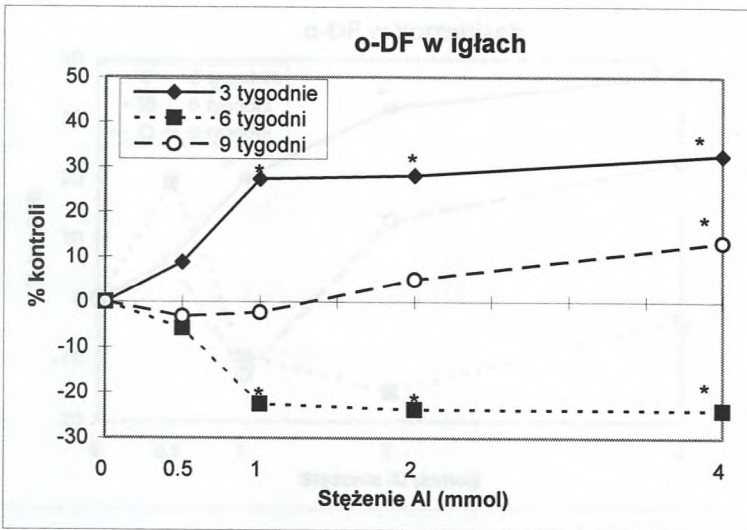
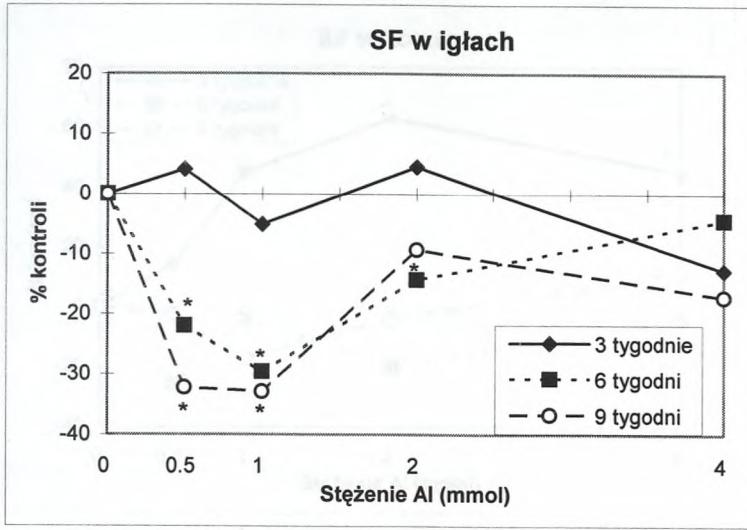
4.1.1.2.2. Doświadczenie II - wpływ azotanu glinu

4.1.1.2.2.1. Materiał i metody

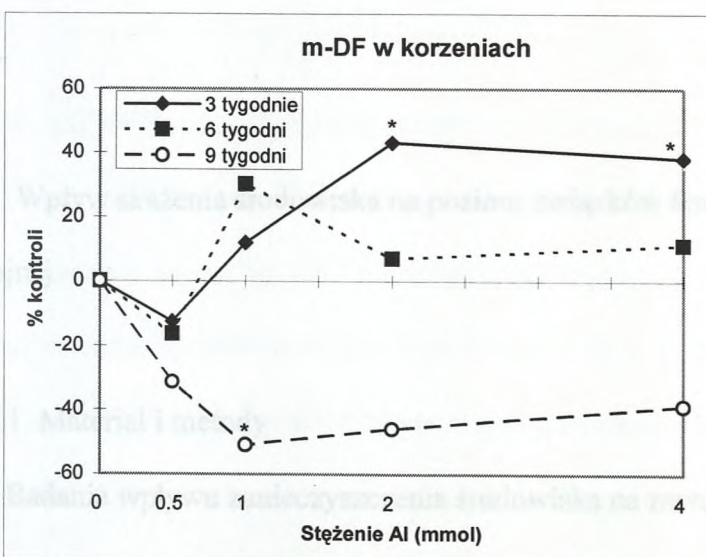
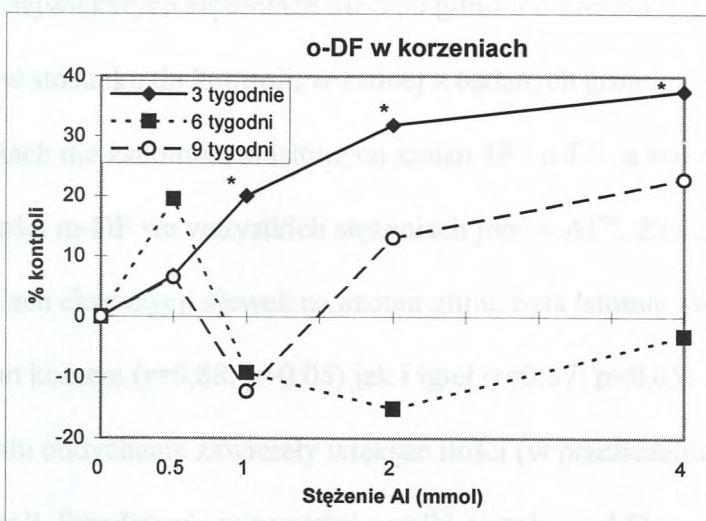
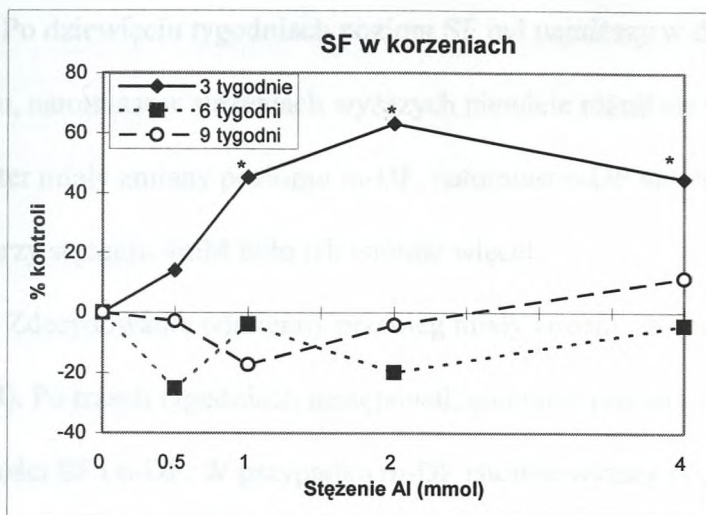
W doświadczeniu tym użyto siewki sosny zwyczajnej analogiczne jak te opisane w podrozdziale 4.1.1.2.1.1. Były one hodowane w kulturze hydroponicznej według tej samej procedury i na identycznej pożywce. Oprócz pożywki do pojemników dodawano azotan glinu. Zastosowano 5 wariantów stężeń: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mM, w dwóch powtórzeniach - po dwa pojemniki dla każdego stężenia (po 30 siewek w pojemniku). Materiał do analiz pobierano trzykrotnie po 3, 6 i 9 tygodniach ekspozycji. Za każdym razem pobierano po 2 siewki (powtórzenia) z każdego pojemnika. Zawartość związków fenolowych (o-DF, m-DF, SF) analizowano w igłach i korzeniach siewek.

4.1.1.2.2.2. Wyniki

Zawartość związków fenolowych zmieniała się w zależności od czasu i stężenia jonów Al^{+3} , a zmiany te były różne w igłach i korzeniach. Po trzech tygodniach ekspozycji siewek zawartość SF w igłach nie różniła się od kontroli w żadnym ze stężeń. Może to być wynikiem różnokierunkowych zmian w poszczególnych grupach fenoli. Zawartość o-DF wzrastała wraz ze stężeniem Al, natomiast w przypadku m-DF następował spadek w stosunku do kontroli (Ryc. 7). Po sześciu tygodniach nastąpił istotny spadek zawartości SF w igłach we wszystkich stężeniach z wyjątkiem najwyższego. Podobny spadek poziomu został zanotowany w przypadku o-DF. Zmiany m-DF były nieznaczne i tylko w najwyższym ze stężeń glinu był obserwowany istotny wzrost zawartości związków tej



Ryc. 7. Zmiany zawartości fenoli (SF; o-DF i m-DF) w igłach siewek sosny poddanych działaniu azotanu glinu przez okres 3; 6 i 9 tygodni. Gwiazdka oznacza istotność różnic względem kontroli na poziomie $p=0,05$.



Ryc. 8. Zmiany zawartości fenoli (SF; o-DF i m-DF) w korzeniach siewek sosny poddanych działaniu azotanu glinu przez okres 3; 6 i 9 tygodni. Gwiazdka oznacza istotność różnic względem kontroli na poziomie $p=0,05$.

grupy. Po dziewięciu tygodniach poziom SF był najniższy w dwóch mniejszych stężeniach azotanu, natomiast w stężeniach wyższych niewiele różnił się od kontroli. Bardzo podobny charakter miały zmiany poziomu m-DF, natomiast o-DF niewiele różniły się od kontroli i tylko przy stężeniu 4mM było ich istotnie więcej.

Zdecydowanie odmienny przebieg miały zmiany zawartości fenoli w korzeniach (Ryc. 8). Po trzech tygodniach następował, niemalże proporcjonalny do stężenia, wzrost zawartości SF i o-DF. W przypadku m-DF istotnie wyższy poziom stwierdzono przy dwóch największych stężeniach azotanu glinu. Po sześciu tygodniach nie było istotnych różnic w stosunku do kontroli, w żadnej z badanych grup fenoli. Natomiast po dziewięciu tygodniach nie zanotowano istotnych zmian SF i o-DF, a zaobserwowano spadek zawartości m-DF we wszystkich stężeniach jonów Al^{+3} . Zawartość o-DF po dziewięciu tygodniach ekspozycji siewek na azotan glinu, była istotnie skorelowana z oddychaniem zarówno korzeni ($r=0,88$; $p=0,05$) jak i igieł ($r=0,87$; $p=0,05$). Rośliny o wyższym natężeniu oddychania zawierały większe ilości (w przeliczeniu na jednostkę masy) ortodwufenoli. Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w pracy Oleksyna i wsp. (1996).

4.1.1.3. Wpływ skażenia środowiska na poziom związków fenolowych w igłach sosny zwyczajnej

4.1.1.3.1. Materiał i metody

Badania wpływu zanieczyszczenia środowiska na zawartość fenoli prowadzone były również w warunkach terenowych w Kórniku i w Luboniu. W obu tych miejscach, oddalonych od siebie o ok. 15 km zostały założone w 1984 roku powierzchnie doświadczalne z sosną zwyczajną. Pierwsza powierzchnia (kontrolna), na której

Tabela 4. Średnie wielkości emisji z Poznańskich Zakładów Nawozów Fosforowych w Luboniu: dwutlenku siarki (SO₂), związków fluoru (F) i tlenków azotu - NO_x (N₂O₅) w t r⁻¹, (informacje uzyskane w Dziale Technicznym PZNF na podstawie danych przygotowywanych dla Głównego Urzędu Statystycznego).

Rok	Emisja (tony/rok)		
	SO ₂	F	NO _x
1975	1531	66	608
1980	2608	162	850
1981	896	152	945
1982	501	169	0
1983	283	47	0
1984	267	36	0
1985	336	20	0
1986	478	30,1	17*
1987	654	24,3	21
1988	468	19,5	21
1989	445	18,4	11
1990	220	6,3	64
1991	127	2,3	17,6
1992	156	1,1	23
1993	116	0,91	13,6
1994	105	0,96	11,3
1995	115	1,14	15,6
1996	80	1,15	13,6

wysadzono 2-letnie siewki 20 europejskich proveniencji sosny (Tab. 1), zlokalizowana jest w lesie doświadczalnym "Zwierzyniec" koło Kórnik. Stanowi ona element międzynarodowego doświadczenia grupy roboczej „Scots pine provenance and breeding” działającej pod auspicjami *International Union of Forestry Research Organisations* (Oleksyn i Białobok 1986, Oleksyn 1988b). Druga powierzchnia z sosną zwyczajną tych samych pochodzeń, zlokalizowana jest w pobliżu (ok. 1,5 km) Poznańskich Zakładów Nawozów Fosforowych w Luboniu

k. Poznania (PZNF), emitujących do atmosfery dwutlenek siarki, tlenki azotu i związki fluoru. Powierzchnia ta była narażona przez długie lata na działanie zanieczyszczeń, fabryka nawozów istnieje od 1917 roku. W latach osiemdziesiątych obserwowano na tej powierzchni liczne uszkodzenia igieł (Karolewski 1990). W ostatnich latach skażenie zostało ograniczone (Tab. 4), gdyż na początku lat osiemdziesiątych zaprzestano produkcji kwasu siarkowego metodą nitrozową (znaczne zmniejszenie emisji tlenków azotu), spadła również produkcja nawozów, a latach w dziewięćdziesiątych całkowicie zrezygnowano z

* Od tego roku zmieniono metodę obliczania emisji, stąd w poprzednich czterech latach liczonych starą metodą, po zaprzestaniu dużych emisji w początku lat osiemdziesiątych, wyniki były zerowe.

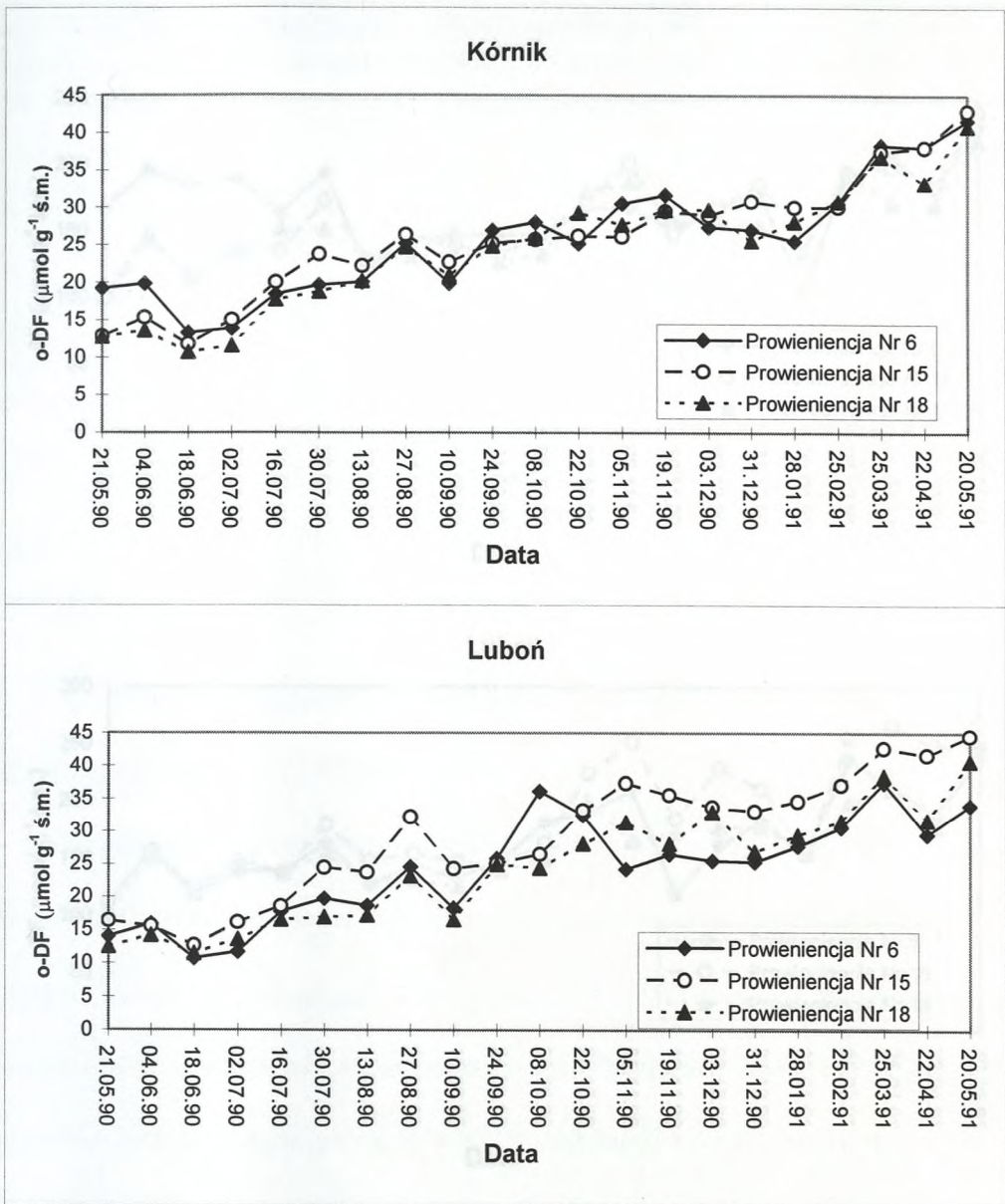
produkcji kwasu siarkowego, co związane było z emisją SO_2 , i zaprzestano wytwarzania superfosfatu granulowanego, w toku produkcji którego wydzielane były do atmosfery związki fluoru.

Gleba pozostaje jednak nadal w dużym stopniu skażona. Wyraża się to przede wszystkim obniżonym pH, a przez to większą dostępnością dla roślin takich pierwiastków jak glin czy mangan (Reich i in. 1994). Gleba na powierzchni skażonej charakteryzuje się również większą zawartością dostępnego dla roślin fluoru - dane własne (Sprawozdanie z grantu KBN 1997). Widoczne objawy uszkodzeń igieł (nekrozy), spowodowane przez zanieczyszczenia powietrza, obserwuje się teraz sporadycznie i to przede wszystkim na starszych igłach, w których akumulują się, powodujące powstawanie nekroz, toksyczne pierwiastki takie jak glin czy fluor (Giertych i in. 1997).

W przeciągu jednego roku (maj 1990/ maj 1991) prowadzone były analizy zawartości o-DF i SF w igłach trzech populacji sosny zwyczajnej różniących się wrażliwością na zanieczyszczenia przemysłowe (Oleksyn i in. 1988). Wybrano trzy następujące populacje: wrażliwą (nr 15, Sumpberget - Szwecja); pośrednią (nr 6, Supraśl - Polska); tolerancyjną (nr 18, Maočnica - Jugosławia) (Tab. 1). Materiał do analiz pobierany był co dwa tygodnie począwszy od maja do grudnia, a następnie co cztery tygodnie do maja następnego roku. Każdy wariant doświadczenia reprezentowany był przez 3 drzewa (powtórzenia). Jednorazowo przeprowadzono w terenie ocenę uszkodzeń igieł określając procent uszkodzonych igieł.

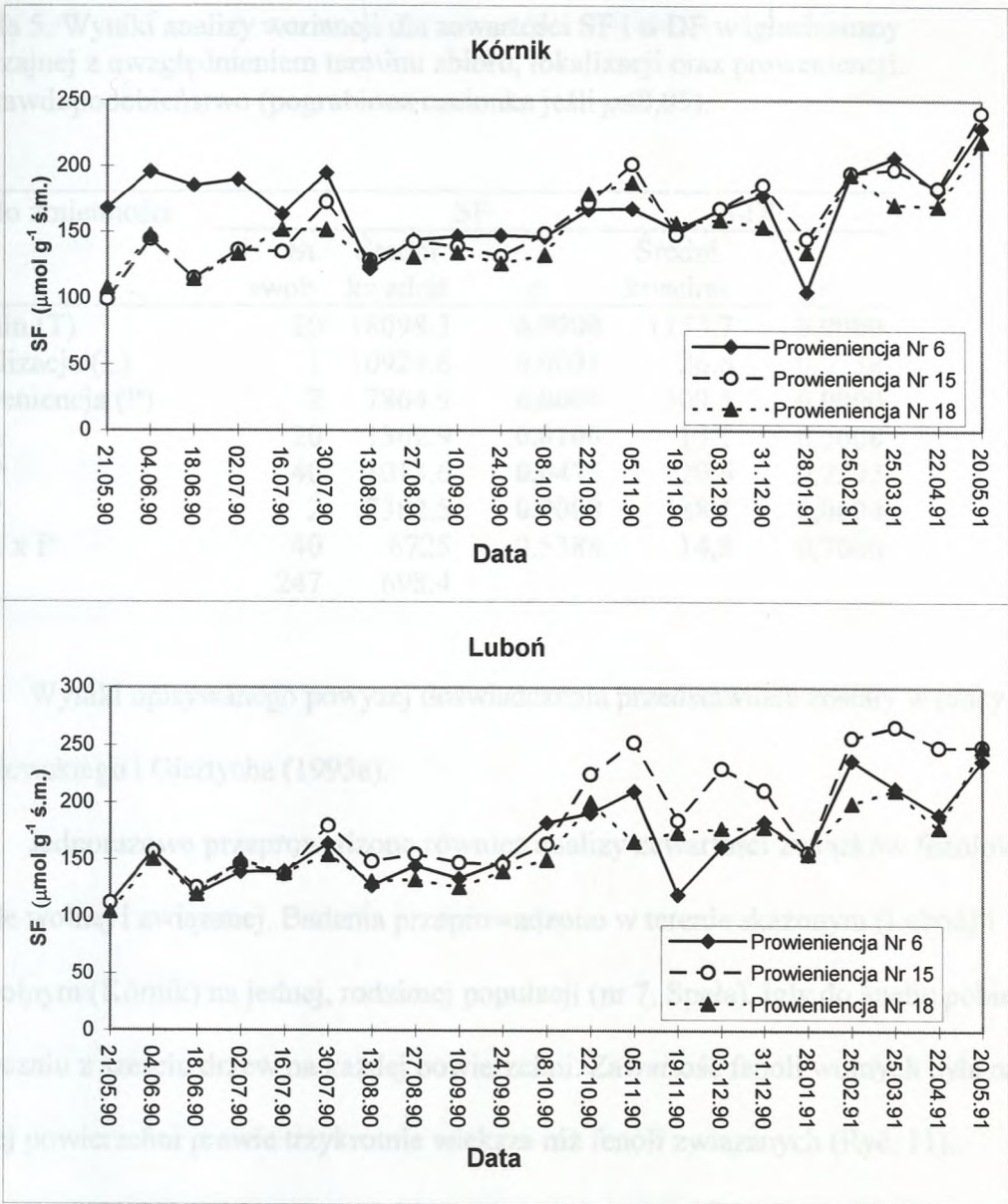
4.1.1.3.2. Wyniki

Zawartość związków fenolowych, zarówno o-DF (Ryc. 9) jak i SF (Ryc. 10), wzrastała istotnie w ciągu 12 miesięcy obserwacji (Tab. 5). Zawartość obu grup badanych związków fenolowych zależała od proveniencji, natomiast lokalizacja miała istotny wpływ



Ryc. 9. Zmiany zawartości o-DF w igłach sosny zwyczajnej, trzech proveniencji, w czasie, na dwóch powierzchniach: w Kórniku i Luboniu wyrażone w μmol kwasu chlorogenowego na g świeżej masy.

tylko na SF. W przypadku rozpatrywania oddzielnie każdej populacji, istotne różnice między powierzchniami były tylko w przypadku proveniencji wrażliwej nr 15 - Sumpberget. Jednakże wystąpienie istotnej interakcji między lokalizacją a proveniencją u obu badanych grup fenoli wskazuje na znaczącą rolę pochodzenia drzew. Określone w terenie nekrotyczne uszkodzenia igieł nie dały jednoznacznego potwierdzenia zależności między wrażliwością na zanieczyszczenia a poziomem fenoli. Stwierdzono jedynie, że igły



Ryc.10. Zmiany zawartości SF w igłach sosny zwyczajnej, trzech proveniencji, w czasie, na dwóch powierzchniach: w Kórniku i Luboniu wyrażone w mmolach kwasu chlorogenowego na g świeżej masy.

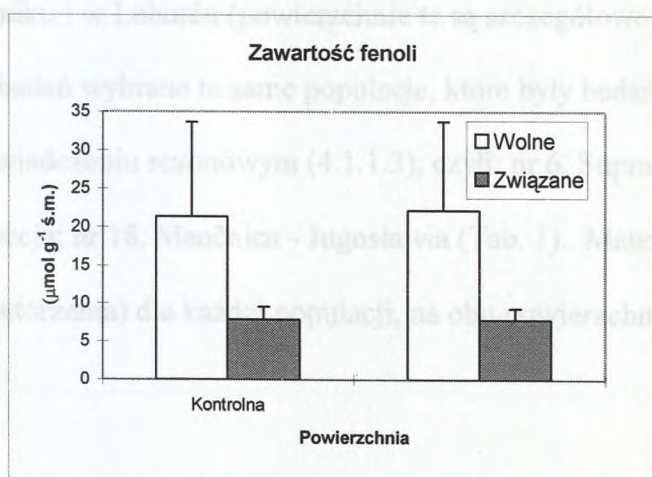
drzew populacji tolerancyjnej nr 18 - Maońca były istotnie mniej uszkodzane niż dwóch pozostałych.

Tabela 5. Wyniki analizy wariancji dla zawartości SF i o-DF w igłach sosny zwyczajnej z uwzględnieniem terminu zbioru, lokalizacji oraz proveniencji. *p* - prawdopodobieństwo (pogrubiona czcionka jeśli $p \leq 0,05$).

Źródło zmienności	SF			o-DF	
	St. swob.	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Termin (T)	20	18098.3	0,0000	1153,7	0,0000
Lokalizacja (L)	1	10924.6	0,0001	26,6	0,2238
Proveniencja (P)	2	7864.9	0,0000	309,5	0,0000
T x L	20	1362.9	0,0100	15,1	0,6608
T x P	40	1013.6	0,0475	20,6	0,2597
L x P	2	7382.5	0,0000	188,1	0,0000
T x L x P	40	6725	0,5388	14,8	0,7606
Błąd	247	698.4			

Wyniki opisywanego powyżej doświadczenia przedstawione zostały w pracy Karolewskiego i Giertycha (1995a).

Jednorazowo przeprowadzono również analizy zawartości związków fenolowych w formie wolnej i związanej. Badania przeprowadzono w terenie skażonym (Luboń) i kontrolnym (Kórnik) na jednej, rodzimej populacji (nr 7, Spała). Igły do analiz pobierano w styczniu z sześciu drzew na każdej powierzchni. Zawartość fenoli wolnych była na każdej powierzchni prawie trzykrotnie większa niż fenoli związanych (Ryc. 11).



Ryc. 11. Zawartość fenoli wolnych i związanych w igłach sosny zwyczajnej na dwóch powierzchniach w Kórniku (kontrola) i Luboniu (skażona), wyrażona w μmolach kwasu chlorogenowego na gram świeżej masy.

Różnice między powierzchniami były niewielkie. Nieznacznie więcej fenoli wolnych stwierdzono w terenie skażonym, natomiast fenoli związanych w terenie skażonym było mniej.

4.2. Wpływ wieku igieł na zmiany poziomu fenoli u drzew w stresie

4.2.1. Cel

Ponieważ związki fenolowe biorą udział w procesach dojrzewania i starzenia, istotnym więc było stwierdzenie jak ich poziom zmienia się wraz z wiekiem igieł i jaki ma to wpływ na ich zawartość u drzew w warunkach skażenia środowiska. Ze względu na to, że sosna zwyczajna utrzymuje na badanych powierzchniach tylko 2-3 roczniki igieł wykonano również porównawcze doświadczenia na dwóch innych gatunkach sosen utrzymujących większą liczbę roczników. Ponadto porównano zawartość fenoli z zawartością makro- i mikroelementów oraz niektórych toksycznych pierwiastków w kilku rocznikach igieł sosny czarnej (*Pinus nigra*).

4.2.1.1. Doświadczenie I - sosna zwyczajna

4.2.1.1.1 Materiał i metody

Doświadczenie jakie w tym celu wykonano było przeprowadzone na trzech rocznikach igieł sosny zwyczajnej. Igły zbierano na powierzchniach badawczych, w Kórniku i w Luboniu (powierzchnie te są szczegółowo opisane w podrozdziale 4.1.1.3.1). Do badań wybrano te same populacje, które były badane w opisanym powyżej doświadczeniu sezonowym (4.1.1.3), czyli: nr 6, Supraśl - Polska; nr 15, Sumpberget - Szwecja; nr 18, Maočnica - Jugosławia (Tab. 1). Materiał pobrano z 3 drzew (powtórzenia) dla każdej populacji, na obu powierzchniach.

4.2.1.1.2. Wyniki

Wyniki przedstawione w tabeli 6, wskazują na istotny wzrost, z wiekiem igieł, poziomu zarówno SF jak i o-DF (Tab. 7).

Tabela 6. Średnie zawartości sumy fenoli i ortodwufenoli (w $\mu\text{molach g}^{-1}$ ś.m. w przeliczeniu na kw. chlorogenowy) w igłach trzech proveniencji sosny zwyczajnej, w trzech rocznikach igieł, na dwóch powierzchniach badawczych: Kórnik (K - kontrola) i Luboń (S - skażona).

Wiek igieł	Suma fenoli						orto-dwufenole											
	Numer proveniencji																	
	6			15			18			6			15			18		
	Powierzchnia badawcza																	
	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S		
I rocznik	167	161	168	230	159	177	27	26	29	34	30	33						
II rocznik	191	314	201	342	191	307	35	58	38	73	38	72						
III rocznik	260	294	305	321	225	350	47	57	50	63	42	85						

Tabela 7. Wyniki analizy wariancji zawartości fenoli w igłach sosny zwyczajnej z uwzględnieniem wieku (W), lokalizacji (L), proveniencji oraz interakcji. p - prawdopodobieństwo (pogrubiona czcionka jeśli $p \leq 0,05$).

Źródło zmienności	Grupa fenoli						
	St. swob.	o-DF			SF		
		Średni kwadrat	p		Średni kwadrat	p	
Lokalizacja (L)	1	4574,2	<0,0000		66311,1	0,0001	
Wiek (W)	2	3845,4	<0,0000		63291,1	0,0000	
L x W	2	987,2	<0,0000		12217,6	0,0192	
Drzewa w (PL)	12	82,6			2182,8		
Proveniencja (P)	2	310,2	0,0542		4812,4	0,0423	
P x L	2	320,1	0,0503		1484,0	0,3440	
P x W	4	35,5	0,6237		150,0	0,9768	
P x L x W	4	126,0	0,0860		2839,7	0,1074	
Błąd	24	54,3			1329,9		

W igłach z powierzchni kontrolnej w Kórniku wzrost zawartości o-DF i SF z wiekiem igieł miał charakter niemalże liniowy. Natomiast na powierzchni skażonej w

drugim roczniku stwierdzono istotny wzrost poziomu zdecydowanie ponad stan w kontroli, podczas gdy w trzecim roczniku zawartość nie zmieniała się istotnie i w przypadku dwóch proveniencji (nr 6 i 15) przypominała poziom w igłach kontrolnych. Istotna interakcja między lokalizacją a wiekiem igieł potwierdza różnice w charakterze wzrostu zawartości fenoli na obu powierzchniach. Wyniki te przedstawione są w pracy Karolewskiego i Giertycha (1995a).

4.2.1.2. Doświadczenie II - sosna bośniacka

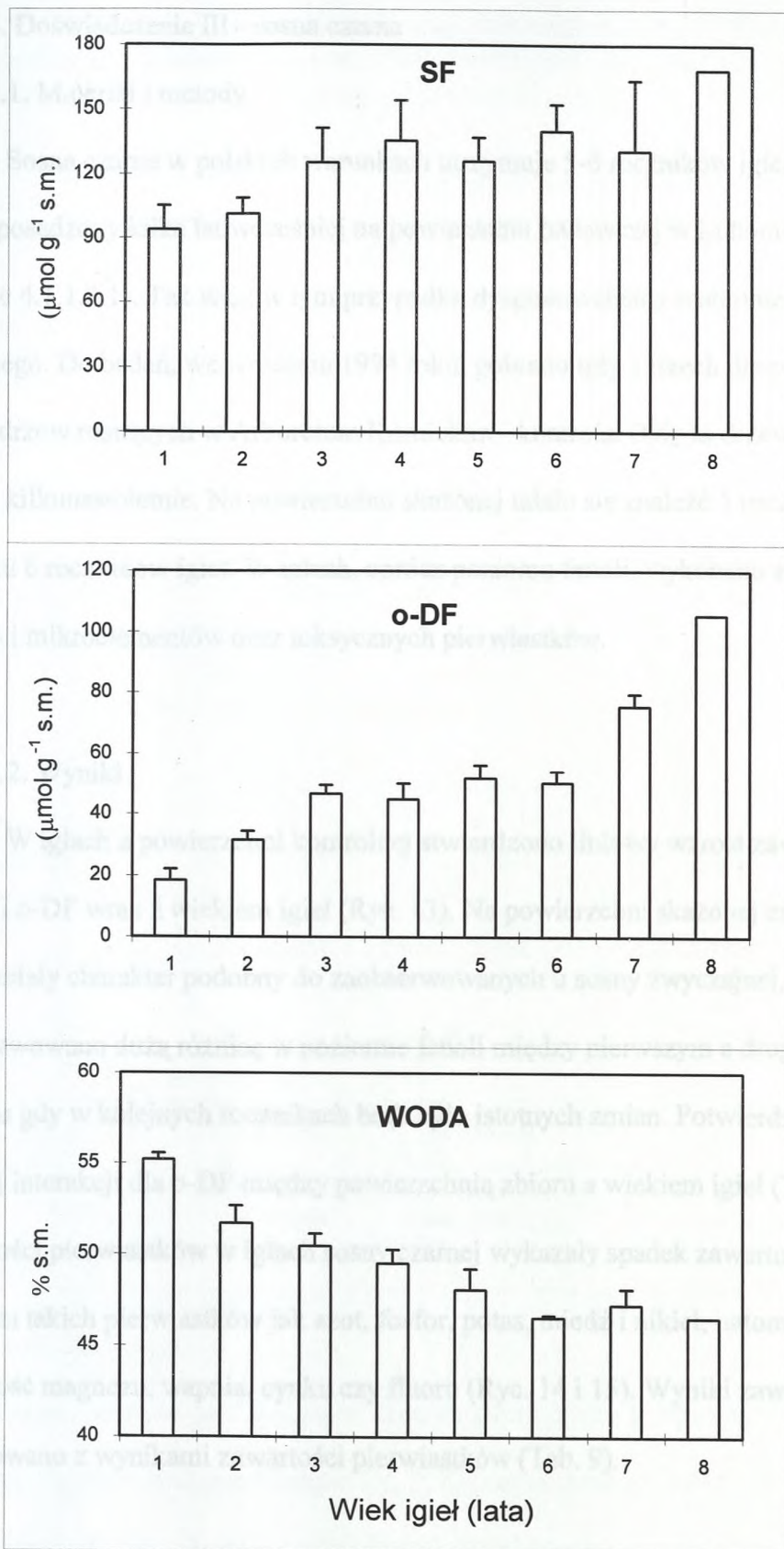
4.2.1.2.1. Materiał i metody

Sosna bośniacka (*Pinus heldreichii* Christ/syn. *P. leucodermis* Ant.) dobrze nadawała się do badania wpływu wieku igieł, gdyż na rosnących w Arboretum Kórnickim egzemplarzach udało się znaleźć nawet 8 roczników igieł. Do badań wybrano 3 drzewa (powtórzenia) w wieku ok. 30 lat. Brak było jednak materiału porównawczego z terenu skażonego. Analizy wykonano w marcu w okresie spoczynku roślin.

4.2.1.2.2. Wyniki

W igłach sosny bośniackiej wraz z wiekiem igieł stwierdzono wzrost poziomu SF i o-DF (Ryc. 12). W przypadku o-DF był on istotny na poziomie $p < 0,001$. Tak więc wzrost poziom związków fenolowych odzwierciedla naturalne zmiany następujące w wyniku starzenia się tkanek. Wraz z wiekiem igieł zmniejszała się istotnie ($p < 0,001$) również zawartość wody w tkankach (Ryc. 12).

Ryc. 12. Zawartość fenoli (SF i o-DF), wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g suchej masy i % suchej masy w igłach sosny bośniackiej.



Ryc. 12. Zawartość fenoli (SF i o-DF), wyrażona w μmol ach kwasu chlorogenowego na g suchej masy i % suchej masy w igłach sosny bośniackiej.

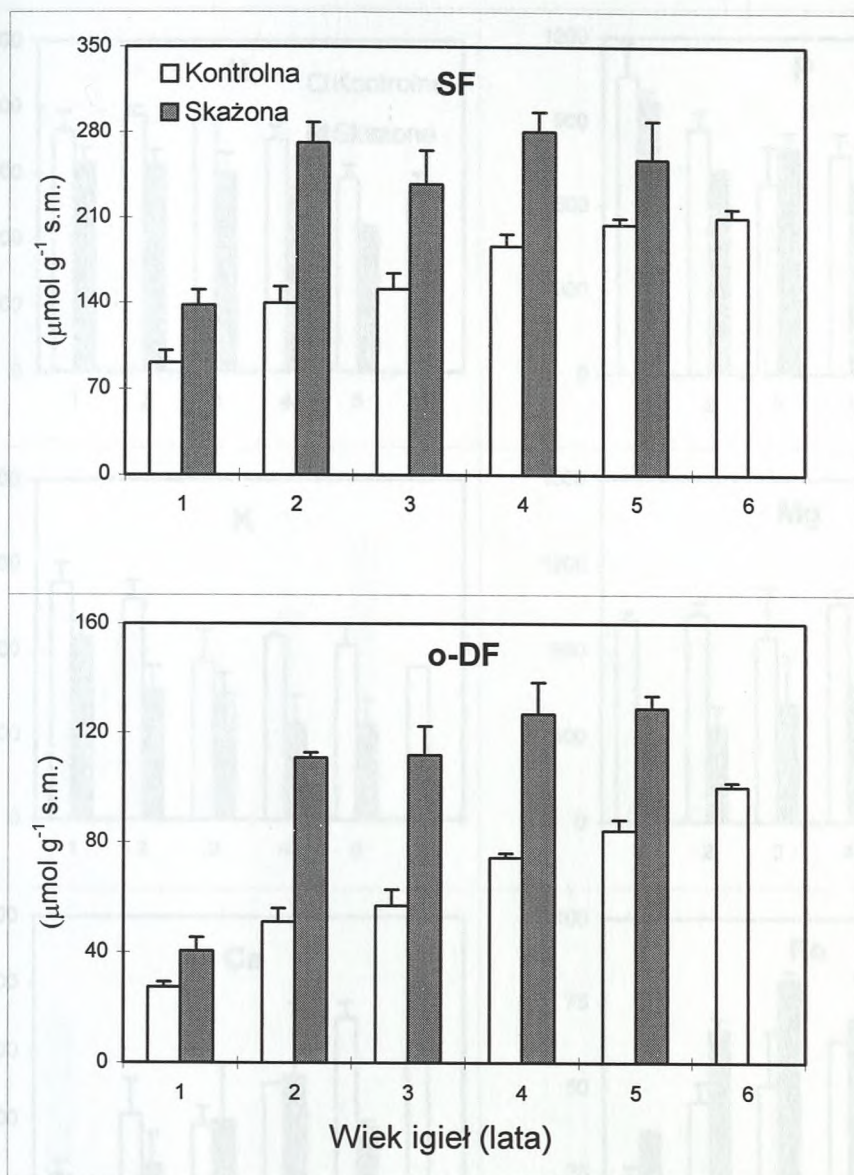
4.2.1.3. Doświadczenie III - sosna czarna

4.2.1.3.1. Materiał i metody

Sosna czarna w polskich warunkach utrzymuje 5-6 roczników igieł. Gatunek ten został posadzony kilka lat wcześniej na powierzchni badawczej w Luboniu (opisanej w punkcie 4.1.1.3.1). Tak więc w tym przypadku dysponowaliśmy materiałem z terenu skażonego. Do badań, we wrześniu 1994 roku, pobrano igły z trzech drzew z Lubonia i z trzech drzew rosnących w Arboretum Kórnickim - kontrola. Były to drzewa w zbliżonym wieku, kilkunastoletnie. Na powierzchni skażonej udało się znaleźć 5 roczników, a w Kórniku 6 roczników igieł. W igłach, oprócz poziomu fenoli, wykonano analizy zawartości makro- i mikroelementów oraz toksycznych pierwiastków.

4.2.1.3.2. Wyniki

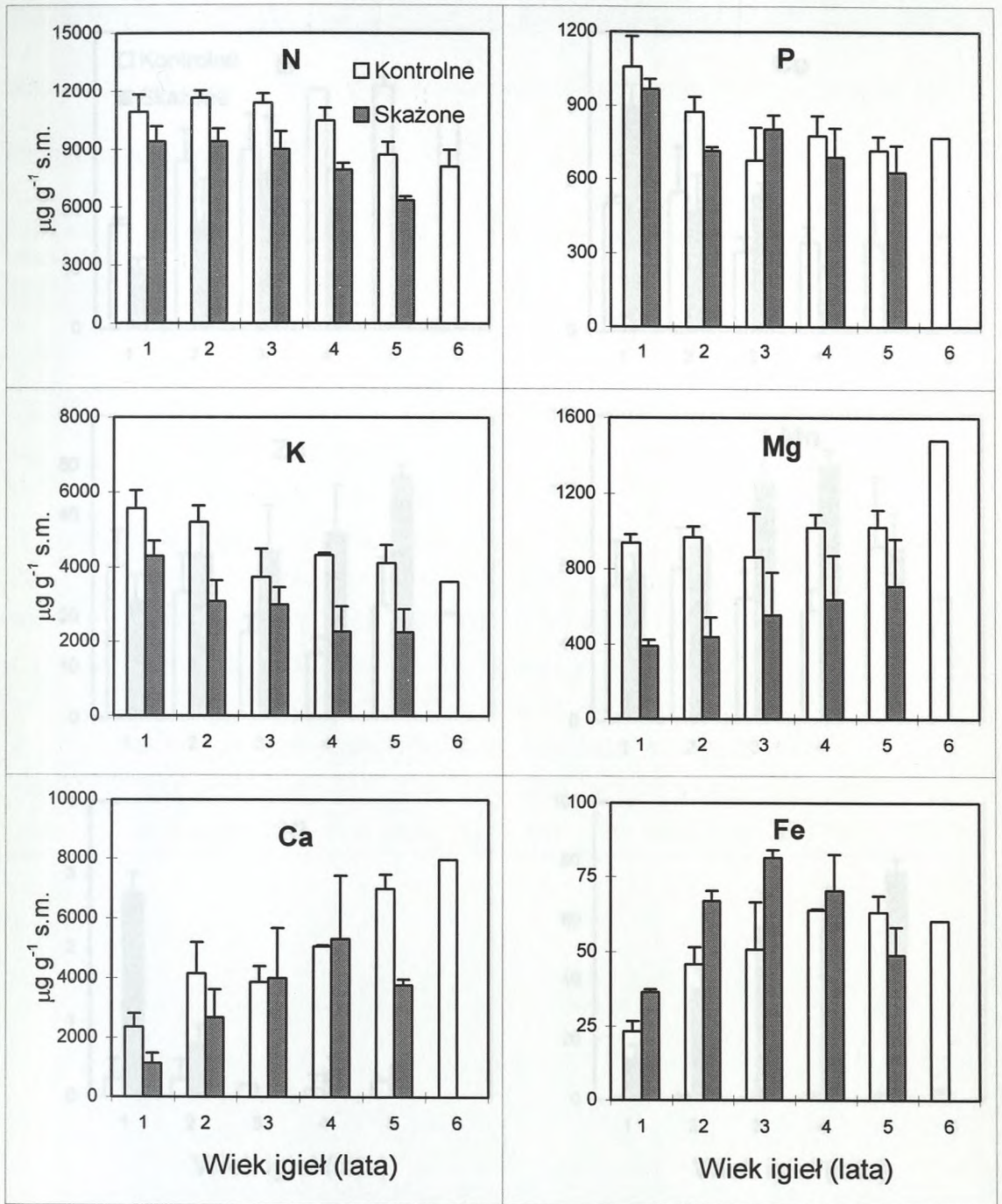
W igłach z powierzchni kontrolnej stwierdzono liniowy wzrost zawartości zarówno SF jak i o-DF wraz z wiekiem igieł (Ryc. 13). Na powierzchni skażonej zmiany zawartości fenoli miały charakter podobny do zaobserwowanych u sosny zwyczajnej, to znaczy zaobserwowano dużą różnicę w poziomie fenoli między pierwszym a drugim rocznikiem, podczas gdy w kolejnych rocznikach brak było istotnych zmian. Potwierdza to wystąpienie istotnej interakcji dla o-DF między powierzchnią zbioru a wiekiem igieł (Tab. 8). Badania zawartości pierwiastków w igłach sosny czarnej wykazały spadek zawartości wraz z wiekiem takich pierwiastków jak azot, fosfor, potas, miedź i nikiel, natomiast wzrastała zawartość magnezu, wapnia, cynku czy fluoru (Ryc. 14 i 15). Wyniki zawartości fenoli skorelowano z wynikami zawartości pierwiastków (Tab. 9).



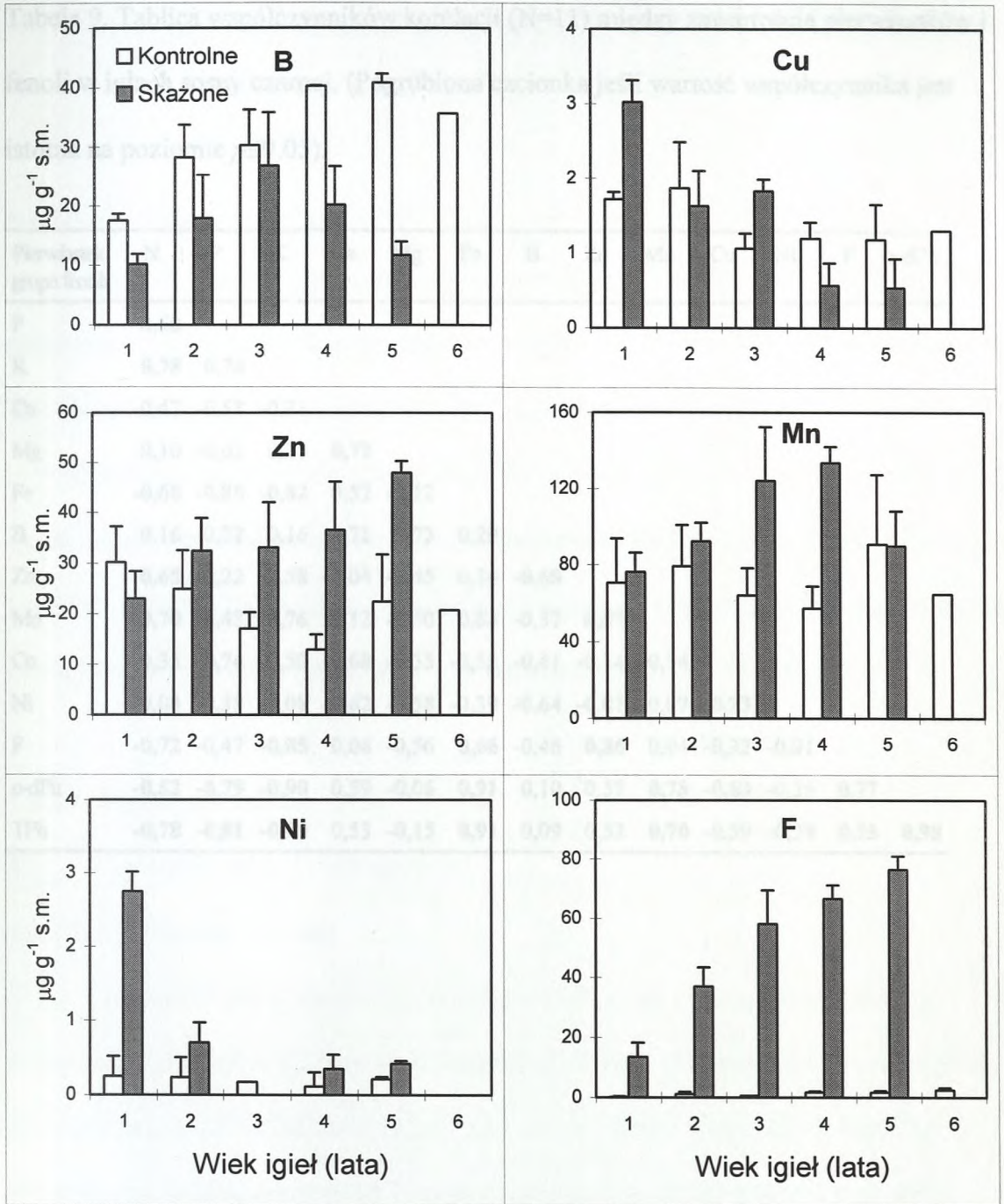
Ryc. 13. Zawartość fenoli (SF i o-DF), wyrażona w μmol ach kwasu chlorogenowego na g suchej masy, w igłach sosny czarnej z dwóch powierzchni w Kórniku (kontrolna) i Luboniu (skażona)

Ryc. 14. Zawartość azotu, fosforu, potasu, magnezu, wapnia i żelaza w igłach sosny czarnej z dwóch powierzchni w Kórniku (kontrolna) i Luboniu (skażona) (1998)

fluoru, niklu i obu grup fenoli (Ryc. 13-15). Stwierdzono również istotne interakcje między wiekiem a powierzchnią, na której igły zebrano, w przypadku fluoru i niklu. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy Giertycha i wsp. (1998)



Ryc. 14. Zawartość azotu, fosforu, potasu, magnezu, wapnia i żelaza w igłach sosny czarnej na dwóch powierzchniach w Kórniku (kontrola) i Luboniu (skażona), wyrażona w $\mu\text{g g}^{-1}$ s.m.



Ryc. 15. Zawartość boru, miedzi, cynku, manganu, niklu i fluoru w igłach sosny czarnej na dwóch powierzchniach w Kórniku (kontrola) i Luboniu (skażona), wyrażona w $\mu\text{gramach}$ na g suchej masy.

Tabela 9. Tablica współczynników korelacji (N=11) między zawartością pierwiastków i fenoli w igłach sosny czarnej. (Pogrubiona czcionka jeśli wartość współczynnika jest istotna na poziomie $p \leq 0.05$).

Pierwiastek, grupa fenoli	N	P	K	Ca	Mg	Fe	B	Zn	Mn	Cu	Ni	F	o-dPh
P	0,50												
K	0,78	0,78											
Ca	-0,47	-0,58	-0,31										
Mg	0,10	-0,02	0,35	0,72									
Fe	-0,60	-0,80	-0,82	0,52	-0,12								
B	0,16	-0,32	0,16	0,71	0,73	0,29							
Zn	-0,65	-0,22	-0,58	-0,04	-0,45	0,34	-0,60						
Mn	-0,70	-0,43	-0,76	0,12	-0,50	0,63	-0,37	0,87					
Cu	0,35	0,74	0,50	-0,68	-0,35	-0,52	-0,41	-0,24	-0,34				
Ni	-0,04	0,38	0,08	-0,62	-0,58	-0,39	-0,64	-0,01	-0,07	0,73			
F	-0,72	-0,47	-0,85	0,04	-0,56	0,66	-0,46	0,86	0,94	-0,32	-0,01		
o-dPh	-0,82	-0,79	-0,90	0,59	-0,06	0,91	0,10	0,57	0,73	-0,63	-0,35	0,77	
TPh	-0,78	-0,81	-0,90	0,53	-0,15	0,91	0,09	0,52	0,70	-0,59	-0,28	0,75	0,98

4.3. Modyfikujący wpływ czynników zewnętrznych (nawożenia, światła) na poziom fenoli u roślin w warunkach stresu

4.3.1. Cel

Ponieważ podstawowym celem prowadzonych badań było określenie przydatności stosowania związków fenolowych jako bioindykatorów skażenia środowiska, koniecznym było określenie wpływu innych czynników z jakimi mamy do czynienia w trakcie prowadzenia pomiarów. Biorąc pod uwagę, że wpływ niektórych czynników został już dostatecznie poznany i opisany w literaturze, w tych badaniach uwzględniono dwa czynniki: nawożenie wapniowe i oświetlenie. Starano się również ocenić czy pora dnia, w której zbierany jest materiał ma wpływ na zawartość związków fenolowych.

4.3.1.1. Wpływ nawożenia

4.3.1.1.1 Doświadczenie I - laboratoryjne

4.3.1.1.1.1. Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na 2-letnich siewkach sosny zwyczajnej, rosnących w szklarni w 0,5 litrowych doniczkach. Siewki te traktowano azotanem glinu, który był dodawany w ilościach: 1, 2 i 4 mM soli w 100cm³ wody destylowanej na doniczkę, co tydzień, przez okres 1 miesiąca. Następnego dnia po traktowaniu roślin glinem dodawano węglan wapnia (CaCO₃), także w 100 cm³ wody. Węglan wapnia dodawano w takich ilościach, aby w każdym z wariantów stężenia Al wartość stosunku Ca/Al wynosiła: 0; 2/3; 1 i 4/3 (równoważników chemicznych). Każdy wariant doświadczenia, różniący się dawką Al i stosunkiem Ca/Al, reprezentowany był przez 4 siewki. Tydzień po ostatnim traktowaniu węglanem, oznaczano zawartość fenoli w igłach i korzeniach siewek. Analizowano zawartość o-DF i SF w świeżej masie.

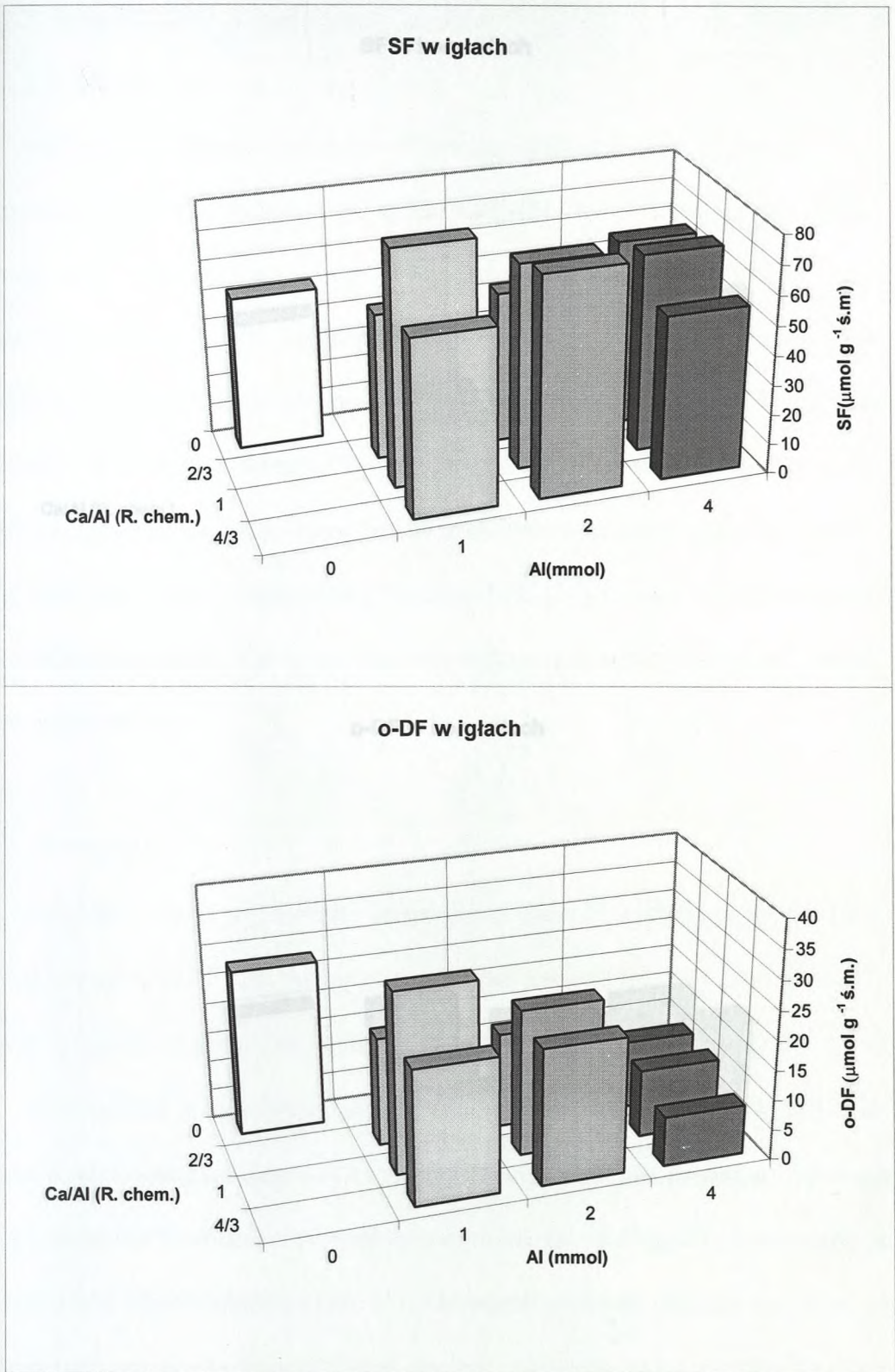
4.3.1.1.1.2. Wyniki

W wyniku działania glinu stwierdzono istotne (Tab. 10) obniżenie zawartości o-DF w igłach (Ryc. 16) i nieznaczny wzrost SF w korzeniach (Ryc. 17). Zastosowane nawożenie wapniowe nie spowodowało spodziewanego obniżenia poziomu fenoli, lecz wraz ze zwiększeniem stosunku Ca/Al stwierdzono wzrost poziomu SF i istotny wzrost o-DF w igłach. Zmiany te nie miały charakteru liniowego, a najwięcej związków fenolowych stwierdzono w średniej dawce węglanu wapnia. Wpływ węglanu wapnia na zawartość fenoli w korzeniach był również niejednoznaczny i przy każdym stężeniu Al wyglądał inaczej (Ryc. 17). Różnice te jednak nie były na tyle duże, aby istotna była interakcja między badanymi czynnikami.

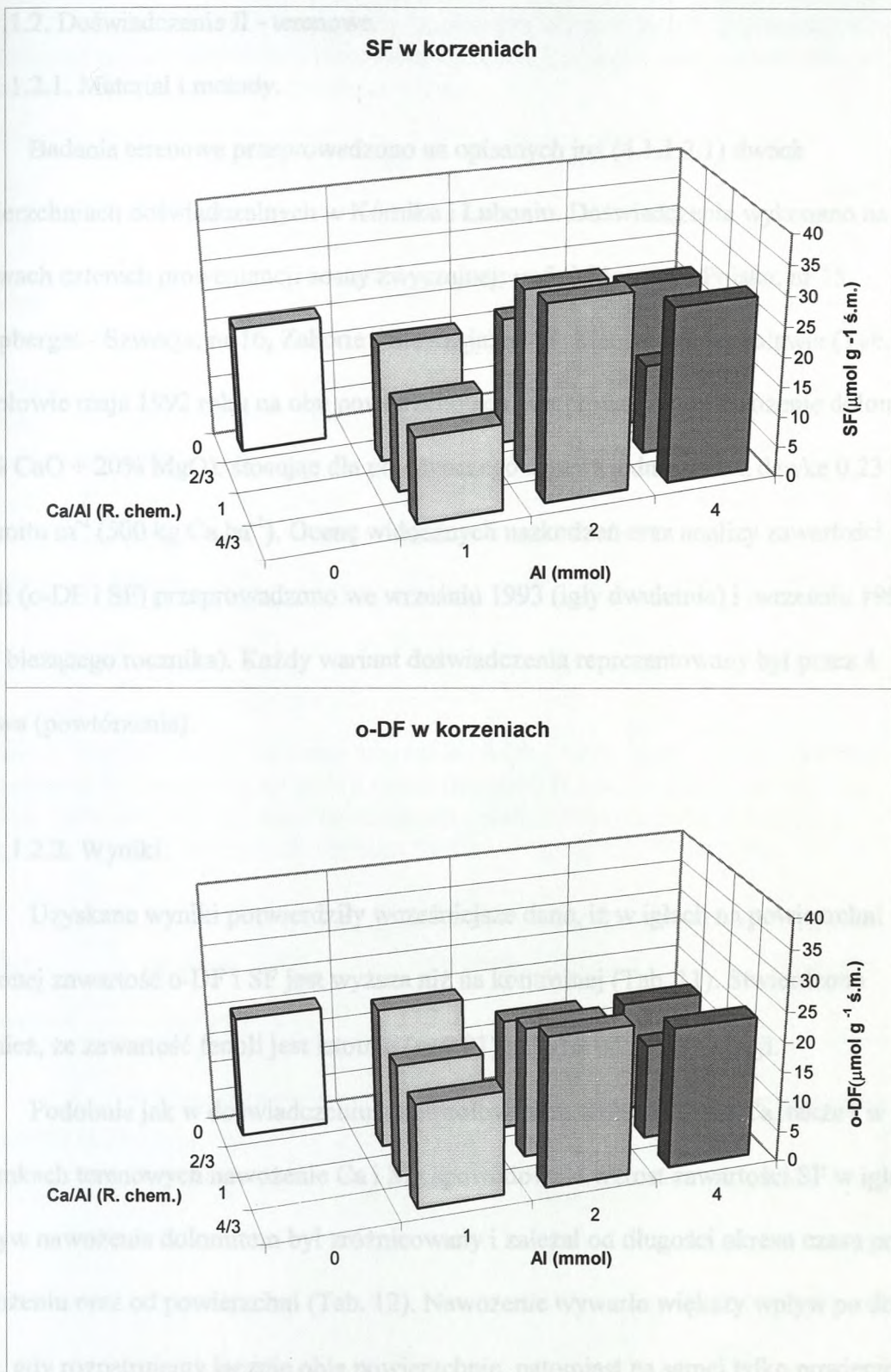
Tabela 10. Wyniki analizy wariancji zawartości fenoli w igłach i korzeniach siewek sosny zwyczajnej traktowanej azotanem glinu i węglanem wapnia oraz interakcji między tymi czynnikami. *p* - prawdopodobieństwo (pogrubiona czcionka jeśli $p \leq 0,05$).

Źródło zmienności	o-DF w igłach			SF w igłach		o-DF w korzeniach		SF w korzeniach	
	St. swob.	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Al (A)	2	569,5	<0,0000	21,6	0,9327	567,2	0,0822	311,1	0,2161
Ca/Al (B)	2	123,9	0,0157	737,9	0,1140	316,3	0,2347	339,4	0,1896
A x B	4	47,6	0,1419	358,9	0,3540	225,4	0,3811	191,4	0,4257
Błąd	24*	25,0		310,0		206,7		191,8	

Stopnie swobody dla korzeni = 27



Ryc. 16. Zawartość fenoli (SF i o-DF) w igłach siewek sosny wyrażona w μmol ach kwasu chlorogenowego na g świeżej masy, w zależności od stężenia azotanu glinu i stosunku równoważników chemicznych (R.chem.) wapnia do glinu.



Ryc. 17. Zawartość fenoli (SF i o-DF) w korzeniach siewek sosny wyrażona w μmol ach kwasu chlorogenowego na g świeżej masy, w zależności od stężenia azotanu glinu i stosunku równoważników chemicznych (R.chem.) wapnia do glinu.

4.3.1.1.2. Doświadczenie II - terenowe

4.3.1.1.2.1. Materiał i metody.

Badania terenowe przeprowadzono na opisanych już (4.1.1.3.1) dwóch powierzchniach doświadczalnych w Kórniku i Luboniu. Doświadczenia wykonano na drzewach czterech proveniencji sosny zwyczajnej: nr 5, Miłomłyn - Polska; nr 15, Sumpberget - Szwecja; nr 16, Zahorie - Słowacja; nr 18, Maočnica - Jugosławia (Tab. 1). W połowie maja 1992 roku na obu powierzchniach przeprowadzono nawożenie dolomitom (30% CaO + 20% MgO), stosując dla pojedynczego drzewa jednorazową dawkę 0,23 kg dolomitu m⁻² (500 kg Ca ha⁻¹). Ocenę widocznych uszkodzeń oraz analizy zawartości fenoli (o-DF i SF) przeprowadzono we wrześniu 1993 (igły dwuletnie) i wrześniu 1994 (igły bieżącego rocznika). Każdy wariant doświadczenia reprezentowany był przez 4 drzewa (powtórzenia).

4.3.1.1.2.2. Wyniki.

Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze dane, iż w igłach na powierzchni skażonej zawartość o-DF i SF jest wyższa niż na kontrolnej (Tab. 11). Stwierdzono również, że zawartość fenoli jest istotnie ($p \leq 0,01$) zależna od proveniencji.

Podobnie jak w doświadczeniu z kontrolowanym wpływem Al i Ca, także i w warunkach terenowych nawożenie Ca i Mg spowodowało wzrost zawartości SF w igłach. Wpływ nawożenia dolomitom był zróżnicowany i zależał od długości okresu czasu po nawożeniu oraz od powierzchni (Tab. 12). Nawożenie wywarło większy wpływ po drugim roku, gdy rozpatrujemy łącznie obie powierzchnie, natomiast na samej tylko powierzchni skażonej istotniejszy wpływ miało po pierwszym roku. Wyniki opisywanych powyżej doświadczeń zostały przedstawione w pracy Karolewskiego i Giertycha (1995b).

Tabela 11. Średnie zawartości związków fenolowych w igłach sosny zwyczajnej czterech proveniencji na powierzchniach: kontrolnej i skażonej, nawożonych i nienawożonych dolomitami. Po roku i po 2 latach od nawożenia.

Proveniencja		o-DF				SF			
		Kontrola		Skażona		Kontrola		Skażona	
		Nawożone	Nie nawożone	Nawożone	Nie nawożone	Nawożone	Nie nawożone	Nawożone	Nie nawożone
Miłomłyn;	po 1 roku	14,69	16,69	20,02	16,58	57,04	49,53	72,56	48,70
Polska	po 2 latach	14,28	12,22	13,35	13,19	63,36	56,93	69,88	54,58
Sumpberget;	po 1 roku	16,59	18,04	23,20	19,76	45,05	50,19	61,43	55,84
Szwecja	po 2 latach	17,01	11,90	19,67	20,69	57,22	38,76	66,81	67,50
Zahorie;	po 1 roku	14,92	13,25	18,82	17,51	45,50	49,24	72,96	61,01
Słowacja	po 2 latach	11,58	10,28	14,30	11,04	52,16	54,90	64,90	47,05
Maońnica;	po 1 roku	13,11	12,45	14,99	14,86	38,29	37,54	37,59	38,95
Jugosławia	po 2 latach	11,75	11,97	13,83	12,88	36,2	42,53	46,36	45,82

Tabela 12. Wyniki analizy wariancji zawartości o-DF i SF w igłach sosny zwyczajnej 4 proveniencji (P) rosnących na dwóch powierzchniach (L) w Kórniku (kontrola) i w Luboniu (powierzchnia skażona) nawożonych i nienawożonych dolomitami (N), po pierwszym i drugim roku od nawożenia. (*- $p \leq 0,1$; **- $p \leq 0,05$; ***- $p \leq 0,01$)

Źródło zmienności	Stopnie swobody	Po 1 roku		Po 2 roku	
		o-DF	SF	o-DF	SF
Lokalizacja (L)	1	17,89***	6,11**	4,04**	4,85**
Proveniencja (P)	3	8,87***	5,42***	5,37***	5,35***
Nawożenie (N)	1	1,37	1,61	2,07	3,11*
LxP	3	0,45	1,07	1,34	1,34
LxN	1	2,36	1,72	0,24	0,38
PxN	3	0,09	0,93	0,12	0,79
LxPxN	3	1,11	0,30	0,80	1,47
Błąd	48				

4.3.1.2. Wpływ oświetlenia

4.3.1.2.1. Doświadczenie I - laboratoryjne

4.3.1.2.1.1. Materiał i metody

W maju 1995 roku założono doświadczenie, w którym jednoroczne siewki sosny zwyczajnej wysadzono do kontenerów (po 10 siewek w kontenerze), pierwszy z glebą pochodzącą z terenu kontrolnego - z Kórnika (A) i drugi z glebą skażonego - z Lubonia (B), po czym umieszczono je pod osłonami z siatki plastikowej. Wykonano analizy glebowe, które wskazały, że podłoża te różniły się pod względem zawartości niektórych pierwiastków, głównie potasu, wapnia i magnezu (Tab. 13).

Tabela 13. Zawartość podstawowych składników mineralnych (N, P, K, Ca, Mg) oraz S, Fe, Al, F, a także pH i stężenie soli w glebie użytej do doświadczenia z kontrolowanym wpływem światła.

Zastosowano trzy warianty

osłon z siatki plastikowej porównując

je z kontrolnym, gdzie siewki były

wystawione na pełne oświetlenie

słoneczne. Siatka redukowała

oświetlenie kolejno o ok.: 50, 70 i

85%. Pomiarów oświetlenia

dokonano przy pomocy czujników

światła fotosyntetycznie czynnego

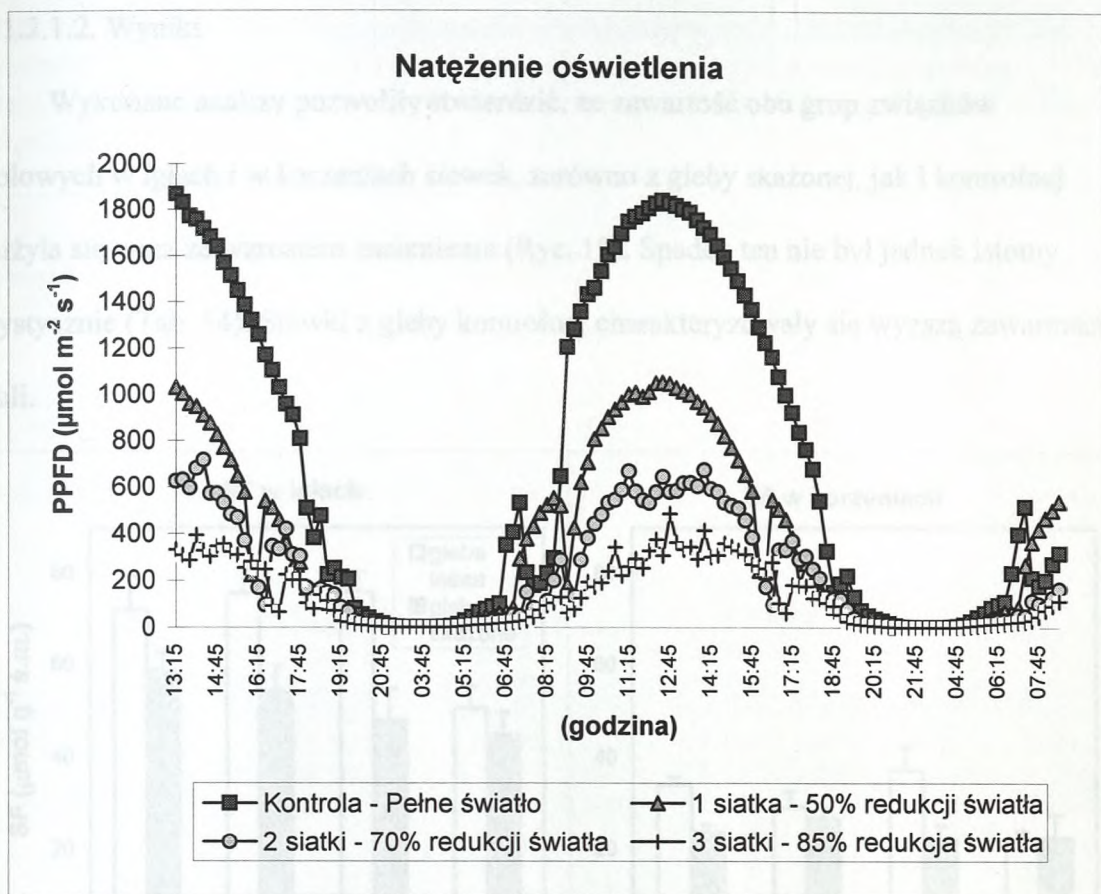
(typu Quantum, firmy LiCor; USA).

Wykres zmian dobowych oświetlenia

słonecznego (jedna wybrana doba)

Badany składnik	Gleba kontrolna (A)	Gleba z terenu skażonego (B)
N-NH ₄	1,25	1,25
N-NO ₃	1,3	1,4
P	7,65	8,2
K	83,25	6,9
Ca	175,9	17,55
Mg	31,45	3,35
S-SO ₄	0,85	0,75
Fe	73,65	86,6
Mn	6,1	3,25
Al	18,75	35,1
F wolny	1,4	2,35
F całkowity	9,5	11,5
pH	5,74	4,3
Stężenie soli	3,175	0,615

oraz stopień jego redukcji osiągnięty przy pomocy siatek przedstawia Ryc. 18.



Ryc. 18. Zmiany natężenia światła fotosyntetycznie czynnego (PPFD) w zależności od stopnia zacielenia i pory dnia.

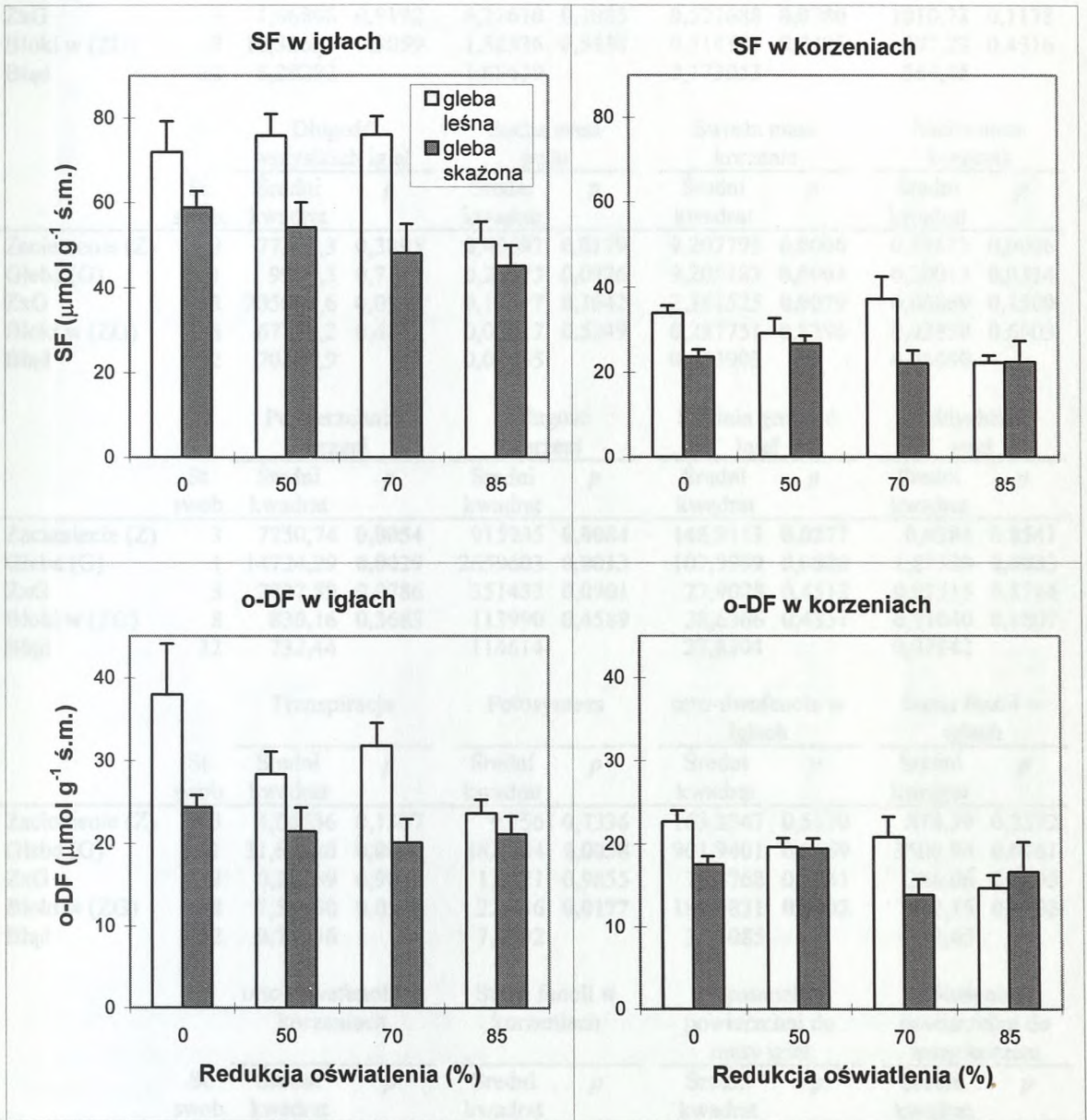
Analizy wykonywane były pod koniec sezonu wegetacyjnego - w październiku.

Poza określeniem zawartości związków fenolowych wykonano pomiary masy, długości, powierzchni igieł i korzeni oraz pomiary natężenia fotosyntezy netto (P_N), oddychania ciemniowego (R_D) igieł oraz transpiracji (T). Pomiarów wymiany gazowej dokonano w następujących warunkach: naświetlenie $1063 \pm 42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 19°C , wilgotność względna 40%. Wyniki podano w $\mu\text{molach CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dla P_N i R_D oraz $\text{mmolach H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dla T . W obliczeniach przyjęto powierzchnię rzutu igieł. Każdy wariant doświadczenia reprezentowany był przez 6 siewek (powtórzeń).

Ryc. 19. Zmiany zawartości fenoli (SF i o-DF) w igiełach i korzeniach siewek... w różnych... rodzaju gleby i redukcji oświetlenia, wyrażona w $\mu\text{molach kwazu chlorogrowego}$ na g... światłej masy.

4.3.1.2.1.2. Wyniki

Wykonane analizy pozwoliły stwierdzić, że zawartość obu grup związków fenolowych w igłach i w korzeniach siewek, zarówno z gleby skażonej, jak i kontrolnej obniżyła się wraz ze wzrostem zacinienia (Ryc. 19). Spadek ten nie był jednak istotny statystycznie (Tab. 14). Siewki z gleby kontrolnej charakteryzowały się wyższą zawartością fenoli.



Ryc. 19. Zmiany zawartości fenoli (SF i o-DF) w igłach i korzeniach siewek, w zależności rodzaju gleby i redukcji oświetlenia, wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g świeżej masy.

Tabela 14. Wyniki analizy wariancji parametrów biometrycznych, fizjologicznych i oraz zawartości fenoli w igłach i korzeniach siewek sosny zwyczajnej z uwzględnieniem zacienienia, rodzaju gleby oraz interakcji. *p* - prawdopodobieństwo (pogrubiona czcionka jeśli $p \leq 0,05$).

Zmienneści	St. swob.	Świeża masa siewki		Świeża masa igieł		Sucha masa igieł		Powierzchnia igieł	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Zacienienie (Z)	3	98,46139	0,0051	3,34483	0,1631	0,390840	0,0727	463,95	0,3605
Gleba (G)	1	22,14083	0,1812	0,00887	0,9407	0,078453	0,4310	35,89	0,7656
ZxG	3	1,66806	0,9192	4,21610	0,1085	0,521688	0,0380	1010,78	0,1178
Bloki w (ZG)	8	10,32625	0,3059	1,50536	0,5338	0,114103	0,7225	377,22	0,4316
Błąd	32	8,29292		1,68639		0,173053		364,45	

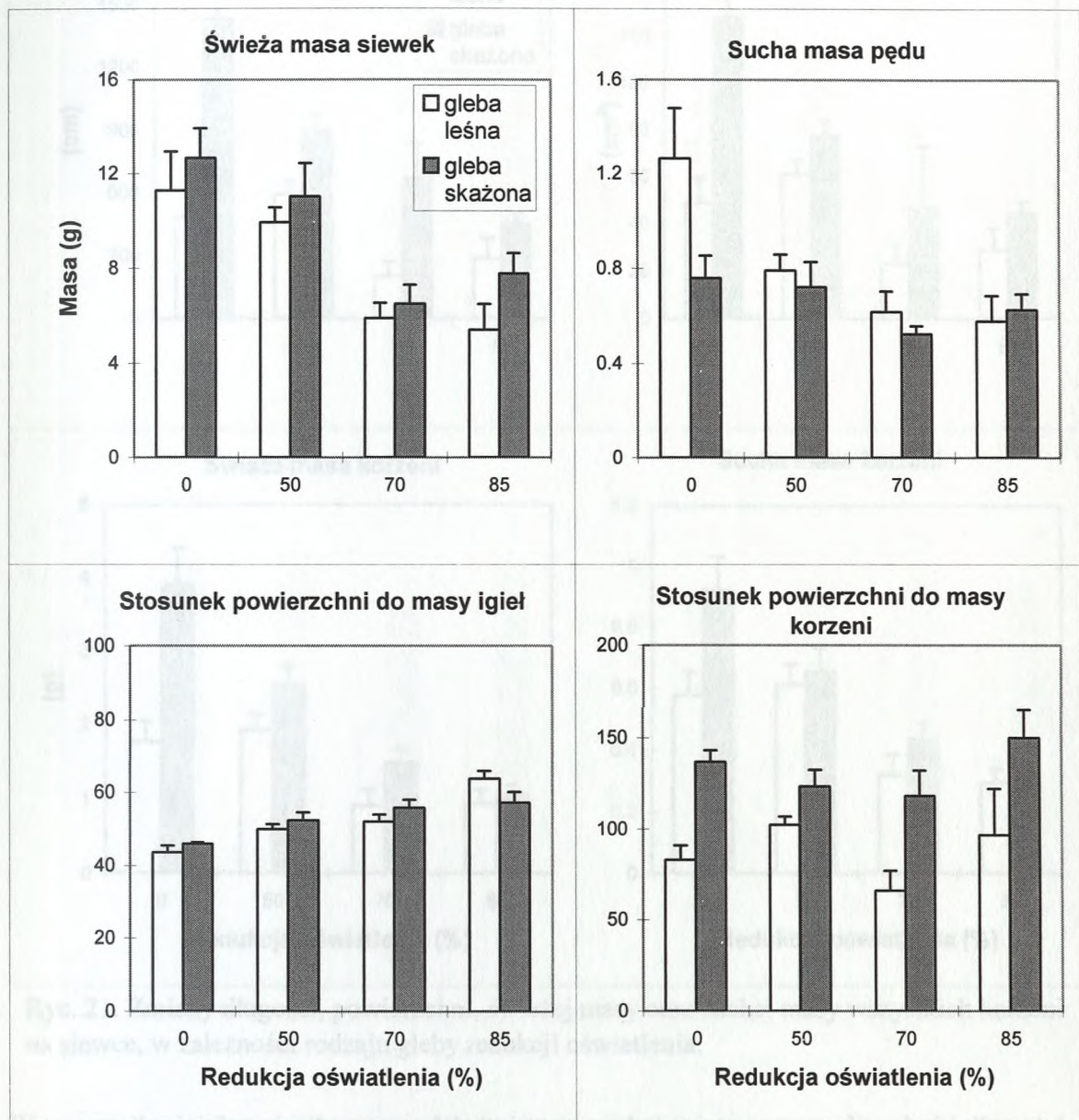
Zmienneści	St. swob.	Długość wszystkich igieł		Sucha masa pędu		Świeża masa korzenia		Sucha masa korzenia	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Zacienienie (Z)	3	77306,3	0,3895	0,48697	0,0179	9,207795	0,0000	0,53612	0,0006
Gleba (G)	1	9949,3	0,7115	0,28873	0,0926	9,205183	0,0004	0,20013	0,0314
ZxG	3	205052,6	0,0935	0,17517	0,1642	2,361525	0,0079	0,06869	0,1509
Bloki w (ZG)	8	67751,2	0,4812	0,07917	0,5249	0,287751	0,8396	0,02950	0,6003
Błąd	32	70340,9		0,08755		0,563903		0,03650	

Zmienneści	St. swob.	Powierzchnia korzeni		Długość korzeni		Średnia grubość igieł		Oddychanie igieł	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Zacienienie (Z)	3	7750,74	0,0054	915935	0,0084	148,9113	0,0277	0,0284	0,8541
Gleba (G)	1	14724,29	0,0029	2659603	0,0013	107,9999	0,0880	1,87320	0,0033
ZxG	3	2737,89	0,0786	351433	0,0901	27,9028	0,4512	0,02515	0,8744
Bloki w (ZG)	8	830,16	0,3683	113990	0,4589	28,6366	0,4351	0,11040	0,1807
Błąd	32	732,44		114614		27,8304		0,07142	

Zmienneści	St. swob.	Transpiracja		Fotosynteza		orto-dwufenole w igłach		Suma fenoli w igłach	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Zacienienie (Z)	3	4,04536	0,1307	9,756	0,7336	163,8347	0,5170	818,39	0,2372
Gleba (G)	1	31,69080	0,0021	362,804	0,0038	901,9401	0,0659	3500,94	0,0261
ZxG	3	0,28739	0,9072	1,0521	0,9855	74,4768	0,7741	286,06	0,6295
Bloki w (ZG)	8	1,59930	0,0588	22,406	0,0177	199,0831	0,0002	472,15	0,0103
Błąd	32	0,74156		7,9792		37,5085		152,05	

Zmienneści	St. swob.	orto-dwufenole w korzeniach		Suma fenoli w korzeniach		Stosunek powierzchni do masy igieł		Stosunek powierzchni do masy korzeni	
		Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>	Średni kwadrat	<i>p</i>
Zacienienie (Z)	3	50,39709	0,4309	133,618	0,4273	516,6859	0,0012	2015,4	0,4826
Gleba (G)	1	80,88617	0,2352	574,891	0,0677	3,0191	0,7755	24447,8	0,0108
ZxG	3	51,51368	0,4223	151,127	0,3792	67,9039	0,1991	777,8	0,7924
Bloki w (ZG)	8	49,11255	0,0467	129,001	0,0837	34,7053	0,2725	2240,9	0,0562
Błąd	32	21,52936		65,608		26,4348		1027,5	

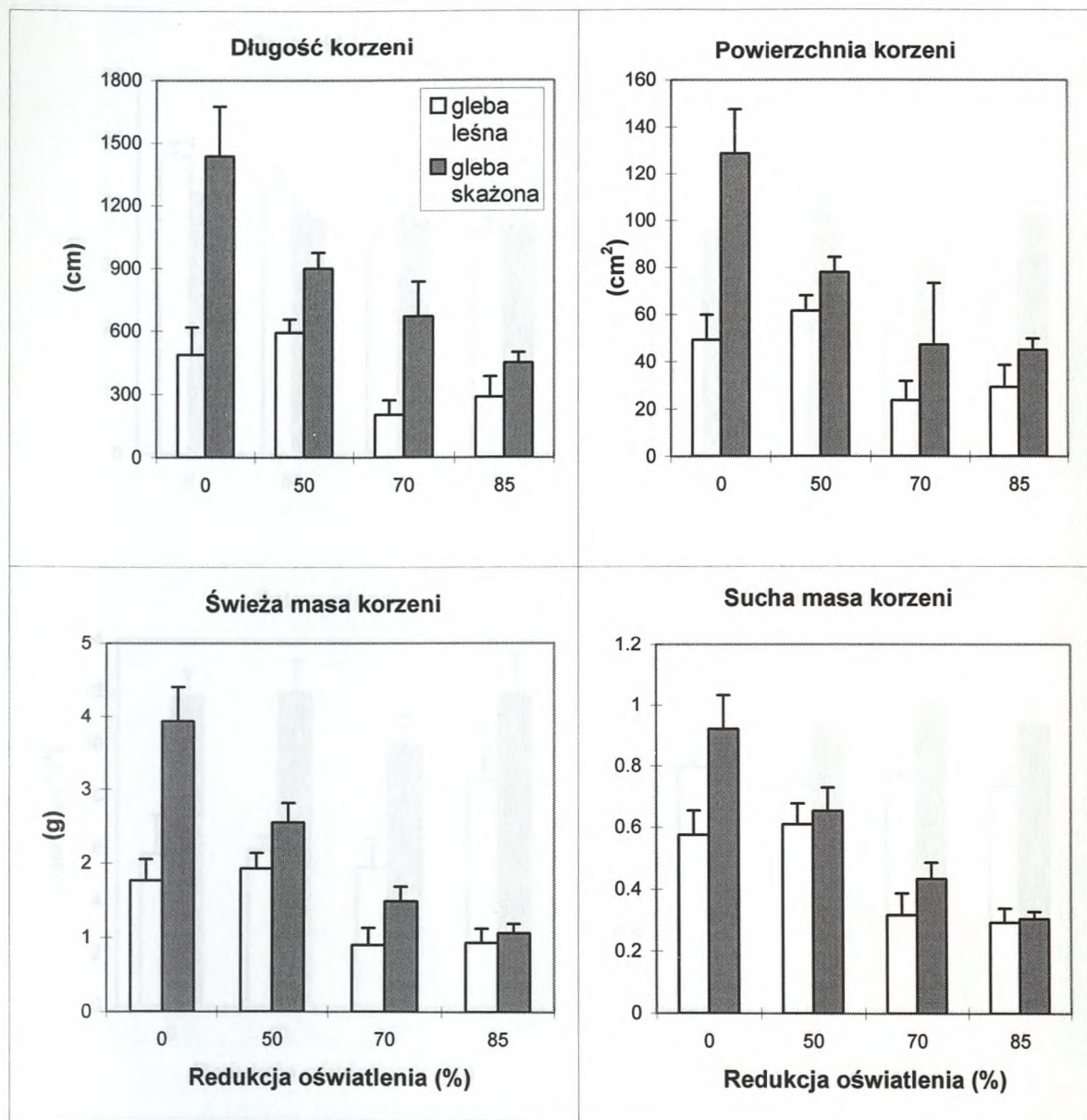
Na tym samym materiale wykonano szereg dodatkowych pomiarów pozwalających ocenić kondycję roślin. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem zacielenia następuje istotny spadek świeżej masy siewek i suchej masy pędu (Ryc. 20).



Ryc. 20. Zmiany świeżej masy siewek, suchej masy pędu, stosunku powierzchni do masy igieł oraz stosunku powierzchni do masy korzeni, w zależności rodzaju gleby i redukcji oświetlenia.

Istotny (Tab. 14) wzrost stosunku powierzchni do masy igieł (Ryc. 20) i spadek grubości igieł (Ryc. 22) świadczą o spadku kseromorficzności igieł wraz zacieleniem. Nastąpił

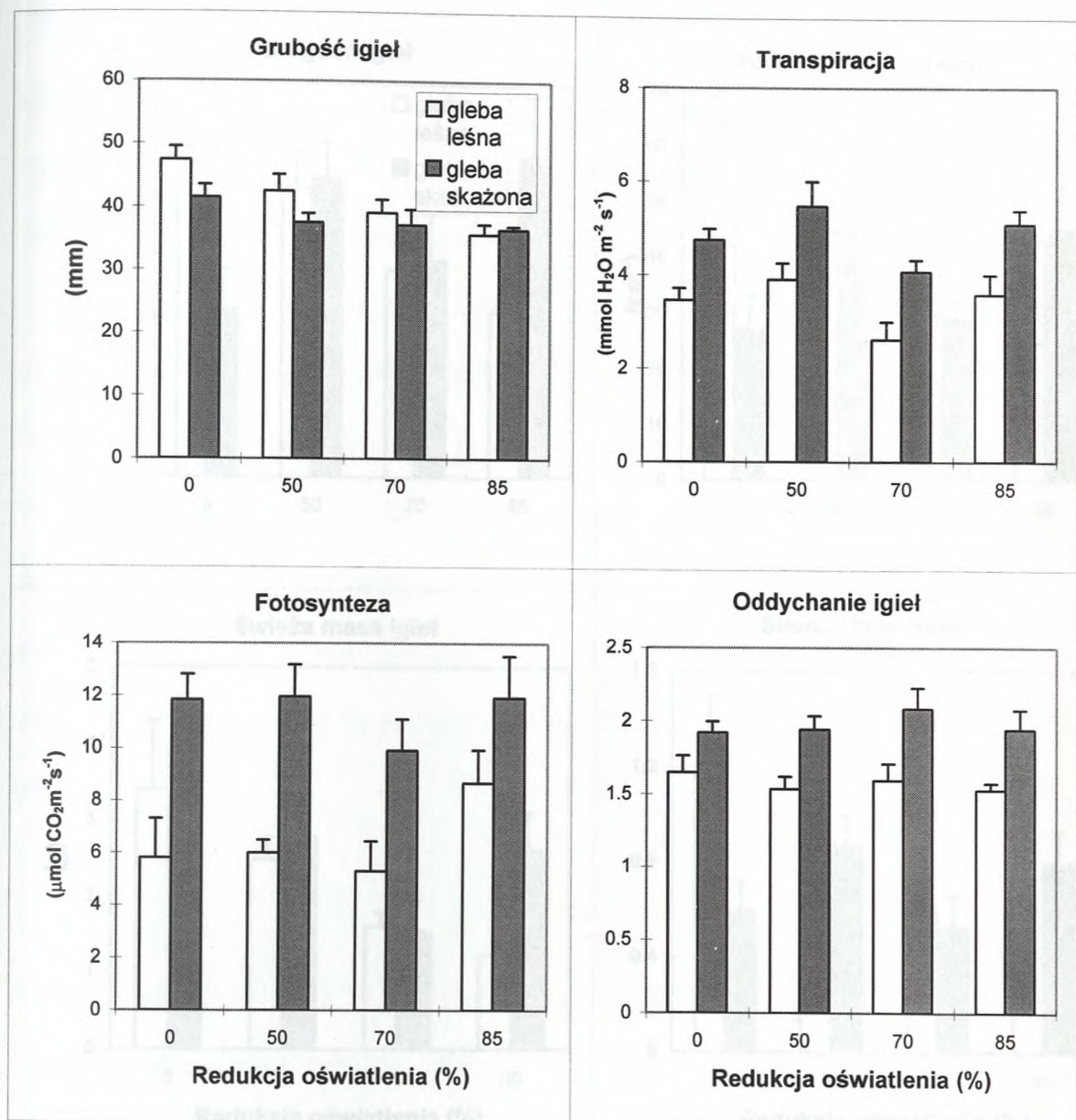
również istotny spadek świeżej i suchej masy oraz długości i powierzchni korzeni, zwłaszcza w glebie z terenu skażonego (Ryc. 21).



Ryc. 21. Zmiany długości, powierzchni, świeżej masy oraz suchej masy wszystkich korzeni na siewce, w zależności rodzaju gleby i redukcji oświetlenia.

W przypadku igieł stwierdzono spadek świeżej i suchej masy oraz powierzchni i długości, ale jedynie w glebie kontrolnej (Ryc. 23). Ponadto stwierdzono szereg różnic pomiędzy siewkami z gleby skażonej i kontrolnej. Świeża masa całych siewek z gleby kontrolnej była niższa (Ryc. 20). Zdecydowanie niższa w glebie kontrolnej była również powierzchnia i długość korzeni (Ryc. 21) oraz stosunek powierzchni do masy korzeni (Ryc. 20). W

siewkach z gleby kontrolnej niższe było również natężenie fotosyntezy netto i transpiracji, a wyższe oddychania igieł (Ryc. 22).

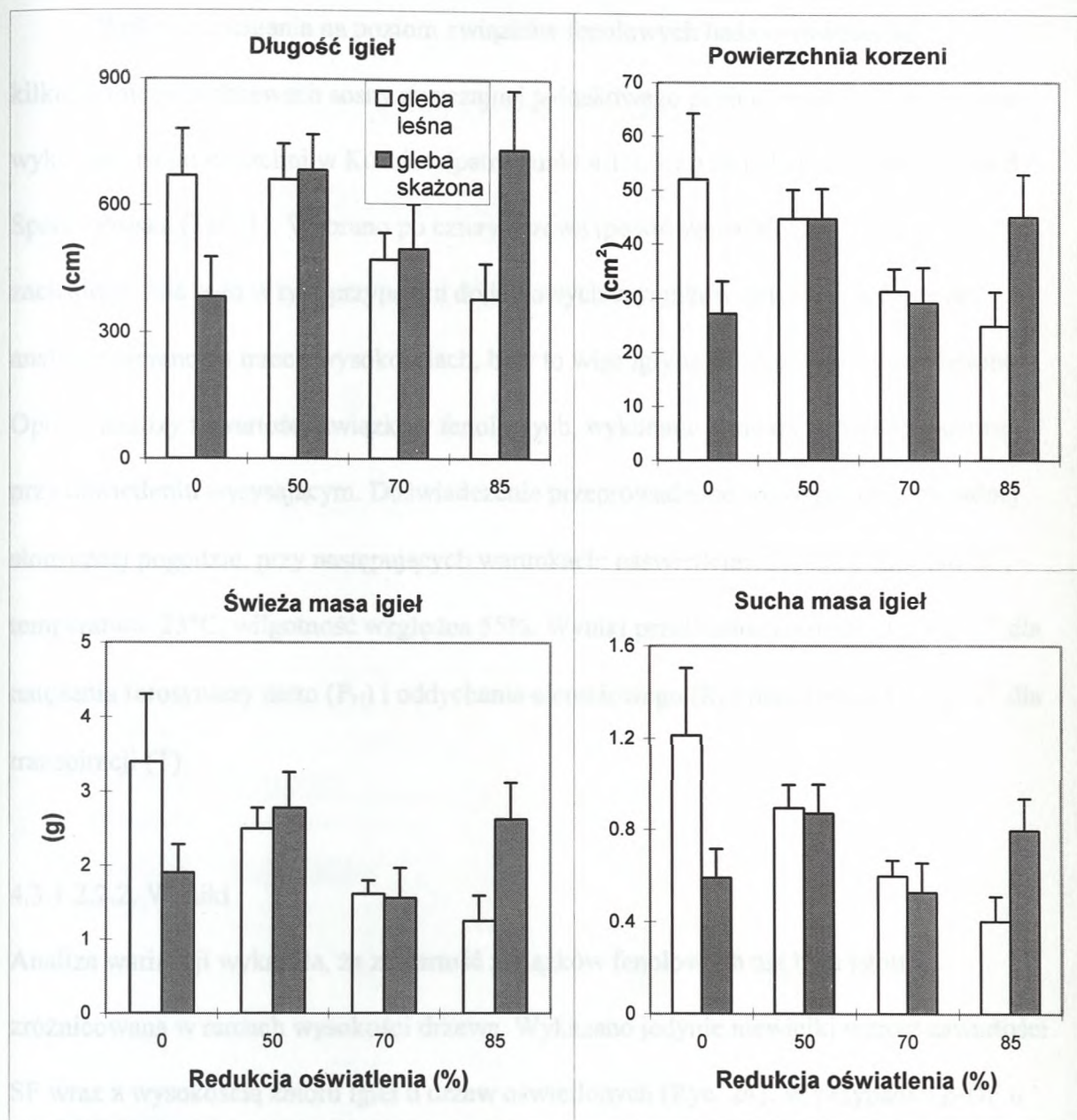


Ryc. 22. Zmiany grubości igieł, transpiracji, fotosyntezy oraz oddychania igieł, w zależności rodzaju gleby i redukcji oświetlenia.

Powyzsze wyniki wskazują jednoznacznie, że siewki z gleby kontrolnej były w gorszej kondycji, co mogło być spowodowane nadmiarem wilgoci w glebie i obumieraniem korzeni. Gleba kontrolna, w odróżnieniu od skażonej, miała strukturę bardziej zbitą, a przez to w większym stopniu zatrzymywała wodę. Różnic tych nie można było zredukować intensywnością podlewania, gdyż rok, w którym przeprowadzono doświadczenia był

bardzo wilgotny, a wprowadzanie dodatkowych osłon powodowałoby, wzrost zacieniania.

Powyższe wyniki zostały przedstawione w sprawozdaniu z grantu KBN (1996).



Ryc. 23. Zmiany długości, powierzchni, świeżej masy oraz suchej masy wszystkich igieł na siewce, w zależności rodzaju gleby i redukcji oświetlenia.

4.3.1.2.2. Doświadczenie II - terenowe

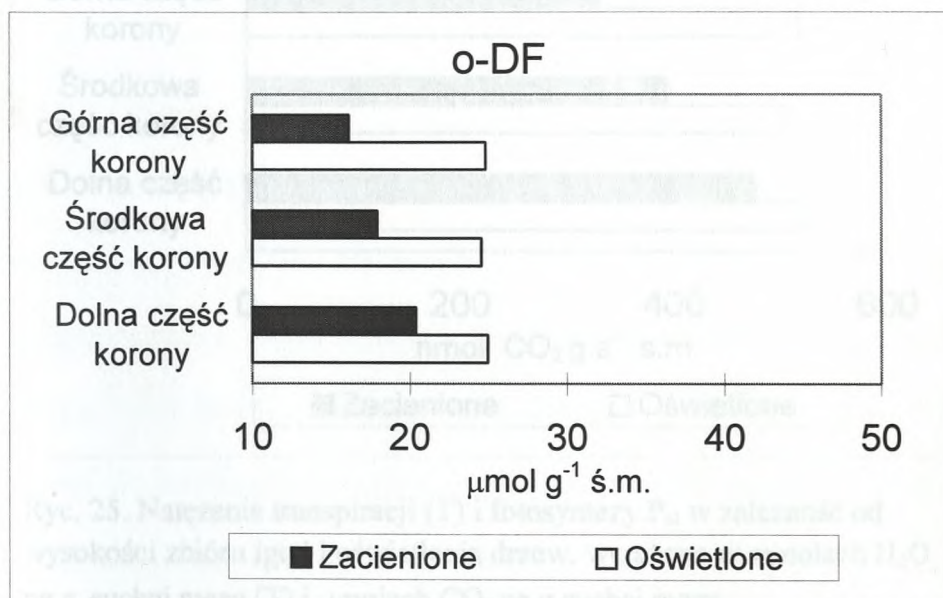
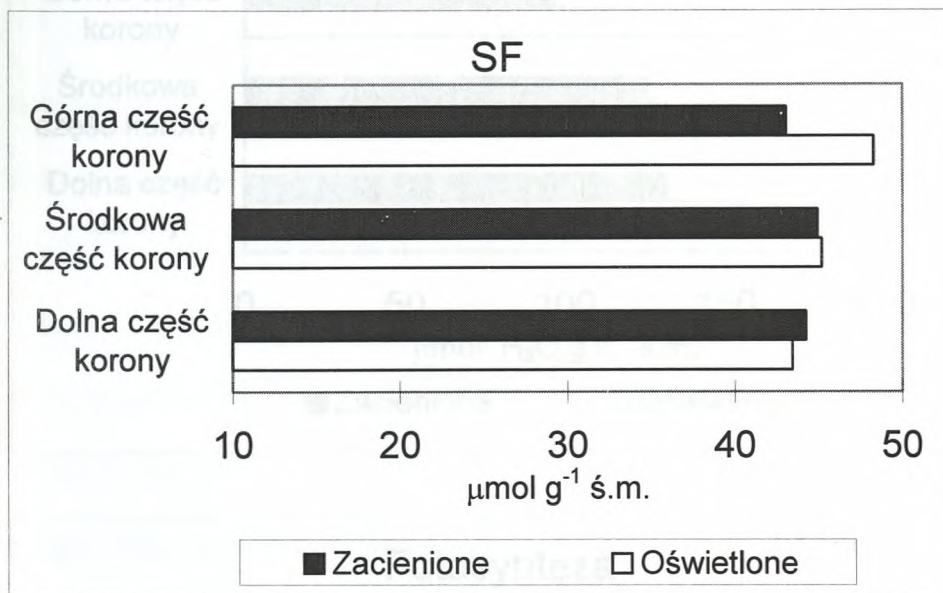
4.3.1.2.2.1. Materiał i metody

Wpływ zacieniania na poziom związków fenolowych badano również na kilkunastoletnich drzewach sosny zwyczajnej jednakowego pochodzenia. Doświadczenie wykonano na powierzchni w Kórniku (patrz punkt 4.1.1.3.1.) na jednej proweniencji nr 5 Spała - Polska (Tab. 1). Wybrano po cztery drzewa (powtórzenia) dobrze oświetlone i zacienione. Nie było w tym przypadku dodatkowych czynników stresowych. Pędy do analiz pobierano na trzech wysokościach, były to więc igły w różnym stopniu oświetlone. Oprócz analizy zawartości związków fenolowych, wykonano pomiary wymiany gazowej przy oświetleniu wysysającym. Doświadczenie przeprowadzono we wrześniu przy ładnej słonecznej pogodzie, przy następujących warunkach: naświetlenie $1157 \pm 51 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura 23°C , wilgotność względna 55%. Wyniki przeliczono na $\text{nmole CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla natężenia fotosyntezy netto (P_N) i oddychania ciemniowego (R_D) oraz $\mu\text{mole H}_2\text{O g}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla transpiracji (T).

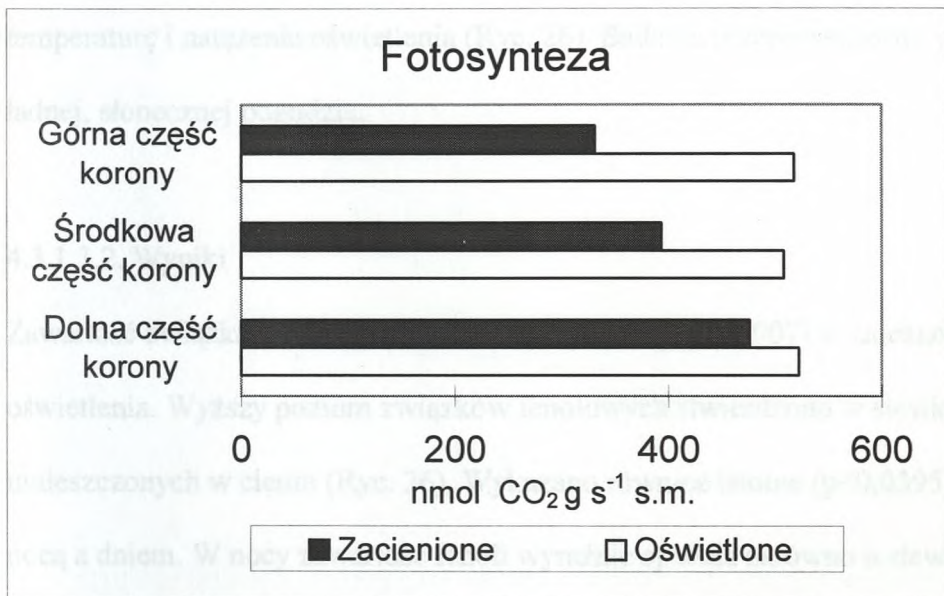
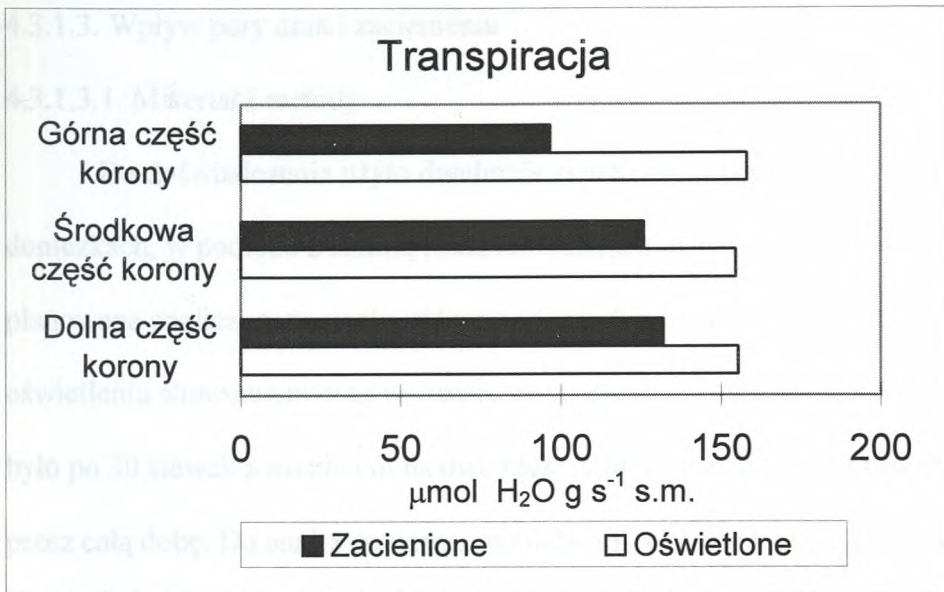
4.3.1.2.2.2. Wyniki

Analiza wariancji wykazała, że zawartość związków fenolowych nie była istotnie zróżnicowana w ramach wysokości drzewa. Wykazano jedynie niewielki wzrost zawartości SF wraz z wysokością zbioru igieł u drzew oświetlonych (Ryc. 24). W przypadku o-DF u drzew zacienionych stwierdzono odwrotną zależność, to znaczy im niżej zbierane były igły tym większa była zawartość fenoli (Ryc. 24). Dla o-DF istotna była również różnica między drzewami dobrze oświetlonymi a zacienionymi. Igły drzew zacienionych charakteryzowały się niższym poziomem o-DF. Podobną zależność u drzew zacienionych stwierdzono w przypadku natężenia transpiracji i fotosyntezy netto (Ryc. 25). Igły z niższych partii korony drzew zacienionych cechowały się wyższym natężeniem transpiracji

i fotosyntezy. Stwierdzono istotne korelacje między: zawartością o-DF i natężeniem fotosyntezy oraz zawartością o-DF i transpiracją, a także fotosyntezą i transpiracją.



Ryc. 24. Zawartość fenoli (SF i o-DF) w zależności od wysokości zbiórki igieł i oświetlenia drzew, wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g świeżej masy.



Ryc. 25. Natężenie transpiracji (T) i fotosyntezy P_N w zależności od wysokości zbiórki igieł i oświetlenia drzew, wyrażona w mmolach H_2O na g suchej masy (T) i μ molach CO_2 na g suchej masy.

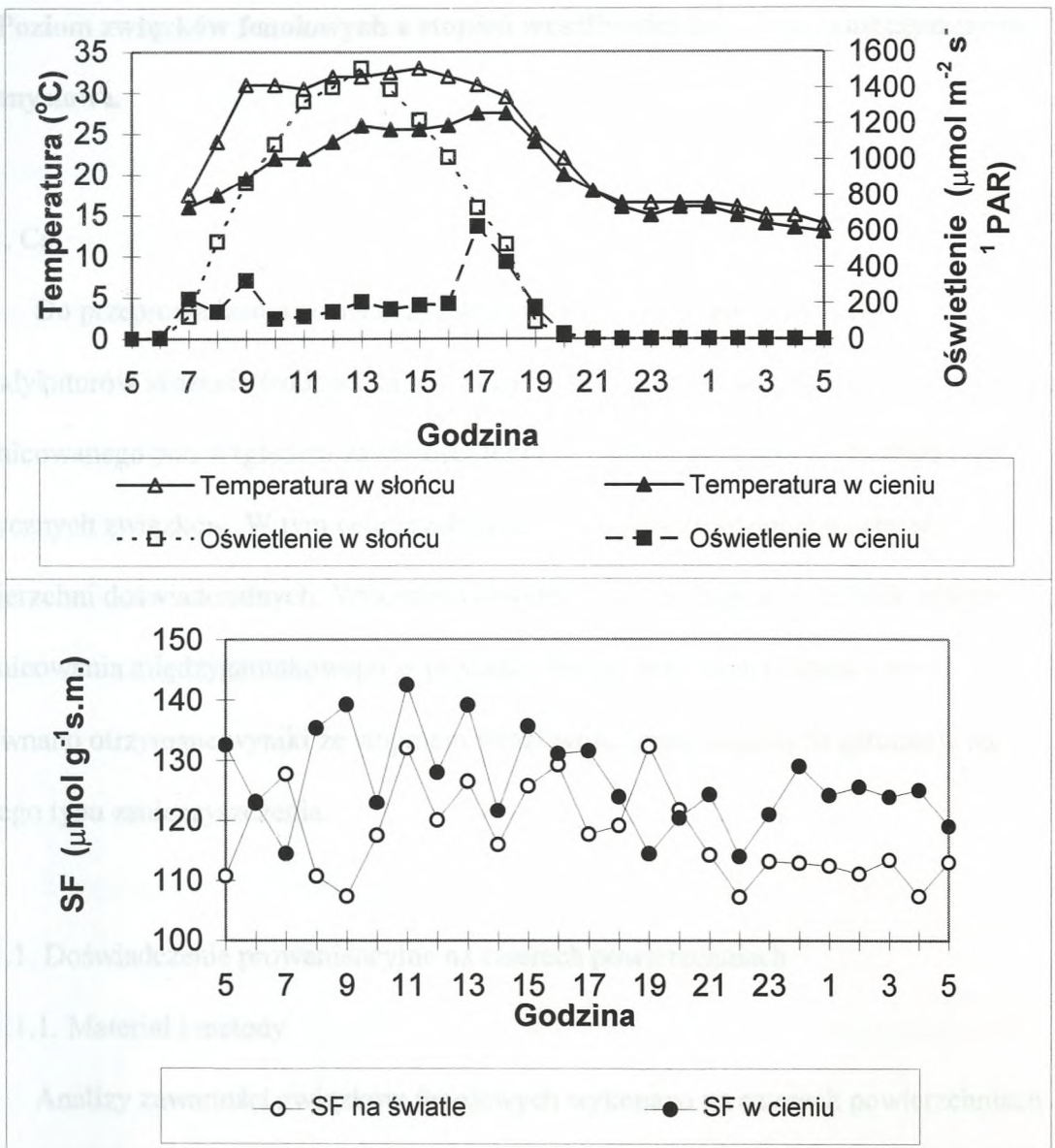
4.3.1.3. Wpływ pory dnia i zacielenia

4.3.1.3.1. Materiał i metody

Do doświadczenia użyto dwuletnie siewki sosny zwyczajnej hodowane w doniczkach, w podłożu z ziemią leśną zmieszana z torfem (3:1). Na dwa tygodnie przed planowaną analizą, w początku sierpnia, doniczki z siewkami umieszczono: w pełnym oświetleniu słonecznym oraz w cieniu, przy północnej ścianie budynku. W obu miejscach było po 30 siewek z rozbiem na dwa bloki. Zbiór materiału przeprowadzano co godzinę przez całą dobę. Do analiz pobierano po jednym krótkopędzie (dwie igły) z siewki i igły z każdego bloku łączono jako jedną próbkę analityczną. Co godzinę notowano również temperaturę i natężenie oświetlenia (Ryc. 26). Badania przeprowadzono w sierpniu przy ładnej, słonecznej pogodzie.

4.3.1.3.2. Wyniki

Zawartość związków fenolowych różniła się istotnie ($p < 0,007$) w zależności od oświetlenia. Wyższy poziom związków fenolowych stwierdzono w siewkach umieszczonych w cieniu (Ryc. 26). Wykazano również istotne ($p < 0,0395$) różnice między nocą a dniem. W nocy zawartość fenoli wyraźnie spadała zarówno u siewek w cieniu jak i w pełnym oświetleniu. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości fenoli w zależności od pory dnia czy nocy.



Ryc.26. Dobowe zmiany oświetlenia i temperatury oraz zawartości fenoli w igłach siewek sosny, umieszczonych w pełnym oświetleniu słonecznym i w cieniu. Oświetlenie wyrażono w $\mu\text{molach na m}^2 \text{s}^{-1}$ światła fotosyntetycznie czynnego (PAR), a zawartość fenoli w $\mu\text{molach kwasu chlorogenowego na g suchej masy}$.

4.4. Poziom związków fenolowych a stopień wrażliwości drzew na zanieczyszczenia przemysłowe.

4.4.1. Cel

Do przeprowadzenia oceny przydatności związków fenolowych jako bioindykatorów skażenia środowiska koniecznym było przeprowadzenie analizy materiału zróżnicowanego pod względem zawartości fenoli i poddanego działaniu różnego typu toksycznych związków. W tym celu przebadano igły sosny zwyczajnej z czterech powierzchni doświadczalnych. Wykonano również badania mające na celu określenie zróżnicowania międzygatunkowego w poziomie fenoli, w ramach rodzaju *Pinus* i porównano otrzymane wyniki ze stopniem wrażliwości poszczególnych gatunków na różnego typu zanieczyszczenia.

4.4.1.1. Doświadczenie proveniencyjne na czterech powierzchniach.

4.4.1.1.1. Materiał i metody

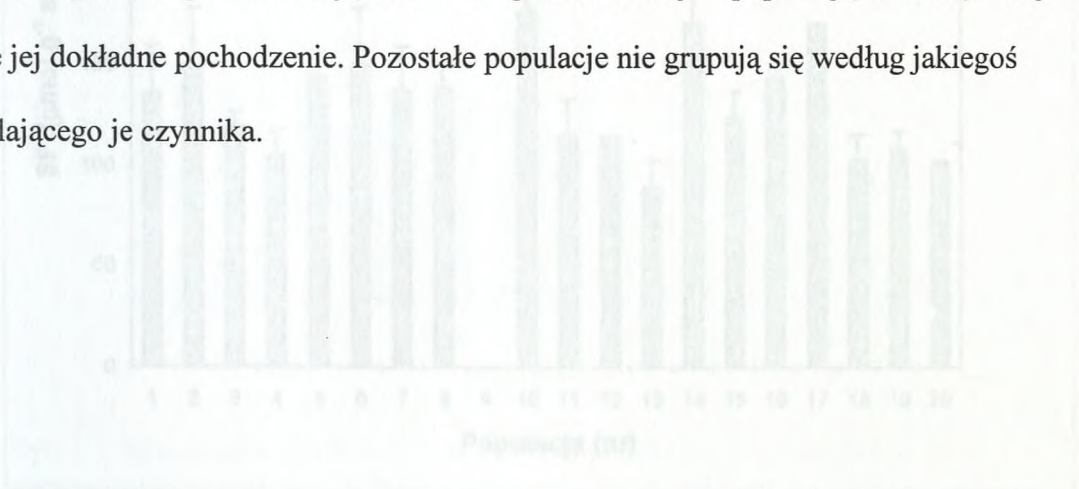
Analizy zawartości związków fenolowych wykonano na czterech powierzchniach badawczych. Dwie z nich (w Kórniku i w Niepołomicach k. Krakowa) zostały założone w ramach doświadczenia IUFRO-1982 (Tab. 1). Powierzchnia w Kórniku, na której przeprowadzono wiele opisywanych wyżej doświadczeń, została opisana w punkcie 4.1.1.3.1., natomiast dane o powierzchni w Niepołomicach podają Oleksyn i Rachwał (1994). Jest to powierzchnia zlokalizowana w dużym kompleksie leśnym Puszczy Niepołomickiej i jest narażona na oddziaływanie zanieczyszczeń pochodzących z aglomeracji miejsko-przemysłowej Krakowa. Dwie pozostałe powierzchnie (w Luboniu i w Głogowie) zostały założone z wykorzystaniem tego samego materiału, czyli siewek sosny 20 europejskich populacji. Powierzchnia w Luboniu była już opisana w podrozdziale

4.1.1.3.1. Czwarta powierzchnia, w Głogowie, zlokalizowana jest w pobliżu huty miedzi i narażona jest na wysokie skażenie przede wszystkim przez metale ciężkie (Oleksyn 1989, Rachwał i in. 1990).

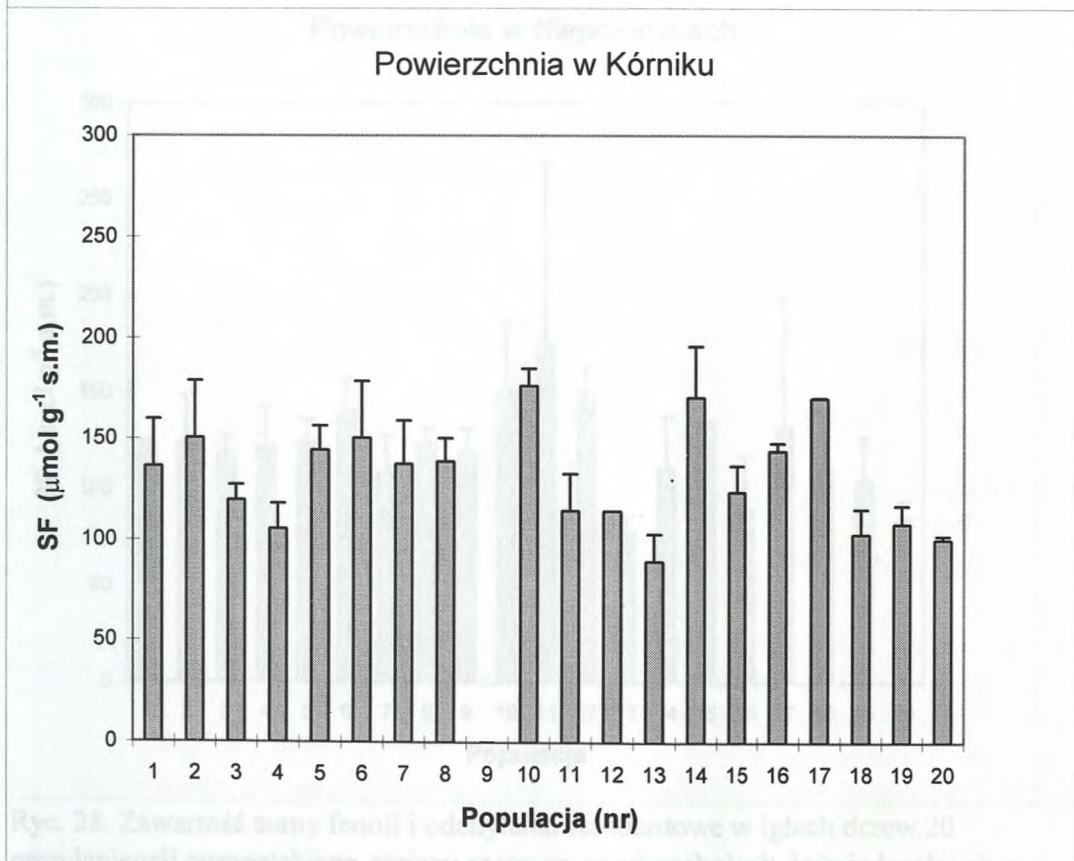
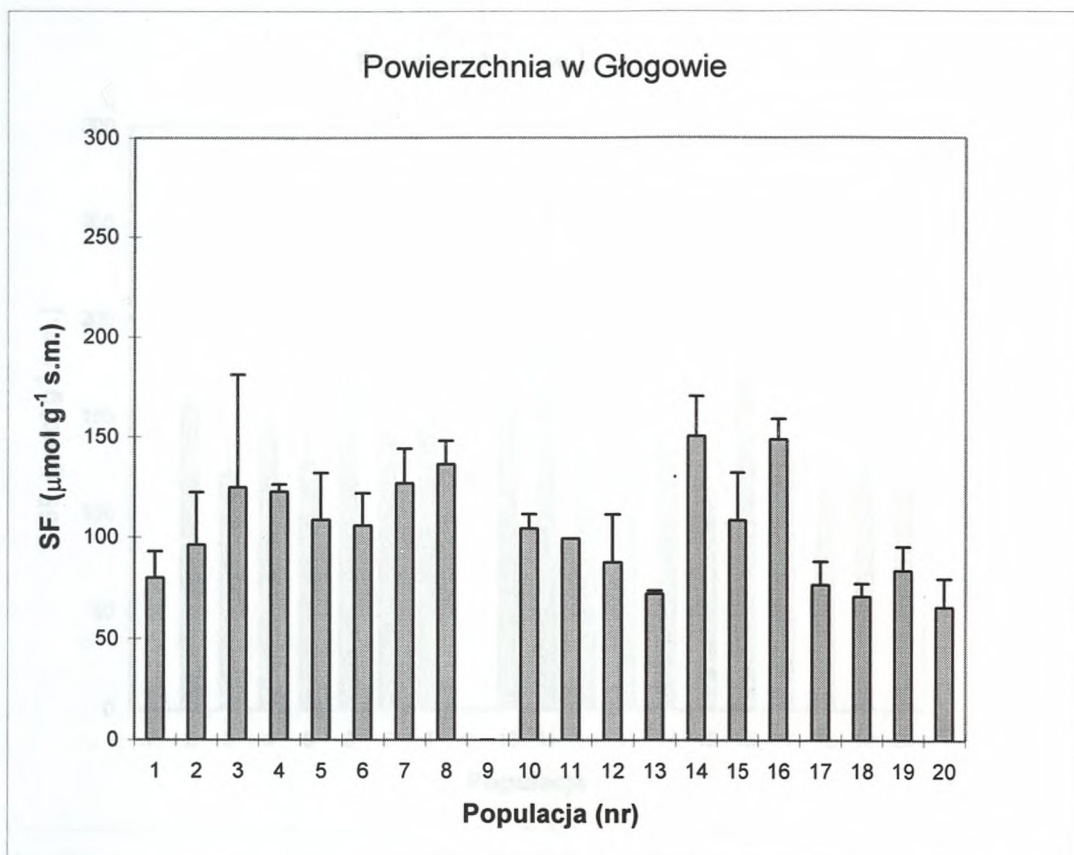
Do analiz pobrano igły z drzew rosnących w dwóch blokach (powtórzeniach), z każdej populacji i na każdej powierzchni. Liczba drzew poszczególnych populacji w ramach bloków była różna i wynosiła od kilku do dwudziestu, igły z nich były łączone, tak że bloki stanowiły powtórzenia. Wszystkie populacje jednak reprezentowane są tylko na powierzchni w Niepołomicach, na pozostałych brakuje populacji nr 9 (Bolewice, Polska), a na powierzchni w Luboniu brakuje jeszcze populacji nr 1 (Roščinskaya Dača, Rosja). Tak więc dwie wymienione populacje zostały pominięte w ogólnej analizie.

4.4.1.1.2. Wyniki

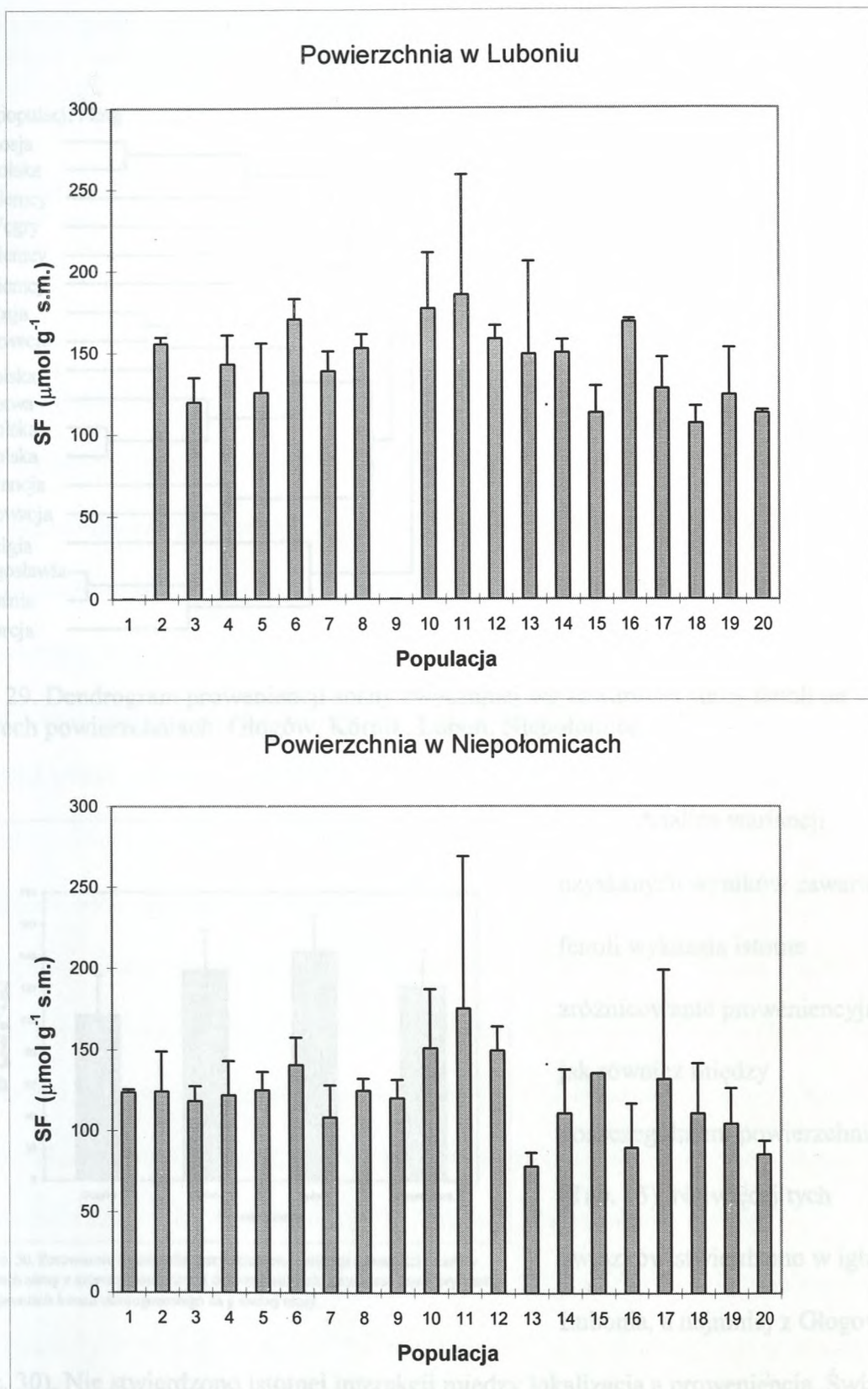
Wyniki zawartości sumy związków fenolowych wskazują na duże zróżnicowanie proveniencyjne (Ryc. 27 i 28). Na średnich wynikach zawartości fenoli dla poszczególnych populacji z czterech powierzchni przeprowadzono analizę grupowania metodą Warda. (Ryc. 29). Wyodrębniono grupę populacji z południa Europy (nr 18, 19, 20), razem jednak z proveniencją nr 13 z Belgii, która nie jest populacją rodzimą i nie jest znane jej dokładne pochodzenie. Pozostałe populacje nie grupują się według jakiegoś określającego je czynnika.



Ryc. 27. Zawartość sumy związków fenolowych (średnia ± odchylenie standardowe) w igłach drzew 20 proveniencji z europejskiego zasięgu huty na powierzchniach doświadczeniowych w Głogowie i Kōrniku, wyrażona w przekładach kwadratów odchylenia standardowego na 2 osobnej



Ryc. 27. Zawartość sumy fenoli i odchylenia standardowe w igłach drzew 20 powienienicy europejskiego zasięgu sosny na powierzchniach doświadczalnych w Głogowie i Kórniku, wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g suchej



Ryc. 28. Zawartość sumy fenoli i odchylenia standardowe w igłach drzew 20 prowienicji europejskiego zasięgu sosny na powierzchniach doświadczalnych w Luboniu i Niepołomicach, wyrażona w mmolach kwsu chlorogenowego na g

Tabela 15. Tabela analizy wariancji zawartości fenoli w igłach i korzeniach siewek sosny zwyczajnej z uwzględnieniem lokalizacji (powierzchni), proveniencji oraz interakcji. p - prawdopodobieństwo (pogrubiona czcionka jeśli $p \leq 0,05$).

Źródło zmienności	St. swob.	Średni kwadrat	p
Lokalizacja (L)	3	9540,119	0,0000
Proweniencja (P)	17	2472,842	0,0000
L*P	51	855,155	0,1047
Błąd	72	620,921	

Wyniki zawartości fenoli zostały porównane z oceną uszkodzeń spowodowanych przez zanieczyszczenia przemysłowe. Oceny uszkodzeń na dwóch powierzchniach w Luboniu i w Głogowie wykonane zostały w 1984 roku przez Oleksyna i wsp. (1988). Stanowią one podstawę do określenia wrażliwości na zanieczyszczenia poszczególnych proveniencji. Ponadto wyniki zawartości fenoli porównano z dostępnymi w literaturze danymi biometrycznymi wykonanymi na tych powierzchniach (Oleksyn 1988a; Oleksyn i Rachwał 1994). Analiza ta wykazała, że zawartości fenoli w igłach na poszczególnych powierzchniach są ze sobą słabo skorelowane. Jedynie na poziomie $p \leq 0,1$ dodatnio koreluje ze sobą zawartość fenoli w igłach na powierzchniach w Kórniku i Głogowie oraz w Niepołomicach i w Luboniu. Średnia zawartość tych związków z czterech powierzchni łącznie koreluje na poziomie $p \leq 0,1$ z uszkodzeniami wywołanymi przez zanieczyszczenia w Luboniu i Głogowie. Natomiast zawartość fenoli w igłach drzew z poszczególnych powierzchni nie jest istotnie skorelowana z wrażliwością wyrażoną stopniem uszkodzenia. Porównanie zawartości fenoli (średnich dla czterech powierzchni) z danymi biometrycznymi wykazało, że jest ona istotnie ($p \leq 0,05$) dodatnio skorelowana z grubością pnia (pomiar w Niepołomicach w 1991r.) (Oleksyn i Rachwał 1994), oraz wysokością drzew w Kórniku (dane za Oleksynem 1988a). Nie stwierdzono istotnych korelacji między zawartością fenoli w igłach drzew z poszczególnych populacji na badanych

powierzchniach, jak i zawartością fenoli (średnią dla wszystkich powierzchni) a długością czy szerokością geograficzną, z której pochodziły nasiona.

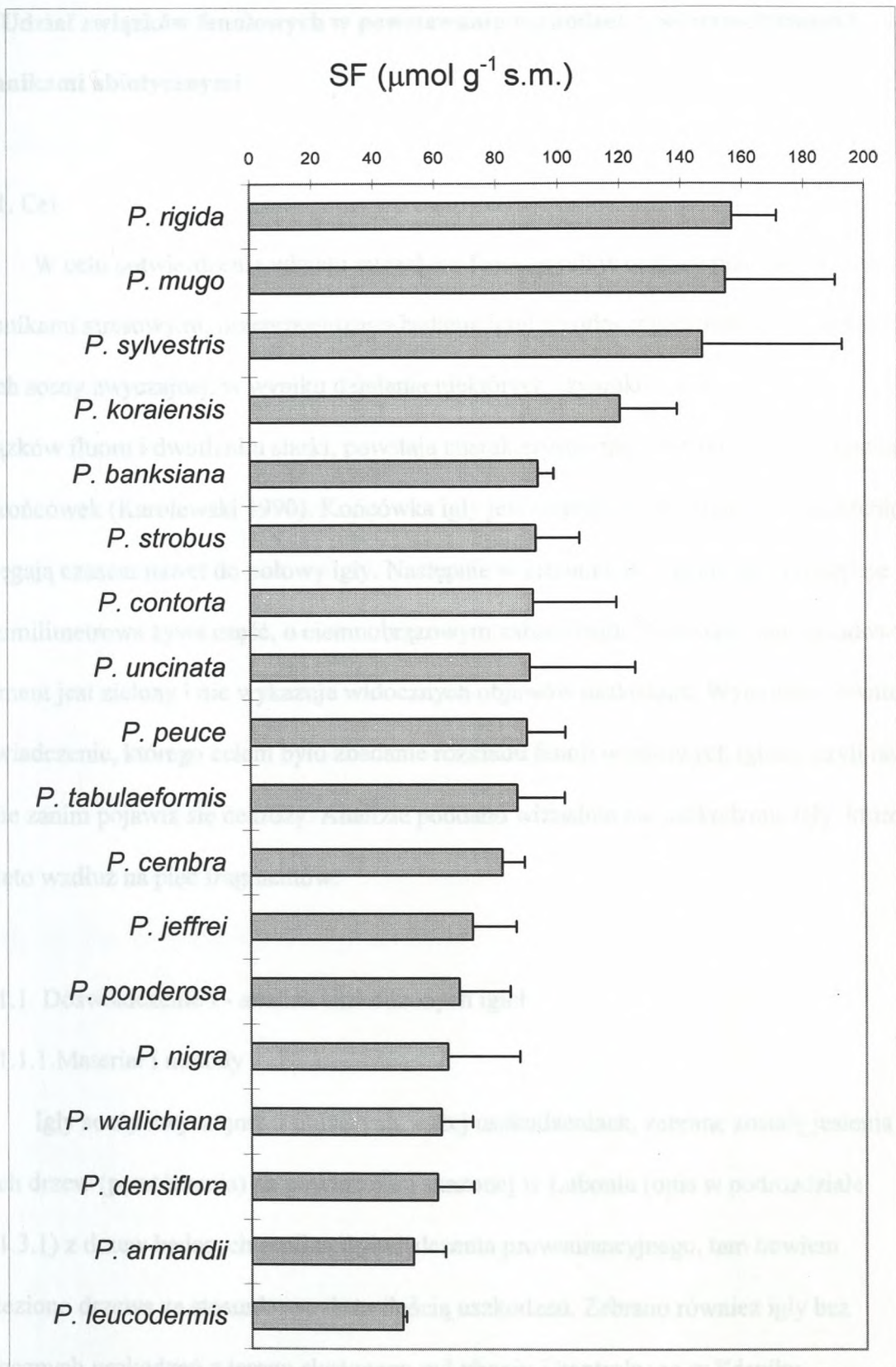
4.4.1.2. Zmienność międzygatunkowa w zawartości fenoli, a wrażliwość na zanieczyszczenia

4.4.1.2.1. Materiał i metody

Kolejnym eksperymentem, mającym na celu określenie zależności między zawartością fenoli a stopniem wrażliwości, była analiza zawartości sumy fenoli (SF) w igłach bieżącego rocznika u osiemnastu gatunków sosen (sosna Armanda - *Pinus armandii*, s. Banksa - *P. banksiana*, limba - *P. cembra*, s. koreańska - *P. koraiensis*, s. bośniacka - *P. leucodermis*, s. czarna - *P. nigra*, s. rumelijska - *P. peuce*, s. żółta - *P. ponderosa*, s. smołowa - *P. rigida*, wejmutka - *P. strobus*, s. zwyczajna - *P. sylvestris*, s. wydmowa - *P. contorta*, s. japońska - *P. densiflora*, s. Jeffreya - *P. jeffreyi*, kosówka - *P. mugo*, s. chińska - *P. tabulaeformis*, kosówka drzewiasta - *P. uncinata*, s. himalajska - *P. wallichiana*), rosnących w Arboretum Kórnickim. Badania przeprowadzono w listopadzie 1996 roku. Wybrane drzewa były w różnym wieku od kilku do kilkudziesięciu lat w zależności od gatunku. Każdy gatunek reprezentowany był przez 3 drzewa (powtórzenia).

4.4.1.2.2. Wyniki

Poziom fenoli w igłach poszczególnych gatunków był bardzo zróżnicowany (Ryc. 31). Zawartość fenoli została skorelowana ze stopniem wrażliwości na działanie: dwutlenku siarki, fluorowodoru, tlenków azotu i ozonu. Obliczenia wykonano dla pierwszych jedenastu gatunków, przebadanych w warunkach laboratoryjnych (Karolewski 1992). Nie stwierdzono jednak istotnej korelacji pomiędzy zawartością tych związków i stopniem uszkodzenia igieł przez którykolwiek z gazów.



Ryc. 31. Zawartość sumy fenoli w igłach osiemnastu gatunków sosen rosnących w Arboretum Kórnickim, wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g suchej masy.

4.5. Udział związków fenolowych w powstawaniu uszkodzeń igieł wywoływanych czynnikami abiotycznymi

4.5.1. Cel

4.5.1.1 W celu potwierdzenia udziału związków fenolowych w obronie przed abiotycznymi czynnikami stresowymi, przeprowadzono badania igieł z widocznymi uszkodzeniami. Na igłach sosny zwyczajnej, w wyniku działania niektórych czynników stresowych np. związków fluoru i dwutlenku siarki, powstają charakterystyczne nekrotyczne uszkodzenia ich końcówek (Karolewski 1990). Końcówka igły jest martwa, wyschnięta, a uszkodzenia te sięgają czasem nawet do połowy igły. Następnie w kierunku do nasady igły występuje kilkumilimetrowa żywa część, o ciemnobrązowym zabarwieniu. Pozostały, przynasadowy fragment jest zielony i nie wykazuje widocznych objawów uszkodzeń. Wykonano również doświadczenie, którego celem było zbadanie rozkładu fenoli w zdrowych igłach, czyli na etapie zanim pojawiają się nekrozy. Analizie poddano wizualnie nie uszkodzone igły, które pocięto wzdłuż na pięć fragmentów.

4.5.1.1.1. Doświadczenie I - analiza uszkodzonych igieł

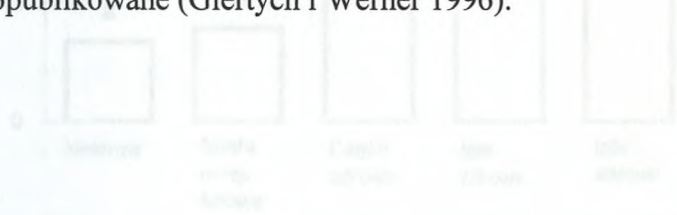
4.5.1.1.1.1. Materiał i metody

Igły sosny zwyczajnej o opisanych wyżej uszkodzeniach, zebrane zostały jesienią z trzech drzew (powtórzenia) na powierzchni skażonej w Luboniu (opis w podrozdziale 4.1.1.3.1) z drzew będących otuliną doświadczenia proveniencyjnego, tam bowiem znaleziono drzewa ze stosunkowo dużą ilością uszkodzeń. Zebrano również igły bez widocznych uszkodzeń z terenu skażonego w Luboniu i kontrolnego w Kórniku. Uszkodzone igły zostały podzielone na następujące fragmenty: część nekrotyczna, strefa przejściowa oraz część wizualnie nie uszkodzona. W igłach oraz ich fragmentach

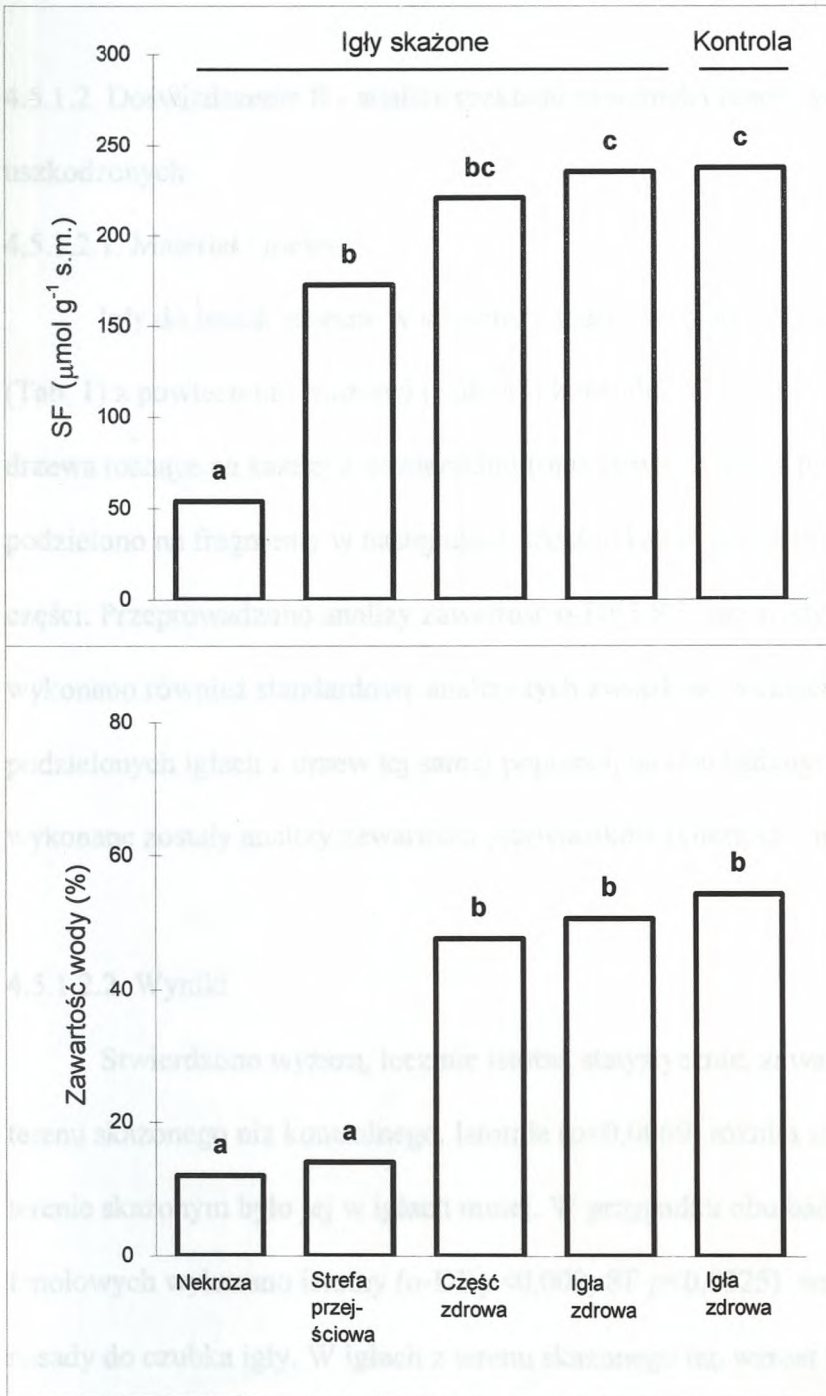
oznaczane były: zawartość fenoli i wody. Ponadto we współpracy z A. Wernerem, z Zakładu Fitopatologii Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku wykonano analizy histochemiczne igieł i ich fragmentów, uszkodzonych w różnym stopniu.

4.5.1.1.2 Wyniki

Analizy wykazały, że zawartość fenoli we fragmentach uszkodzonych igieł była zróżnicowana i zależała od stopnia uszkodzenia. Najmniejszą zawartością tych związków cechowała się nekroza. Poziom fenoli w częściach wizualnie nie uszkodzonych, jak i w zdrowych igłach z terenu skażonego i kontrolnego był stosunkowo wysoki, jednak brak było pomiędzy nimi istotnych różnic (Ryc. 32). Zawartość wolnych fenoli w strefie przejściowej była niższa niż w zdrowych igłach, jednakże stosunek fenoli do wody był istotnie wyższy. Analizy histochemiczne wykazały duże ilości związanych substancji fenolowych w wizualnie nie uszkodzonych fragmentach igieł. Jeszcze bardziej wyrazistą reakcją na obecność fenoli stwierdzono w strefie przejściowej, zwłaszcza w pobliżu nekrozy. Ponadto obserwowano duże ilości lignin i suberyn w nekrozie. Wyniki tych badań zostały opublikowane (Giertych i Werner 1996).



Ryc. 32. Zawartość wolnych fenoli i wody we fragmentach igieł w różnym stopniu uszkodzenia i w igłach zdrowych z terenu skażonego (Lubka) i kontrolnego (Kórnik). Zawartość fenoli wyrażono w mg/g suchej masy chlorogenowego i p-akwabenzoylu, a wody w % w wartości zamoczone jedynkową literą. Nie ma różnic istotnych (p > 0.05).



Ryc.32. Zawartość sumy fenoli i wody we fragmentach igieł o różnym stopniu uszkodzenia i w igłach zdrowych z terenu skażonego (Luboń) i kontrolnego (Kórnik). Zawartość fenoli warażono w µmolach kwasu chlorogenowego na g suchej masy, a wody w % Wartości zaznaczone jednakową literą oznaczają brak różnic na poziomie $p < 0,05$.

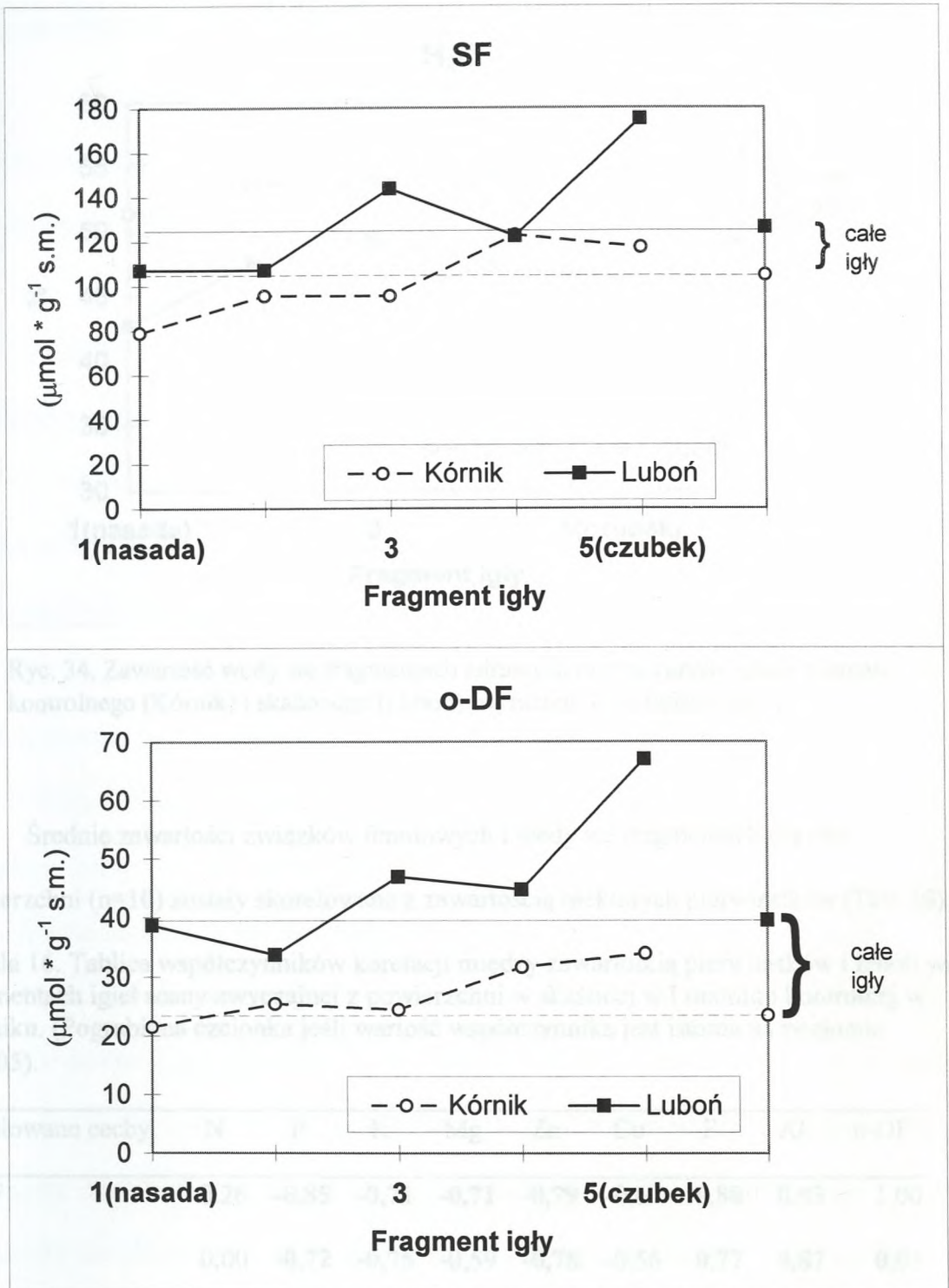
4.5.1.2. Doświadczenie II - analiza rozkładu zawartości fenoli w igłach wizualnie nie uszkodzonych

4.5.1.2.1. Materiał i metody

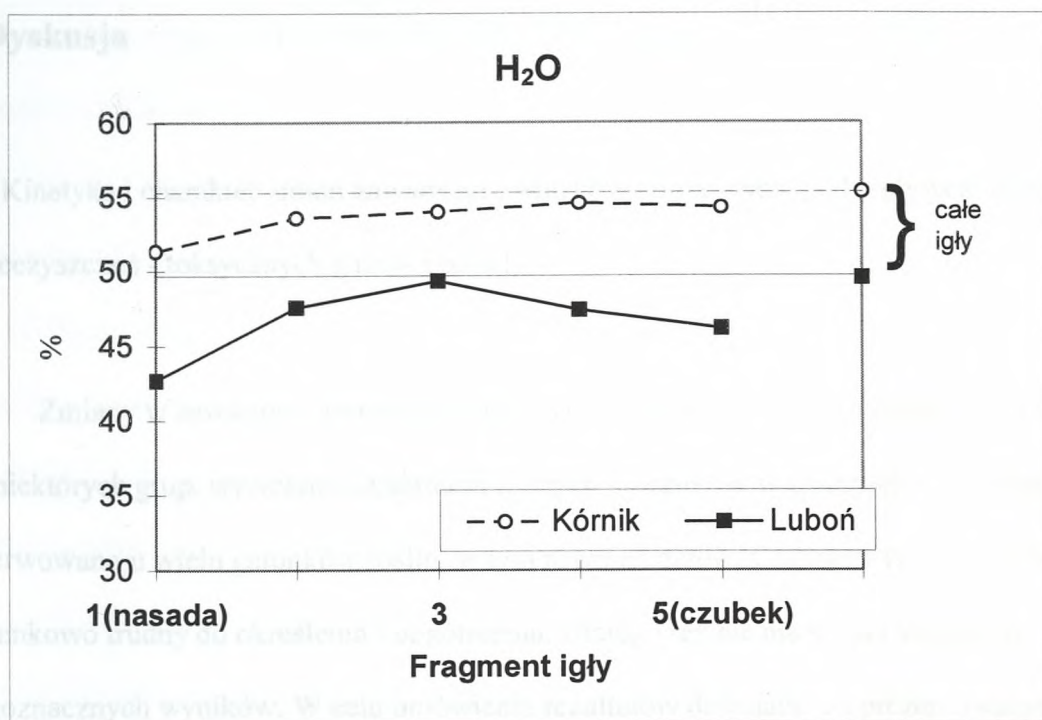
Igły do badań zebrano w styczniu z jednej wybranej populacji nr 7 Spała, Polska (Tab. 1) z powierzchni skażonej (Luboń) i kontrolnej (Kórnik). Do badań użyto po trzy drzewa rosnące na każdej z powierzchni (opis powierzchni w punkcie 4.1.1.3.1). Igły podzielono na fragmenty w następujący sposób: każdą igłę cięto proporcjonalnie na pięć części. Przeprowadzono analizy zawartości o-DF i SF oraz wody. Dla porównania wykonano również standardowe analizy tych związków w całych igłach. W analogicznie podzielonych igłach z drzew tej samej populacji na obu badanych powierzchniach wykonane zostały analizy zawartości pierwiastków (Giertych i in. 1997).

4.5.1.2.2. Wyniki

Stwierdzono wyższą, lecz nie istotną statystycznie, zawartość fenoli w igłach z terenu skażonego niż kontrolnego. Istotnie ($p < 0,0069$) różniła się zawartość wody w terenie skażonym było jej w igłach mniej. W przypadku obu badanych grup związków fenolowych wykazano istotny (o-DF $p < 0,009$; SF $p < 0,0325$) wzrost ich zawartości, od nasady do czubka igły. W igłach z terenu skażonego ten wzrost był znacznie większy (Ryc. 33). Zawartość wody również była istotnie ($p < 0,0014$) różna w poszczególnych częściach igieł, jednak wyniki te mogą być obarczone pewnym błędem, spowodowanym większym ubytkiem wody z fragmentów, które z dwóch stron miały cięcia (Ryc. 34). Cięcie zwiększało parowanie i ubytek wody.



Ryc.33. Zawartość fenoli (SF i o-DF) we fragmentach zdrowych oraz w całych igłach z terenu kontrolnego (Kórnik) i skażonego (Luboń), wyrażona w μmol kwasu chlorogenowego na g suchej masy.



Ryc. 34. Zawartość wody we fragmentach zdrowych oraz w całych igłach z terenu kontrolnego (Kórnik) i skażonego (Luboń), wyrażona w % świeżej masy.

Średnie zawartości związków fenolowych i wody we fragmentach dla obu

powierzchni (n=10) zostały skorelowane z zawartością niektórych pierwiastków (Tab. 16).

Tabela 16. Tablica współczynników korelacji między zawartością pierwiastków i fenoli we fragmentach igieł sosny zwyczajnej z powierzchni w skażonej w Luboniu i kontrolnej w Kórniku. (Pogrubiona czcionka jeśli wartość współczynnika jest istotna na poziomie $p \leq 0.05$).

Korelowane cechy	N	P	K	Mg	Zn	Cu	F	Al	o-DF
o-DF	-0,26	-0,85	-0,71	-0,71	-0,79	-0,67	0,80	0,93	1,00
SF	0,00	-0,72	-0,75	-0,59	-0,78	-0,56	0,77	0,87	0,95
H ₂ O	0,88	0,68	0,29	0,77	0,46	0,42	-0,35	-0,49	-0,59

Zawartość fenoli była dodatnio skorelowana z takimi czynnikami toksycznymi, jak fluor i glin, natomiast ujemnie z niektórymi makro- i mikroelementami (Cu, Mg, P, Zn, K).

5. Dyskusja

5.1. Kinetyka i charakter zmian zawartości związków fenolowych pod wpływem różnych zanieczyszczeń - toksycznych gazów i metali

Zmiany w zawartości związków fenolowych oznaczanych sumarycznie lub tylko ich niektórych grup, wywołane działaniem różnych czynników skażających środowisko, obserwowano u wielu gatunków roślin, w tym również drzew. Charakter tych zmian jest stosunkowo trudny do określenia i uogólnienia. Dlatego też nie ma w tym względzie jednoznacznych wyników. W celu omówienia rezultatów doświadczeń prezentowanych w niniejszej pracy, na tle wyników uzyskanych przez innych autorów, na wstępie zostanie przedstawiona krótka charakterystyka wyników uzyskanych przez innych badaczy.

Doniesienia literaturowe dotyczące wpływu zanieczyszczeń na zawartość związków fenolowych można podzielić na trzy grupy:

a) - w wyniku działania toksycznych zanieczyszczeń następuje wzrost poziomu fenoli.

Wzrost zawartości fenoli w wyniku działania podwyższonych stężeń ozonu został opisany w pracach Howella (1970, 1974), Howella i Kramera (1973). U fasoli, stwierdzono w liściach wzrost poziomu kwasu kawowego. Natomiast w doświadczeniu z dwunastoma odmianami orzecha ziemnego, wykazano istotną korelację między poziomem fenoli a wielkością uszkodzeń liści wywołanych przez ozon. Langebartels i wsp. (1990) podają, że działanie ozonu powodowało u siewek sosny zwyczajnej i świerka pospolitego wzrost poziomu katechiny, który był tym większy im wyższe było stężenie gazu. Rosemann i wsp. (1991) wykazali, że tworzenie się niektórych pochodnych stilbenu - pinosilwinów, jak również aktywność enzymu syntetazy stilbenowej w igłach siewek sosny zwyczajnej, były

indukowane w wyniku działania niewielkich dawek ozonu. Aktywność enzymu i akumulacja tych związków wzrastała wraz ze wzrostem stężenia gazu. Również aktywność amoniakolizy fenyloalaninowej - ważnego enzymu metabolizmu fenoli, wzrastała w wyniku działania ozonu.

Także innego typu zanieczyszczenia, takie jak związki fluoru w powietrzu, powodują wzrost poziomu fenoli w igłach świerka (*Picea abies*) (Keller 1976). Podobnie wzrost zawartości związków fenolowych (orto-dwufenoli, meta-dwufenoli i ogólnej ich puli) u kilku gatunków roślin drzewiastych, rosnących w warunkach skażonego powietrza przez związki fluoru, stwierdziła Yee-Meiler (1974, 1977). Akumulacja tych substancji była tym większa im rośliny znajdowały się bliżej źródła emisji. Poziom bardziej złożonych substancji fenolowych, takich jak antocyjaniny, może się podwyższać w wyniku działania zanieczyszczeń, co stwierdzili w przypadku wpływu ozonu i smogu „białego” typu kalifornijskiego na liście szczawiu Koukol i Dugger (1967). Podobnie Hurwitz i wsp. (1979) wykazali, że ozon powoduje zwiększenie poziomu bardziej złożonych związków pochodnych fenoli, jak na przykład garbników. Macháčková (1994) stwierdziła w warunkach miejskich wyższe zawartości fenoli w igłach kilku gatunków drzew iglastych, rosnących na stanowiskach bardziej skażonych.

Wzrost poziomu pewnych związków fenolowych (piceiny i katechiny) w igłach świerka, na obszarach silnie skażonych przez dwutlenek siarki, tlenki azotu i ozon wykazał Masuch i in. (1992). Stachurski i wsp. (1994) badali zawartość niektórych pierwiastków i polifenoli w igłach świerka pospolitego rosnącego w Karkonoszach, w terenie skażonym przez Al, Pb i S. Autorzy stwierdzili obniżenie zawartości chlorofilu, a wzrost poziomu metabolitów wtórnych (polifenoli) oraz znaczny deficyt Mg. Symulowane działanie kwaśnego deszczu, poprzez opryskiwanie roztworami kwasu siarkowego, także powodowało

w igłach sosny czarnej (*Pinus nigra*) i s. czerwonej (*P. resinosa*) wzrost poziomowi związków fenolowych (Zobel i Nighswander 1991).

b) - w wyniku działania zanieczyszczeń obniża się zawartość związków fenolowych.

Przykładem stwierdzenia spadku zawartości fenoli pod wpływem skażenia może być praca Beyera i wsp. (1993), gdzie po 6 miesiącach ciągłej ekspozycji na SO₂ wykazano redukcję zawartości fungistatycznych pochodnych stilbenów w drobnych korzeniach i korze świerka. Również Julkunen-Tiitto i wsp. (1995) stwierdzili, że produkcja salicyny i kwasu chlorogenowego była istotnie redukowana przy wzroście stężenia SO₂.

c) - w wyniku działania zanieczyszczeń zawartość związków fenolowych nie zmienia się istotnie, zmiany nie przybierają ściśle określonego kierunku lub w przypadku jednych grup fenoli następuje spadek, a u innych wzrost zawartości.

Przykładem jest praca Bookera i wsp. (1996), w której nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości fenoli i proantocyjanidyn przy niskich stężeniach ozonu w igłach bieżącego rocznika sosny (*Pinus taeda*). Również zawartość lignin nie zmieniała się istotnie pod wpływem tego gazu. Natomiast autorzy ci wykazali wzrost zawartości fenoli i proantocyjanidyn o 25-29% w igłach drugiego rocznika *P. taeda*. Zawartość katechin w tych igłach wzrastała o 81%. Katechina jest efektywnym antyutleniaczem i jej podwyższony poziom może chronić przed uszkodzeniami powodowanymi przez ozon. Jordan i wsp. (1991) podali, że eksponowanie siewek sosny (*P. taeda*) na symulowane działanie kwaśnego deszczu oraz jednocześnie O₃, nie powodowało istotnych zmian ogólnej zawartości fenoli w igłach. Jedynie najwyższe ze stosowanych stężeń ozonu (2,5 razy więcej O₃ niż w otoczeniu) przyczyniało się do podwyższenia poziomu tanin, nie wpływając na całkowitą zawartość fenoli. Autorzy sugerują, że działanie O₃ prowadzi jedynie do alokacji wewnątrz poszczególnych grup fenoli bez zmiany ich ogólnej puli. Podobnie Kainulainen i wsp. (1995a) nie stwierdzili wpływu O₃ i O₃ + NO₂, na zawartość związków fenolowych u

siewek sosny zwyczajnej i świerka pospolitego. Również Kettrup i wsp. (1991) stwierdzili wzrost zawartości niektórych fenoli (piceiny, katechiny), wywołanych działaniem H_2O_2 na igły świerka, a spadek innych (p-hydroksyacetoenu i izorapontyny). Richter i Wild (1994) wykazali, że zawartość związków fenolowych w igłach świerka pospolitego zmienia się w wyniku uszkodzeń wywołanych przez ozon. Katechina wykazywała wzrost zawartości w uszkodzonych drzewach, przy czym jej poziom był podobny w igłach drzew nie uszkodzonych, rosnących na różnych stanowiskach. p-hydroksyacetoenu został wykryty w niewielkiej ilości i nie korelował z uszkodzeniami. Ci sami autorzy podają, że w wielu przypadkach obserwowali wzmożoną produkcję związków fenolowych w wyniku działania czynników biotycznych i abiotycznych. Między innymi wykazali oni, że poziom jednych fenoli np. katechiny, epikatechiny, u drzew uszkodzonych jest większy, natomiast innych związków np. piceiny (podstawowego fenolu u świerka), wykazuje spadek zawartości. Związki fenolowe oznaczane ogólnie, nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy powierzchnią skażoną i kontrolną. Podobne wyniki otrzymali Heller i wsp. (1990). Oznaczając aktywność enzymów metabolizmu fenoli stwierdzili oni, że aktywność dehydrogenazy alkoholu cynamyłowego (enzymu szlaku ligninowego) została zwiększona (o 83%) w igłach bieżącego i poprzedniego rocznika, w wyniku traktowania sadzonek świerka O_3 i kwaśną mgłą (pH 3.0). Jednakże aktywność syntetazy chalkonowej, amoniakolizy fenyloalaninowej i zawartość katechiny, astrynginy, isorhapontyny, piceiny i p-hydroksyacetoenu nie wykazywały różnic zależnych od traktowania.

Także w przypadku działania na rośliny toksycznych gazów o charakterze kwasowym, część badaczy wskazuje na brak zmian poziomu fenoli u tych roślin. Na przykład Kainulainen i wsp. (1995b) badając wpływ SO_2 na sadzonki (kilka klonów) oraz siewki (z wolnego zapylenia) sosny zwyczajnej i świerka pospolitego stwierdzili, że gaz nie powodował istotnych zmian zawartości sumarycznie oznaczanych fenoli w igłach. W

doświadczeniu z klonami świerka, brak było wpływu tego gazu na poziom fenoli w korzeniach, a tylko u jednego klonu przy najwyższym ze zastosowanych stężeń SO_2 (0,155 ppm), wystąpił spadek poziomu fenoli. Natomiast w korzeniach siewek świerka zawartość fenoli wzrastała proporcjonalnie do stężenia gazu. Dwutlenek siarki nie wpływał istotnie na zmiany ogólnego poziomu monoterpenu w igłach sosny, a tylko powodował w nich istotny wzrost α -pinenu i obniżenie 3-karenu. Grill i wsp. (1975) wykazali, że chociaż suma związków fenolowych wzrastała w igłach siewek świerka traktowanych SO_2 , to wzrost ten nie był jednak spowodowany przez dwa podstawowe związki fenolowe, występujące u tego gatunku - piceinę i p-hydroksyacetoftenon. Poziom tych dwóch związków obniżał się w igłach poddanych działaniu dwutlenku siarki.

Dane literaturowe nie dają więc jednoznacznej odpowiedzi jak reagują związki fenolowe na skażenie środowiska. Przypuszczalną przyczyną tych rozbieżności są różne warunki prowadzonych doświadczeń oraz różnice związane z wiekiem, rozwojem roślin, stanem fizjologicznym, a także ze zróżnicowaniem gatunków. W prezentowanych badaniach starano się uzupełnić wiadomości na temat wpływu kilku czynników na zawartość fenoli oznaczanych jako suma fenoli, jak i z rozróżnieniem na orto-dwufenole i meta-dwufenole.

Opisane w tej pracy wyniki doświadczeń z wpływem dwutlenku siarki wykazały, że zmiany zawartości fenoli w igłach siewek sosny, wywołane krótkotrwałym działaniem gazu, nie miały charakteru liniowego. Ten typ reakcji zaliczyć możemy do tej opisaną wcześniej w grupie trzeciej (c). Początkowo obserwowano wzrost, następnie spadek i ponowny wzrost zawartości związków fenolowych, w przypadku wszystkich badanych grup fenoli. Podobny obraz uzyskano zarówno w przypadku badania wpływu różnych stężeń SO_2 (4.1.1.1.1.) jak i różnego czasu ekspozycji (4.1.1.1.2.). Tak więc reakcja roślin na skażenie, wyrażająca się zmianami poziomu fenoli, jest w dużym stopniu uzależniona

od czasu ekspozycji i natężenia działającego czynnika. Istotna jest też wrażliwość roślin na zanieczyszczenie. W doświadczeniu ze zmiennym czasem ekspozycji badano siewki dwóch populacji różniących się wrażliwością. Istotny wpływ SO_2 na poziom fenoli uzyskano tylko u populacji wrażliwej. Obserwowany w obu dyskutowanych doświadczeniach początkowy wzrost może być spowodowany, podobnie jak w badaniach Howella (1970) nad wpływem ozonu, przez wzrost aktywności enzymów metabolizmu fenoli i procesów red-oks. Udział fenoli w procesach oddechowych roślin, wykazany przez Tomaszewskiego (1961), jest związany z reakcjami obronnymi i regeneracyjnymi, w których oddychanie odgrywa bardzo ważną rolę (Kozioł i Jordan 1978) [Rola fenoli w reakcjach obronnych będzie opisana w rozdziale 5.5]. Notowany później spadek ma przypuszczalnie związek z procesami syntezy polimerów fenolowych, lignin i innych związków pochodnych (Heller i in. 1990). Kolejny wzrost zawartości fenoli ma już charakter świadczący o przebiegu procesów degradacyjnych w tkankach oraz komórkach i związany jest z powstawaniem nekroz.

Wyniki kolejnego doświadczenia (4.1.1.1.3.), w którym analizowano działanie SO_2 na siewki z kontrolowanego krzyżowania, różniące się wrażliwością na zanieczyszczenia przemysłowe nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie - czy zawartość fenoli jest związana z ich wrażliwością? Dane literaturowe wskazują na istnienie takich zależności w przypadku czynników biotycznych (Feldman i Hanks, 1968; Nicholson i Hammerschmidt, 1992; Rengel i in. 1994). Badając siewki z kontrolowanych krzyżowań starano się ocenić osobno wpływ matki i ojca na zawartość fenoli i wrażliwość na dwutlenek siarki. Otrzymane wyniki nie są istotne statystycznie i wyciąganie jednoznacznych wniosków jest ryzykowne. Istotny wpływ dwutlenku siarki, i to tylko na poziomie $p < 0,08$, uzyskano w przypadku sumy fenoli w korzeniach, gdzie zaobserwowano spadek poziomu fenoli w stosunku do kontroli. Obniżenie zawartości fenoli w korzeniach obserwowany był pod wpływem SO_2 i O_3 również

u świerka i sosny (Beyer i in. 1993; Kainulainen i in. 1995b; Tingey i in. 1976).

Stwierdzenie, w przypadku zawartości o-DF w korzeniach siewek, istotnej statystycznie interakcji między wariantami (krzyżówka x traktowanie), wynika z odmiennej reakcji jednej krzyżówki, u której stwierdzono spadek zawartości o-DF w wyniku działania SO₂. Była to krzyżówka wrażliwego ojca i średnio wrażliwej matki. W pozostałych czterech krzyżówkach wystąpił wzrost poziomu tej grupy fenoli pod wpływem SO₂. Wzrost zawartości o-DF u większości krzyżówek może wynikać z roli jaką ta grupa fenoli odgrywa w procesach oksydacyjnych (Rubin i Arcichowska 1971). Brak jednoznacznej reakcji roślin może być spowodowany zastosowaniem stosunkowo niewielkiej dawki SO₂ (0,25 ppm przez 72 godziny) i dużym zróżnicowaniem genetycznym materiału.

Porównanie wyników zawartości związków fenolowych z innymi metabolitami i parametrami fizjologicznymi pozwoliło stwierdzić istnienie korelacji między zawartością o-DF w igłach, a zawartością glukozy. Podobne dane uzyskali Lavola i wsp. (1994) w wyniku oddziaływania ozonu na brzozę. Wzrost zawartości zarówno o-DF jak i glukozy, u roślin znajdujących się w warunkach stresowych, może być związany ze zwiększonym zapotrzebowaniem na energię dla procesów regeneracyjnych i naprawczych (Kozioł i Jordan 1978).

W kolejnym doświadczeniu (4.1.1.2.1.), którego celem było określenie wpływu jonów toksycznych metali na siewki sosny zwyczajnej, stwierdzone zmiany zawartości fenoli były podobne jak w doświadczeniach z wpływem SO₂ na siewki sosny (4.1.1.1). W przypadku o-DF zmiany nie miały charakteru liniowego, przy czym reakcja roślin była zależna od toksyczności metalu. Im metal był bardziej toksyczny tym reakcja bardziej intensywna. Ustalono następującą kolejność w toksyczności badanych jonów: Cd>Pb>Mn>Al. Potwierdza to doniesienia innych autorów o szczególnej toksyczności

kadmu i ołowiu, w porównaniu z innymi jonami (Carlson i in. 1975; Chaney i Strickland 1984).

Odmierna reakcja korzeni w porównaniu z igłami, na jony toksycznych metali, czyli spadek zawartości fenoli poniżej poziomu kontroli, jest podobna do wyników uzyskanych przez Tingeya i wsp. (1976), Beyera i wsp. (1993) i Kainulainen i wsp. (1995b). Również w przypadku korzeni reakcja była bardziej intensywna u jonów silnie toksycznych Cd i Pb. Przyczyną spadku poziomu fenoli, może być wpływ tych związków z komórek, poprzez uszkodzone błony komórkowe (Kamp-Nielsen 1971; Chen i in. 1991). Wielu autorów podaje, że korzenie są bardziej wrażliwe na jony toksycznych metali niż inne organy roślin (Borkowska 1988, Gabara 1992, Tukiendorf 1992) i są one pierwszą barierą zabezpieczającą całą roślinę przed toksycznymi jonami (Wierzbicka 1992). Stwierdzenie istotnej korelacji między zawartością fenoli a oddychaniem korzeni może potwierdzać rolę tych związków w procesach oddechowych, gdzie pełnią one funkcję przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym, w reakcjach utleniania końcowego, katalizowanych przez oksydazy fenolowe (Rubin i Arcichowska 1971).

Uzyskane w tych badaniach wyniki wskazują na duże podobieństwo zmian zawartości związków fenolowych pod wpływem różnych czynników stresowych (dwutlenku siarki i jonów toksycznych metali). Sugeruje to uniwersalność tych związków jako bioindykatorów skażenia środowiska. Jednak z drugiej strony świadczy o małej ich specyficzności na dany rodzaj stresu.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu hydroponicznym (4.1.1.2.2), w którym przez dłuższy czas analizowano wpływ jonów glinu, o zróżnicowanych stężeniach, na siewki sosny zwyczajnej, również wskazują na brak liniowej zależności między intensywnością czynnika stresowego a zawartością związków fenolowych. Po trzech tygodniach zawartość SF w igłach nie różniła się istotnie od kontroli. Była to podobna reakcja jak w

doświadczeniu (4.1.1.2.1.), gdzie badano kilkudniowe oddziaływanie jonów Al^{+3} . Brak istotnych różnic w zawartości sumy fenoli w siewkach kontrolnych i siewkach traktowanych różnymi stężeniami azotanu glinu, może wynikać z różnokierunkowych zmian jakie zaobserwowano w przypadku o-DF i m-DF, czyli grup wchodzących w skład SF. Wzrost zawartości niektórych fenoli, a spadek innych zaobserwowano w igłach świerka poddanych działaniu stresu Kettrup i wsp. (1991). Zmiany poziomu o-DF w igłach, w doświadczeniu hydroponicznym, przypominają swym charakterem te w opisywanych wyżej badaniach wpływu SO_2 i jonów różnych metali. Znaczący to, że po początkowym wzroście następuje spadek ich zawartości poniżej poziomu kontroli, a następnie ponowny wzrost. Zmiany te odzwierciedlają prawdopodobnie reakcję obronną rośliny, tym bardziej, że poziom fenoli jest istotnie skorelowany z natężeniem oddychania.

Analizy zawartości fenoli w korzeniach potwierdziły wcześniejsze doniesienia o ich odmiennej reakcji na czynniki stresowe w porównaniu do igieł. W doświadczeniu opisywanym (4.1.1.2.1.) powyżej obserwowano spadek zawartości fenoli w wyniku wpływu jonów toksycznych metali na korzenie, podczas gdy w doświadczeniu z jonami glinu (4.1.1.2.2.), po trzech tygodniach traktowania siewek, zaobserwowano niemal proporcjonalny do stężenia wzrost zawartości zarówno sumy fenoli jak i o-DF. Brak istotnych różnic w poziomie SF i o-DF po 6 i 9 tygodniach działania jonów glinu może być częściowo wytłumaczony spadkiem masy korzeni i odpadaniem korzeni drobnych. Możliwe jest również przejście rozpuszczalnych fenoli w nierozpuszczalne polimery (Howell i Kremer 1973), a także ich wypływ do roztworu przez, zniszczone dłuższym działaniem glinu, błony komórkowe (Zieslin i Abolitz 1994). Istotna korelacja między zawartością fenoli w korzeniach i oddychaniem, potwierdza sygnalizowaną już wyżej rolę tych związków w procesach oddechowych.

wykaz Doświadczenia laboratoryjne tylko w pewnym zakresie odzwierciedlają procesy zachodzące w roślinach narażonych na stres spowodowany przez skażenie środowiska. Stosowanie metabolitów roślinnych jako wskaźników reakcji na stres ma sens tylko w warunkach realnego skażenia. Dlatego też równolegle z badaniami laboratoryjnymi prowadzone były prace terenowe, w warunkach oddziaływania zakładów przemysłowych. Wild i Schmitt (1995) podkreślali jak istotne jest, aby bioindykator biochemiczny miał niewielką lub przynajmniej dobrze znaną zmienność sezonową. Przeprowadzone doświadczenie sezonowe (4.1.1.3.) pozwoliło w pewnej mierze poznać zmiany poziomu fenoli w przeciągu sezonu wegetacyjnego. Zaobserwowany w ciągu jednego roku wzrost poziomu związków fenolowych potwierdza dane uzyskane przez Estebauera i wsp. (1975), którzy stwierdzili wzrost zawartości fenoli w igłach świerka pospolitego w ciągu sezonu wegetacyjnego. W badaniach wykonanych na drzewach liściastych, stwierdzono natomiast spadek zawartości fenoli wraz z rozwojem liści (Feeny i Bostock 1968; Dawra i in. 1988; Ernst i in. 1991). Stwierdzono również spadek poziomu fenoli wraz z wiekiem komórek kory u kilku drzew iglastych, w tym sosny zwyczajnej (Weiss i in. 1995) oraz w pędach (Nerg i in. 1994). W prezentowanych tutaj badaniach zaobserwowany wzrost poziomu fenoli w czasie na powierzchni kontrolnej, można uznać za naturalny. Natomiast istotnie wyższy poziom sumy fenoli na powierzchni skażonej, głównie przez związki fluoru, jest wyrazem reakcji roślin na zanieczyszczenia. Podwyższony poziom fenoli w pobliżu źródła emisji związków fluoru stwierdziła również Yee-Meiler (1977). Także w innych badaniach stwierdzono zależność podwyższenia poziomu fenoli wraz ze wzrostem dawki czynnika stresowego (Keller 1976; Langebartels i in. 1990). Z tych też powodów wielu autorów wskazuje na możliwość wykorzystywania pomiaru zawartości związków fenolowych jako bioindykatorów (Yee-Meiler 1974; Yee-Meiler 1977; Karolewski i Daszkiewicz 1988; Zobel i Nighswander 1991; Richter i Wild 1994). W przeprowadzonym doświadczeniu

wykazano, że bardzo istotny wpływ na wynik (Tab. 5) ma termin zbioru, a także pochodzenie drzew. Tak więc we wszelkich pracach bioindykacyjnych należy na te czynniki zwrócić szczególną uwagę. Tym bardziej, że jak wskazują uzyskane wyniki, istnieją istotne interakcje między pochodzeniem drzew a lokalizacją, to znaczy, że w warunkach skażenia pewne populacje mogą zachowywać się odmiennie.

Przeprowadzone analizy zawartości w igłach fenoli związanych z terenu skażonego i kontrolnego nie wykazały istotnych różnic w poziomie tych związków pomiędzy powierzchniami i potwierdziły dane Masucha i wsp. (1992) o niewielkim zróżnicowaniu w poziomie fenoli związanych. Do standardowych analiz brane są igły bez wizualnych uszkodzeń, a zwiększonych ilości fenoli związanych np. w ścianach komórkowych, należy oczekiwać w tkankach uszkodzonych, w pobliżu nekroz. Tak więc określanie zawartości fenoli związanych w celach bioindykacyjnych nie wydaje się przydatne, gdyż potrzebny jest dobry wskaźnik zanieczyszczenia na etapie zanim pojawią się objawy wizualne.

5.2. Wpływ wieku igieł na zmiany poziomu fenoli u drzew w stresie

Sosna, jak większość gatunków iglastych, utrzymuje kilka roczników igieł. Okres pozostawania na drzewie zielonych igieł jest uzależniony między innymi od zanieczyszczenia środowiska. W terenach skażonych igły utrzymywane są krócej, można więc sądzić, że procesy dojrzewania i starzenia przebiegają tam szybciej. Ponieważ związki fenolowe biorą udział w tych procesach (González i in. 1991; Richter i Wild 1992) dla celów bioindykacyjnych konieczna jest znajomość wpływu wieku na poziom fenoli. Zmiany poziomu związków fenolowych z wiekiem liści czy igieł są w literaturze dobrze udokumentowane (Yee-Meiler 1974; Masuch i in. 1992; Macháčková 1994). Potwierdzają je również prezentowane w tej pracy wyniki. Większość doświadczeń wykonanych na

drzewach iglastych ogranicza się jednak tylko do analizy dwóch roczników igieł. Z bioindykacyjnego punktu widzenia bardzo istotne jest w jakim wieku powinien być materiał, aby najlepiej odzwierciedlał zmiany wywołane przez zanieczyszczenia przemysłowe. Badania przeprowadzone na trzech gatunkach sosen, w tym na dwóch w terenie kontrolnym i skażonym, w pewnym stopniu wyjaśniają postawioną wyżej kwestię. Uzyskany dla trzech roczników igieł sosny zwyczajnej, pobranych z powierzchni kontrolnej niemal liniowy wzrost zawartości fenoli wraz z wiekiem, jest wyrazem naturalnych procesów dojrzewania i starzenia. Stwierdzenie tej zależności u trzech badanych proveniencji i obu grup związków fenolowych pozwala sądzić, że ma ona charakter ogólny. Wzrost zawartości fenoli z wiekiem igieł sosny zwyczajnej stwierdziła również (Yee-Meiler 1974). Zdecydowany wzrost zawartości obu badanych grup fenoli w drugim roczniku igieł z powierzchni skażonej, związany jest przypuszczalnie z reakcjami obronnymi roślin i rolą związków fenolowych w tych procesach (Rubin i Arcichowska 1971). Wzrost ten może odzwierciedlać również przyśpieszenie procesów starzenia, spowodowane przez zanieczyszczenia, tym bardziej, że brak jest istotnych zmian między drugim a trzecim rocznikiem igieł z powierzchni skażonej oraz, że taki poziom fenoli na powierzchni kontrolnej osiągany jest dopiero w trzecim roczniku igieł.

Wyniki uzyskane na dwóch innych gatunkach sosen są potwierdzeniem wyników otrzymanych w badaniach sosny zwyczajnej. Sosna bośniacka, badana tylko w terenie kontrolnym, ale charakteryzująca się dużą ilością roczników igieł, również cechuje się istotnym wzrostem zawartości fenoli wraz z wiekiem igieł. Duża zawartość związków fenolowych w starszych rocznikach igieł przy jednoczesnym spadku zawartości wody jest prawdopodobnie związana z reakcją obronną przed szkodnikami (Oleksyn i in. 1997).

Kolejnym potwierdzeniem wzrostu zawartości fenoli wraz z wiekiem igieł były badania wykonane na sośnie czarnej. Charakter tych zmian w igłach kolejnych roczników

na powierzchni skażonej był bardzo podobny do wyników uzyskanych w przypadku sosny zwyczajnej. Tu również już w drugim roczniku, osiągany jest stosunkowo wysoki poziom fenoli, który utrzymuje się aż do ostatniego w danych warunkach, czyli 5 rocznika. Ten wysoki poziom osiągany jest w igłach z powierzchni kontrolnej dopiero w ostatnim roczniku. Różnice w zmianach zawartości związków fenolowych między powierzchniami, potwierdza istotna interakcja wieku i lokalizacji. Na podstawie tych wyników należy stwierdzić, że właśnie drugi rocznik igieł najbardziej nadaje się dla celów bioindykacyjnych, gdyż tu możemy spodziewać się największych zmian.

Wykonane na tym samym materiale, to znaczy na igłach sosny czarnej z obu powierzchni, analizy zawartości wybranych pierwiastków potwierdziły rolę fenoli w reakcji drzew na zanieczyszczenia. Istotne dodatnie korelacje między fenolami, a toksycznymi pierwiastkami (F, Mn, Fe) świadczą o zbieżności procesów odkładania się niekorzystnych dla roślin jonów oraz akumulacji związków fenolowych, biorących udział w reakcjach obronnych np. przez tworzenie barier ochronnych (Karolewski i Daszkiewicz 1988). Również ujemne korelacje między podstawowymi składnikami odżywczymi (N, P, K) a fenolami, świadczą o wskaźnikowej roli tych związków w przypadkach gorszej kondycji rośliny czy tkanki. Ujemne korelacje fenoli z N, P, K nie potwierdzają doniesień Ernsta i in. (1991), gdzie w liściach akacji stwierdzono dokładnie odwrotne relacje. Zależność między fenolami a podstawowymi składnikami odżywczymi może być uwarunkowana czynnikami środowiskowymi. W tych badaniach lokalizacja powierzchni doświadczalnej miała istotny wpływ zarówno na zawartość azotu i potasu w igłach, jak i obu badanych grup fenoli, tak więc czynnik środowiskowy jest bardzo istotny.

5.3. Modyfikujący wpływ czynników zewnętrznych (nawożenia, światła) na poziom fenoli u roślin w warunkach stresu

Zawartość związków fenolowych zmienia się pod wpływem wielu czynników, nie tylko stresowych. W literaturze dobrze udokumentowany jest wpływ nawożenia azotowego na zawartość związków fenolowych w liściach czy igłach drzew. Spadek zawartości fenoli w wyniku nawożenia azotem stwierdzili: w liściach buka - Balsberg-Påhlsson (1992), w liściach wierzby - Hakulinen i wsp. (1995), w liściach brzozy - Lavola i Julkunen-Tiitto (1994), w igłach siewek jodły - Muzika i Pregitzer (1992). Brak było jednak doniesień o wpływie nawożenia wapniowego na poziom fenoli. Nawożenie wapniowe poprzez podniesienie pH może w znaczący sposób ograniczać dostępność pewnych toksycznych pierwiastków, takich jak Al czy Mn, ograniczając przez to ich szkodliwe działanie (Rengel 1992). W przeprowadzonym doświadczeniu (4.3.1.1.1), gdzie badano jednoczesny wpływ jonów glinu i nawożenia wapniowego, spadek zawartości o-DF i brak różnic w SF w igłach są bardzo podobne do wyników uzyskanych w doświadczeniu (4.1.1.2.1.) z wpływem kilku toksycznych metali (Karolewski i Giertych 1994). Obniżenie zawartości o-DF może być spowodowane tym, że dodając glin w formie azotanu wprowadzono dodatkowe ilości azotu, który obniża poziom związków fenolowych. Brak różnic w poziomie o-DF i wzrost zawartości SF w korzeniach siewek wraz ze wzrostem stężenia glinu odróżnia otrzymane tu wyniki od uzyskanych wcześniej gdzie badano wpływ jonów metali. Tam bowiem stwierdzono istotny spadek poziomu zarówno o-DF jak i SF. Brak spodziewanego efektu obniżenia zawartości fenoli w wyniku dodania wapnia, może być spowodowany tym, że przy niskich stężeniach Al, wapń potęguje niekorzystne działanie glinu, a dopiero przy wyższych umniejsza je (Henriksen i in. 1992). Ponadto nadmiar jonów Ca⁺² powoduje obniżenie jonów

Mg^{+2} , a to z kolei może podwyższać zawartość fenoli (Tab. 15). Przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych badania wpływu jonów wapnia na poziom fenoli nie wykazały jednoznacznych zależności.

Wyniki doświadczenia terenowego (4.3.1.1.2.) wykazały większy wpływ lokalizacji i proveniencji na zawartość fenoli niż nawożenia. Zawartość fenoli tylko nieznacznie wzrastała w wyniku nawożenia. Nawożenie spowodowało też nieznaczną redukcję obserwowanych uszkodzeń igieł i to dopiero po drugim roku. Brak jednoznacznego wpływu nawożenia wapniowego mogło być spowodowane małymi dawkami Ca, a także znoszeniem się oddziaływania poszczególnych jonów. Skutki nawożenia wapniowego należy wziąć jednak pod uwagę przy planowanych pracach bioindykacyjnych.

W wielu badaniach, nie tylko bioindykacyjnych, bardzo ważne jest zbieranie materiału w taki sposób, aby był on mało zróżnicowany, pod względem takich czynników jak oświetlenie. Zawartość wielu metabolitów roślinnych jest bardzo ściśle uzależniona od światła. W literaturze istnieją doniesienia mówiące o wpływie światła na poziom związków fenolowych. Dane te okazują się jednak niejednoznaczne. Są prace przedstawiające wzrost zawartości fenoli pod wpływem światła (Siegelman 1964; Kubačkova i in. 1994), jak również ich spadek (Kar i Mishra 1976).

W omawianych tu badaniach (4.3.1.2.1.) przebadano zmiany niektórych parametrów fizjologiczno-biochemicznych, pod wpływem zróżnicowanego oświetlenia i dwóch rodzajów podłoża. Podłoża użyte do doświadczenia różniły się zarówno pod względem stężenia podstawowych składników jak i niektórych pierwiastków toksycznych. Zawartość wszystkich pierwiastków w glebie mieściła się w normach podawanych przez Kabatę-Pendias i Pendiasa (1993). Ponadto zaobserwowano różnice w strukturze gleby, determinujące warunki wodne w pojemnikach z siewkami. Warunki te prawdopodobnie w znaczący sposób wpłynęły na uzyskane wyniki.

Uzyskane w tym doświadczeniu (4.3.1.2.1.1.) wyniki świadczą o tym, że światło wpływa istotnie na wiele podstawowych parametrów fizjologicznych. Wzrost, w miarę wzrostu zacienienia, stosunku powierzchni do masy igieł, a także spadek grubości igieł dowodzą spadku kseromorficzności igieł. Zaobserwowany trend spadkowy w zawartości związków fenolowych również potwierdza to zjawisko. Zależności między zawartością fenoli a zdrewnieniem ścian komórkowych badał m.in. Tomaszewski (1961) stwierdzając, że stopień zdrewnienia pędów moreli i brzoskwiń, wyrażony poziomem lignifikacji i suberynizacji, był wprost proporcjonalny do zawartości fenoli i aktywności fenolazy w pędach tych drzew.

Ograniczenie ilości światła powodowało spadek produkcji biomasy, wyrażony spadkiem świeżej masy siewek. Reakcja siewek sosny była odmienna w zależności od gleby w jakiej rosły, o czym świadczą istotne interakcje między zacienieniem a glebą, dla suchej masy igieł i świeżej masy korzeni. Sucha masa igieł obniżyła się istotnie ze wzrostem zacienienia w glebie kontrolnej, a masa korzeni spadła w glebie skażonej. Przyczyną tych rozbieżności były prawdopodobnie różnice w strukturze podłoża. Gleba kontrolna była bardziej zbita, przez to mniej przepuszczalna dla wody. Korzenie siewek rosnących w tej glebie były wyraźnie w gorszej kondycji, co wyrażone jest istotnie niższą ich masą i długością oraz wyższą zawartością fenoli. Potwierdzają to również niższe wartości natężenia fotosyntezy i transpiracji siewek z gleby kontrolnej. Stwierdzenie istotnie wyższego poziomu SF w igłach siewek o gorszej kondycji, w tym przypadku były to siewki kontrolne, świadczy o udziale tych związków w reakcjach związanych z oddziaływaniem czynników stresowych.

Stwierdzony spadek zawartości związków fenolowych w igłach wraz ze wzrostem zacienienia potwierdza dane o wpływie światła na poziom fenoli (Siegelman 1964; Kubačkova i in. 1994). Ten sam trend spadkowy został stwierdzony zarówno dla gleby kontrolnej jak skażonej. Zacienienie powodowało również nieznaczny spadek zawartości

fenoli w korzeniach. Podobne wyniki u kilku gatunków drzew iglastych uzyskali Entry i wsp. (1991).

Wyniki doświadczenia terenowego (4.3.1.2.2.) częściowo potwierdziły dane analiz laboratoryjnych. Istotnie mniej o-DF było w drzewach zacienionych. Brak różnic w poziomie SF sugeruje, że światło może wpływać na metabolizm tylko niektórych grup fenoli. Zaobserwowane zmiany poziomu o-DF w zależności od wysokości, na której pobierano igły, są trudne do zinterpretowania, stwierdzono bowiem, że im wyżej zbierane były igły tym miały mniej fenoli. Igły zbierane niżej były bardziej zacienione i powinny posiadać niższą ich zawartość. Pewnym wytłumaczeniem może być zaobserwowanie podobnej zależności w przypadku fotosyntezy i transpiracji. Igły z niższych części korony drzew zacienionych wykazywały wyższe wartości obu pomiarów. Wskazywać to może na większą, w tych igłach, intensywność procesów metabolicznych, w tym również przemian związków fenolowych.

W literaturze brak jest jak dotychczas danych dotyczących zróżnicowania dobowego w zawartości związków fenolowych. Przedstawione w doświadczeniu (4.3.1.3.) wyniki wskazują, że i ten czynnik powinien być uwzględniany w pracach bioindykacyjnych, z racji na istotne różnice w poziomie fenoli między dniem a nocą. Dane przedstawione w tym doświadczeniu, dotyczące wpływu oświetlenia, nie potwierdzają zaprezentowanych wyżej wyników. Zacienienie w tym przypadku powodowało wzrost poziomu fenoli. Mogło to być jednak spowodowane reakcją na przeniesienie siewek z umiarkowanego oświetlenia, w jakim były cały czas hodowane, do pełnego cienia.

Uzyskane w przedstawionych doświadczeniach wyniki wskazują na konieczność brania pod uwagę w pracach bioindykacyjnych, z wykorzystaniem związków fenolowych, również czynnika oświetlenia. Dotychczasowe dane na temat wpływu światła na metabolizm fenoli nie są wystarczające i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

5.4. Poziom związków fenolowych a stopień wrażliwości drzew na zanieczyszczenia przemysłowe

Na duże zróżnicowanie zawartości związków fenolowych między różnymi proveniencjami u kilku gatunków sosen, w tym sosny zwyczajnej, zwracał już uwagę Thielges (1972). Duże zróżnicowanie proveniencyjne w poziomie fenoli w igłach świerka sitkajskiego (*Picea sitchensis*) stwierdził również Forrest (1975). Poszczególne populacje mogą się także różnić pod względem jakościowym, czyli składem związków fenolowych. Duże zróżnicowanie jakościowe związków fenolowych w obrębie polskich populacji sosny zwyczajnej wykazali Krzakowa i wsp. (1994).

Wyniki przeprowadzonych badań (4.4.1.1.) również potwierdzają duże zróżnicowanie populacyjne w zawartości fenoli. Różnice między populacjami w ramach poszczególnych powierzchni sięgają 50%. Jest to więc pewne utrudnienie metodyczne w pracach bioindykacyjnych z wykorzystaniem fenoli. W opisanym powyżej doświadczeniu populacje sosny zwyczajnej obejmują dużą część jej europejskiego zasięgu i prawdopodobnie przez to, zróżnicowanie jest tak duże. W przeprowadzonej analizie grupowania, trzy spośród czterech polskich proveniencji lokują się blisko siebie. Tak więc w bioindykacji należałoby dążyć do porównań populacji niezbyt odległych geograficznie czy wręcz jednakowego pochodzenia.

Populacje sosny zwyczajnej różnią się również w stopniu wrażliwości na zanieczyszczenia (Oleksyn i wsp. 1988). Mając pewien obraz zróżnicowania proveniencyjnego we wrażliwości, porównano go z wynikami zawartości związków fenolowych. Uzyskany wynik korelacji ($p \leq 0,1$) między średnią zawartością fenoli na czterech powierzchniach a stopniem uszkodzenia igieł w wyniku zanieczyszczenia środowiska nie dowodzi jednoznacznie istnienia tej zależności, tym bardziej, że dane dla

poszczególnych powierzchni nie dają istotnych korelacji. Zawartość fenoli świadczy w pewnej mierze o kondycji roślin, o czym była już mowa w punkcie 5.3., i może ona również świadczyć o jakości populacji. Potwierdza to istotna korelacja między średnią zawartością fenoli dla czterech powierzchni a grubością i wysokością drzew. Duża zawartość fenoli u pojedynczej rośliny świadczy o jej gorszej kondycji, natomiast w przypadku populacji jest odwrotnie. Jest to prawdopodobnie związane z rolą jaką odgrywają związki fenolowe w obronie przed czynnikami biotycznymi. Wydzielona grupa populacji południowych (nr 18;19;20), do których włączona została też populacja belgijska (13), charakteryzuje się niską zawartością fenoli i jest przez to bardziej narażona na działanie czynników biotycznych (Ryc. 29). Potwierdza to doniesienie Oleksyna i Rachwała (1994) o występowaniu osutki (*Lophodermium sp.*) na powierzchni w Niepołomicach, gdzie najwyższy stopień porażenia notowano właśnie u populacji południowych.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu z kilkunastoma gatunkami sosen (4.4.1.2) potwierdziły dane o dużym zróżnicowaniu międzygatunkowym w zawartości fenoli (Macháčková 1994). Różnice w zawartości pomiędzy gatunkami sięgały ponad 100%. Jednak na otrzymane wyniki duży wpływ miał też przypuszczalnie zróżnicowany wiek drzew poszczególnych gatunków. Próba porównania wrażliwości na zanieczyszczenia kilkunastu gatunków sosen z zawartością fenoli, podobnie jak w przypadku różnych populacji, nie dała istotnego wyniku. Nie można więc jednoznacznie potwierdzić hipotezy, że zawartość fenoli determinuje wrażliwość na zanieczyszczenia.

5.5. Udział związków fenolowych w powstawaniu uszkodzeń igieł wywoływanych przez czynniki abiotyczne.

Rola związków fenolowych zarówno w reakcjach obronnych jak i powstawaniu wizualnych uszkodzeń wywołanych czynnikami biotycznymi jest stosunkowo dobrze udokumentowana (Nicholson i Hammerschmidt 1992). Reakcja ta polega często na tworzeniu barier dzielących część zdrową od zainfekowanej. Bariery te powstają w wyniku kondensacji związków fenolowych z wytworzeniem lignin i suberyny (Bennett i Wallsgrove 1994). Udział związków fenolowych w reakcjach obronnych, między innymi przez tworzenie podobnych barier, jest sugerowany również w przypadku wpływu czynników abiotycznych (Hasemann i in. 1990; Karolewski 1990). Igieł sosny zwyczajnej okazały się dobrym materiałem do analizy tego zagadnienia, charakteryzują się one, jak opisano w punkcie 4.5.1., uszkodzeniami mającymi postać nekrozy wierzchołkowej oddzielonej od części wizualnie zdrowej wąskim pasmem granicznym. Badania igieł przeprowadzone przez Karolewskiego (1990), w warunkach kontrolowanego wpływu SO₂, wykazały duże ilości związków fenolowych, proliny i hydroksyproliny w pasmie dzielącym nekrozę od części zdrowej. W tej części uszkodzonej igły, Jamrich (1972) również stwierdził podwyższony poziom niektórych pierwiastków (Si, Ca, Mg, Fe, N i F). Przeprowadzone badania zawartości fenoli w uszkodzonych igłach sosny zwyczajnej poddanej działaniu toksycznych gazów w warunkach terenowych (4.5.1.1.), nie potwierdziły w pełni doniesień Karolewskiego (1990) mówiących o dużej zawartości tych związków w pasmie granicznym. Badane fragmenty igieł między nekrozą z częścią zdrową charakteryzowały się znacznie niższą niż w badaniach Karolewskiego (1990) zawartością wody i większym stosunkiem poziomu fenoli do wody. Różnice w zawartości wody wynikają przypuszczalnie z tego iż Karolewski (1990) analizował igły w doświadczeniu

laboratoryjnym wkrótce po powstaniu nekrozy, natomiast w badaniach terenowych nekrozy powstały na igłach na długo przedtem zanim zostały one pobrane do analiz. Również różnice w zawartości fenoli mogą być tłumaczone wpływem czasu od powstania nekrozy. W paśmie granicznym stwierdzono mniej fenoli niż w części zdrowej, ale analizy histochemiczne tego pasma wykazały w nim znaczne koncentracje, powstałych w wyniku polimeryzacji fenoli - lignin i suberyny. Powstawanie dużych ilości tych związków w paśmie granicznym dowodzi roli fenoli w procesach obronnych. Pasma graniczne bowiem izoluje zdrowy fragment igły od wpływu toksycznych substancji zgromadzonych w nekrozie, a także chroni go przed utratą wody.

Wyniki przeprowadzonej analizy zawartości fenoli wzdłuż igły (4.5.1.2.) sugerują zróżnicowanie metabolizmu tych związków w jej fragmentach. Stwierdzony, istotny wzrost zawartości fenoli, od nasady do czubka igły, wiąże się również z wynikami opisywanymi powyżej. W igłach z terenu skażonego wzrost ten był bardziej „zdecydowany”. W przypadku skażeń występujących w badanym terenie (dwutlenek siarki i związki fluoru) uszkodzenia mają charakter nekroz wierzchołkowych, a akumulacja związków fenolowych w czubkach igieł jest związana najprawdopodobniej z ich powstawaniem. Potwierdzają to uzyskane dodatnie korelacje między poziomem fenoli a zawartością takich toksycznych pierwiastków jak: fluor czy glin oraz ujemne korelacje z takimi pierwiastkami jak: fosfor, potas, magnez czy cynk (Giertych i in. 1997).

Otrzymane wyniki zróżnicowania w zawartości fenoli w ramach pojedynczych igieł wywierają też wpływ na metodykę prac bioindykacyjnych. Zbierając igły do tego typu badań należałoby unikać przede wszystkim igieł z widocznymi uszkodzeniami, a w trakcie przygotowywania materiału do analizy homogenizować całe igły lub zawsze ten sam jej fragment.

6. WNIOSKI

Ze względu na wielowątkowość badań prezentowanych w tej pracy wnioski zostały podzielone na dwie grupy: 1 - aplikacyjne; 2 - poznawcze.

- 1a. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w tej pracy należy stwierdzić, że pomiary zawartości związków fenolowych, oznaczanych jako: suma fenoli, orto-dwufenole i meta-dwufenole, nie nadają się do wykorzystania jako biochemiczne wskaźniki stopnia skażenia środowiska. Zastosowanie ich wymagałoby spełnienia wielu, często niemożliwych do zrealizowania, istotnych warunków. Możliwe jest jednak stosowanie pomiarów poziomu fenoli do określenia zróżnicowania w reakcji roślin w doświadczeniach laboratoryjnych, z kontrolowanym wpływem określonego czynnika stresowego.
- 1b. Ocena stopnia wrażliwości drzew (populacji, gatunków) na skażenie środowiska, na podstawie naturalnego poziomu związków fenolowych jest niemożliwa, ze względu na brak istotnej korelacji między tymi czynnikami.
- 2a. Zanieczyszczenie środowiska powoduje zmiany zawartości związków fenolowych, jednak nie mają one charakteru liniowego, to znaczy zawartość fenoli nie jest proporcjonalna do natężenia i czasu działania czynnika stresowego.
- 2b. Istnieje duże podobieństwo zmian zawartości fenoli zachodzących pod wpływem różnych czynników stresowych - toksycznych gazów i jonów metali. W związku z tym fenole nie mogą być specyficznym wskaźnikiem skażeń.
- 2c. Charakter zmian zawartość fenoli zachodzących w igłach i korzeniach jest odmienny.

- 2d. Zmiany poziomu badanych grup wolnych fenoli (o-DF, m-DF, SF) są ze sobą istotnie skorelowane.
- 2e. Zawartość fenoli wzrasta wraz z wiekiem igieł, co jest to związane z procesami starzenia. Skażenie środowiska powoduje przyspieszenie tych procesów, zwłaszcza w drugim roczniku igieł.
- 2f. Nawożenie azotowe powoduje spadek zawartości fenoli, natomiast wpływ nawożenia wapniowego nie jest jednoznaczny.
- 2g. Oświetlenie w znaczący sposób wpływa na zawartość związków fenolowych. Jednak kierunek wywoływanych zmian poziomu tych związków nie jest stały. Dlatego też we wszelkich oznaczeniach zawartości fenoli należy zwrócić uwagę na czynnik oświetlenia i dążyć do ujednoczenia pobieranego materiału.
- 2h. Zaobserwowane różnice w zawartości fenoli w ciągu doby (między dniem a nocą) skłaniają do sugestii, iż najlepiej pobierać materiał zawsze o tej samej godzinie względem wschodu słońca.
- 2i. Istnieje bardzo duże zróżnicowanie w poziomie związków fenolowych w ramach rodzaju *Pinus*.
- 2j. Zawartość fenoli jest istotnie uzależniona od pochodzenia populacji.
- 2k. Związki fenolowe biorą udział w reakcjach obronnych roślin przed wpływem abiotycznych czynników stresowych. Ich rola polega między innymi na tworzeniu barier oddzielających części zdrowe od uszkodzonych. Biorą one również udział w procesach oddechowych, co związane jest z dostarczeniem energii niezbędnej dla procesów obronnych i regeneracyjnych.

7. LITERATURA

- Aerts R.J., Baumann T.W., 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *J. Exp. Bot.* 45: 497-503.
- Balsberg-Påhlsson A.M. 1992. Influence of nitrogen fertilisation on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Tree Physiol.* 10: 93-100.
- Bennett R.N., Wallsgrove R.M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- Bergvinson D.J., Arnason J.T., Pietrzak L.N. 1994. Localization and quantification of cell wall phenolics in European corn borer resistant and susceptible maize inbreds. *Can. J. Bot.* 72: 1243-1249.
- Beyer U., Tesche M., Heller W., Sandermann H. 1993. Fungistatische Wirksamkeit phenolischer Inhaltsstoffeder Fichte *Picea abies* (L.) Karst. und Einfluß von SO₂. *Forstw. Cbl.* 112: 251-256.
- Białobok S., Karolewski P. 1978. Ocena stopnia odporności drzew matecznych sosny zwyczajnej i ich potomstwa na działanie SO₂, O₃ oraz mieszaniny tych gazów. *Arbor. Kórnickie* 23: 299-310.
- Białobok S., Karolewski P., Rachwał L. 1978. Charakterystyka urządzeń służących do badania wpływu szkodliwych gazów na rośliny. *Arbor. Kórnickie* 23: 239-249.
- Booker F.L., Anttonen S., Heagle A.S. 1996. Catechin, proanthocyanidin and lignin contents of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles after chronic exposure to ozone. *New Phytol.* 132: 483-492.

- Borkowska B. 1988. Toksyczność glinu. *Wiadomości Botaniczne* 32 : 157-166.
- Borowiec S., Zabłocki Z. 1992. Porównanie akumulacji fluoru w roślinach wskaźnikowych na obszarze oddziaływania emisji Zakładów Chemicznych „Police” w latach 1983-1985 oraz 1989-1991. W: *Metabolizm Fluoru*. PTBiochem. Szczecin 1992 : 113-116.
- Burda S., Oleszek W., Lee C.Y. 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 38: 945-948.
- Bücker J., Guderian R., Mooi J. 1993. A novel method to evaluate the phytotoxic potential of low ozone concentration using poplar cuttings. *Water, Air, and Soil Pollut.* 66: 193-201.
- Carlson R.W., Bazzaz F.A., Rolfe G.L. 1975. The effect of heavy metals on plants. II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni and Ti. *Environ. Res.* 10: 113-120.
- Chaney W.R., Strickland R., 1984. Relative toxicity of heavy metals to red pine pollen germination and germ tube elongation. *J. Environ. Quality* 13: 391-394.
- Chen J., Sucoff E.T., Stadelmann E.J. 1991. Aluminium and temperature alteration of cell membrane permeability of *Quercus rubra*. *Plant Physiol.* 96: 644-649.
- Dawra R.K., Makkar H. P. S., Singh B. 1988. Total phenolics, condensed tannins, and protein-precipitable phenolics in young and mature leaves of oak species. *J. Agric. Food. Chem.* 36: 951-953.
- Dmuchowski, W., Bytnerowicz A. 1995. Monitoring environmental pollution in Poland by chemical analysis of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Environ. Pollut.* 87: 87-104.
- Dyguś K. 1996. Roślinność runa wskaźnikiem stanu siedliska borowego nawożonego ściekami przemysłu krochmalniczego. W: III Krajowe Sympozjum "Reakcje

- biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe", (red. R. Siwecki), Poznań-Kórnik 23-26 maja 1994, SORUS, Poznań : 125-133.
- Entry J.A., Cromack K. Jr., Hansen E., Waring R. 1991. Response of western coniferous seedlings to infection by *Armillaria ostoyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology* 81: 89-94.
- Erdei L., Szabo-Nagy A., Laszlavik M. 1994. Effects of tannin and phenolics on the H⁺ - ATPase activity in plant plasma membrane. *J. Plant Physiol.* 144: 49-52.
- Ernst W.H.O., Kuiters A.T., Nelissen H.J.M., Tolsma D.J. 1991. Seasonal variation in phenolics in several savanna tree species in Botswana. *Acta Bot. Neerl.* 40: 63-74.
- Estebauer H., Grill D., Beck G. 1975. Untersuchungen über Phenole in Nadeln von *Picea abies*. *Phyton (Austria)* 17: 87-99.
- Feder N., O'Brien T.P. 1968. Plant microtechnique; some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55: 123-142.
- Feeny P.P., Bostock H. 1968. Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. *Phytochem.* 7: 871-880.
- Feldman A.W., Hanks R.W., 1968. Phenolic content in the roots and leaves of tolerant and susceptible citrus cultivars attacked by *Radopholus similis*. *Phytochem.* 7: 5-12.
- Forrest G.I., 1975. Polyphenol variation in Sitka spruce. *Can. J. For. Res.* 5: 26-37.
- Gabara B., 1992. Reakcja roślin na metale ciężkie na poziomie organizmu i komórki. "Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczonego środowiska" - V Ogólnopolska Konf., Rogów 15-16 czerwiec 1992, : 37-47.
- Giertych M.J., De Temmerman L.O., Rachwał L. 1997. Distribution of chemical elements along the length of Scots pine needles in a heavily polluted and a control environment. *Tree Physiology* 17: 697-703.

- Giertych M.J., Karolewski P. 1993. Changes in phenolic compounds content in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L) seedlings following short term exposition to sulphur dioxide. *Arbor. Kórnickie* 38: 43-51
- Giertych M.J., Karolewski P., De Temmerman L.O. 1998. Foliage age and pollution alter content of phenolic compounds and chemical elements in *Pinus nigra* needles. *Water, Air, and Soil Pollut.* (w druku)
- Giertych M.J., Werner A. 1996. Phenolic compounds in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L) damaged by industrial pollution. *Arbor. Kórnickie* 41: 165-172
- Glazener J.A. 1982. Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after incubation with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 11-25.
- González A., Sanchez Tamws R., Rodriquez R. 1991. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. *Physiol. Plant.* 83: 611-620.
- Grill D., Esterbauer H., Beck G. 1975. Untersuchungen an phenolischen Substanzen und Glucose in SO₂ geschädigten Fichtennadeln. *Phytopath. Z.* 82: 182-184.
- Haissig B.E., Dickson R.E. 1979. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiol. Plant.* 47: 151-157.
- Hakulinen J., Julkunen-Tiitto R., Tahvanainen J. 1995. Dose nitrogen fertilization have an impact on the trade-off between willow growth and defensive secondary metabolism? *Trees* 9: 235-240.
- Hansen J., Møller I. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Ann. Biochem.* 68: 87-94.

- Hasemann G., Jung G., Wild A. 1990. The loss of structural integrity in damaged spruce needles from locations exposed to air pollution. II. Epidermis and stomata (dermal tissue). *J. Phytopathology* 128: 33-45.
- Heller W., Rosemann D., Osswald W.F., Benz B., Schönwitz R., Lohwasser K., Kloos M., Sandermann H. Jr. 1990. Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: Part I - Effects on polyphenol and monoterpene metabolism. *Environ. Pollut.* 64: 353-366.
- Hendry G.A.F., Thompson K., Moss C.J., Edwards E., Thorpe P.C. 1994. Seed persistence: a correlation between seed longevity in the soil and ortho-dihydroxyphenol concentration. *Functional Ecol.* 8: 658-664.
- Henriksen T.M., Eldhuset T.D., Stuanes A.O., Langerud B.R. 1992. Effects of aluminium and calcium on *Picea abies* seedlings. *Scand. J. For. Res.* 7: 63-70.
- Hoque E. 1982. Biochemical aspects of stress physiology of plants and some considerations of defense mechanisms in conifers. *Eur. J. For. Path.* 12: 280-296.
- Howell R.K. 1970. Influence of air pollution on quantities of caffeic acid isolated from leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytopath.* 60: 1626-1629.
- Howell R.K. 1974. Phenols, ozone, and their involvement in pigmentation and physiology of plant injury. ASC Symposium Series, Number 3, Air Pollution Effects on Plant Growth, :94-105.
- Howell R.K., Kremer D.F. 1973. The chemistry and physiology of pigmentation in leaves injured by air pollution. *J. Environ. Quality* 2: 434-438.
- Hurwitz B., Pell E.J., Sherwood R.T. 1979. Status of coumestrol and 4',7-dihydroxyflavone in alfalfa foliage exposed to ozone. *Phytopathol.* 69: 810-813.

- Iwanowska A., Tykarska T., Kuras M., Zobel A.M. 1994. Localization of phenolic compounds in the covering tissues of the embryo of *Brassica napus* (L.) during different stages of embryogenesis and seed maturation. *Ann. Bot.* 74: 313-320.
- Jamrich V. 1972. The localization, accumulation and binding of fluorine from industrial fumes in the tissues of the organs *Pinus sylvestris*. *Zbornik Vedeckych Prac VSLD vo Zvolene* 14: 89-99.
- Jensen W.A. 1962. *Botanical histochemistry. Principles and Practice.* W. H. Freeman & Co. San Francisco and London.
- Johansson O.A. 1940. *Plant Microtechnique.* Mc Grow-Hill, New York.
- Johnson G., Schaal L.A., 1957. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acids in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease and resistance. *Amer. Potato J.* 34: 200-202.
- Jordan D.N., Green T.H., Chappelka A.H., Lockaby B.G., Meldahl R.S., Gjerstad. D.H. 1991. Response of total tannins and phenolics in loblolly pine foliage exposed to ozone and acid rain. *J. Chem. Ecol.* 17: 505-513.
- Julkunen-Tiitto R. 1989. Temporal and plant-part- specific variation of phytochemicals in willows (*Salix* spp). W: *Distribution of certain phenolics in Salix species. (Salicaceae).* University of Joensuu, Publications in Sceinces. 15: 1-29.
- Julkunen-Tiitto R. Tahvanainen J. 1989. The effect of the sample preparation method of extractable phenolics of Salicaceae species. *Planta Medica.* 55: 55-58.
- Julkunen-Tiitto R., Lavola A., Kainulainen P. 1995. Does SO₂ fumigation change the chemical defense of woody plants: The effect of short-term SO₂ fumigation on the metabolism of deciduous *Salix myrsinifolia* plants. *Water, Air, and Soil Pollut.* 83: 195-203.
- Kwasniewski P., Gierczyk M.J. 1994. Influence of ionic metal ions on phenols in needles and roots, and on root respiration of Scots pine seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63: 29-35.

- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1993. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN. Warszawa 1993.
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J. 1995a. Effects of gaseous air pollutants on secondary chemistry of Scots pine and Norway spruce seedlings. *Water, Air, and Soil Pollut.* 85: 1393-1398.
- Kainulainen P., Holopainen J. K., Oksanen J. 1995b. Effects of SO₂ on the concentrations of carbohydrates and secondary compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L) Karst) seedlings. *New Phytol.* 130: 231-238.
- Kamp-Nielsen L. 1971. The effect of deleterious concentration of mercury of the photosynthesis and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.* 24: 556-561.
- Kar M., Mishra D. 1976. Catalase, preoxidase, and polyfenoloxidase activity during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57: 315-319.
- Karolewski P. 1983. Effect of sulphur dioxide on peroxidase activity of *Weigela* rooted cuttings. *Arbor. Kórnickie* 28: 113-127.
- Karolewski P. 1989. Rola proliny, poliamin i fenoli u roślin wyższych w warunkach stresowych. Praca habilitacyjna. Instytut Dendrologii PAN, Kórnik.
- Karolewski P. 1990. Visiually and invisually injury to Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles caused by sulphur dioxide. *Arbor. Kórnickie* 35: 127-136.
- Karolewski P. 1992. Ocena wrażliwości jedenastu gatunków z rodzaju *Pinus* na działanie SO₂, HF, NO₂ i O₃ w kontrolowanych warunkach. *Arbor. Kórnickie* 37: 75-81.
- Karolewski P., Daszkiewicz P. 1988. Wpływ dwutlenku siarki na poziom fenoli w liściach topoli o różnicowanej wrażliwości na działanie tego gazu. *Arbor. Kórnickie* 33: 231-238.
- Karolewski P., Giertych M.J. 1994. Influence of toxic metal ions on phenols in needles and roots, and on root respiration of Scots pine seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63: 29-35.

- Karolewski P., Giertych M.J. 1995a. Changes in the level of phenols during needle development in Scots pine populations in a control and polluted environment. *Eur. J. For. Path.* 25: 297-306.
- Karolewski P., Giertych M.J. 1995b Wpływ nawożenia wapniowego na poziom fenoli u sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w warunkach skażenia związkami glinu, siarki i fluoru. *Arbor. Kórnickie* 40: 169-184.
- Keller Th. 1976. Histologische und physiologische Untersuchungen an Forstpflanzen in einem Fluorschadensgebiet. *Berichte, Eidgenossische Anstalt für das Forstliche Versuchswesen* 154, 82 pp.
- Kettrup A. A. F., Kicinski H. G., Masuch G. 1991. Investigating the effect of hydrogen peroxide on Norway spruce trees. *Anal. Chem.* 63: 1047- 1056.
- Klepzig K. D., Kruger E. L., Smalley E. B., Raffa K. F. 1995. Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. *J. Chem. Ecol.* 21: 601-626.
- Koukol J., Dugger W.M. Jr. 1967. Anthocyanin formation as a response to ozone and smog treatment in *Rumex crispus* L. *Plant Physiol.* 42: 1023-1024.
- Kozioł M.J., Jordan C.F. 1978. Changes in carbohydrate levels in red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) exposed to sulphur dioxide. *J. Exp. Bot.*, 29: 1037-1043.
- Krzakowa M., Urbaniak L., Korczyk A.F. 1994. Chromatographic studies on phenolic compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Bull. Soc. Amis. Sci. Lett. Poznań ser. D. biol.* 30: 11-21.
- Kubačková M., Bilisics L., Auxtova O., Slimakova B., Liskova D., Kakoniova D. 1994. Effect of light conditions on the content of phenolics and PAL activity in poplar callus. *Biologia.* 49: 923-926.

- Langebartels C., Heller W., Kerner K., Leonardi S., Rosemann D., Schraudner M., Trest M., Sandermann H.Jr. 1990. Ozone-induced defence reactions in plants. W: Environmental Research with Plants in Closed Chambers (H.D. Payer, T. Pfirmann, P. Mathy, eds). Air Pollution Research Reports of the EC26, 358-368.
- Lavola A., Julkunen-Titto R. 1994. The effect of elevated carbon dioxide and fertilisation on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia*. 99: 315-321.
- Lavola A., Julkunen-Tiitto R., Paakkonen E. 1994. Does ozone stress change the primary or secondary metabolites of birch (*Betula pendula* Roth)? *New Phytol.* 126: 637-642.
- Łoborzewski J. 1981. Peroksydazy roślinne. *Wiadomości Botaniczne*. 25: 29-44.
- Macháčková L. 1994. Review of phenolic substances accumulated in needles of some woody plants. W: *Ecological Stability, Diversity and Productivity of Forest Ecosystems*. IFE SAS in Zvolen., 167-173.
- Magnuski K., Sienkiewicz A., Gałązka S., Jaszczak R., Nowiński M. 1996. Zawartość siarki w igłach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) rosnącej w warunkach skażeń miejsko-przemysłowych środowiska leśnego. W: III Krajowe Sympozjum "Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe", (red. R. Siwecki), Poznań-Kórnik 23-26 maja 1994, SORUS, Poznań: 111-117.
- Malzahn E. 1996. Bioindykacja środowiska leśnego Puszczy Białowieskiej. W: III Krajowe Sympozjum "Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe", (red. R. Siwecki), Poznań-Kórnik 23-26 maja 1994, SORUS, Poznań: 75-86.
- Masuch G., Franz J.T., Kiciski H.G., Kettrup A. 1992. Histological and biochemical differences of slightly and severely injured spruce needles of two stands in Northrhine Westphalia. *Environ. and Exp. Bot.* 32: 163-182.

- Mikkelsen T.N., Dodell B., Lutz C. 1995. Changes in pigment concentration and composition in Norway spruce induced by long-term exposure to low levels of ozone. *Environ. Pollut.* 87: 197-205.
- Muzika R.M., Pregitzer K.S. 1992. Effect of nitrogen fertilisation on leaf phenolic production of grand fir seedlings. *Trees* 6: 241-244.
- Nerg A., Kainulainen P., Vuorinen M., Hanso M., Holopainen J. K., Kurkela T. 1994. Seasonal and geographical variation of terpenes, resin acids and total phenolics in nursery grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L). *New Phytol.* 128: 703- 713.
- Nicholson R.L., Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Niemann G.J., 1976. Phenolics from *Larix* needles. XII. Seasonal variation of main flavonoids in leaves of *L. leptolepis*. *Acta Bot. Neerl.*, 25: 349-359.
- Northup R. R., Dahlgren R. A., Yu Z. 1995. Intraspecific variation of conifer phenolic concentration on a marine terrace soil acidity gradient; a new interpretation. *Plant and Soil* 171: 255-262.
- Oleksyn J. 1988a. Height growth of different European Scots pine *Pinus sylvestris* L. provenances in a heavily polluted and a control environment. *Environ. Pollution* 55: 289-299.
- Oleksyn J. 1988b. Report on the IUFRO-1982 provenance experiment on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Arbor. Kórnickie* 33: 211-229.
- Oleksyn J. 1989. Provenance differentiation as a factor in susceptibility of Scots pine to air pollution. In: *Air Pollution and Forest Decline*. J.B. Bucher and I. Bucher-Wallin (Eds.). Proc. 14th Int. Meeting for Specialists in Air Pollution Effects on Forest Ecosystem. IUFRO P.2.05, Interlaken, Switzerland, Oct. 2-8, 1988. Birmensdorf, 1989, p. 329-335.

- Oleksyn J., Białobok S. 1986. Net photosynthesis, dark respiration and susceptibility to air pollution of 20 European provenances of Scots pine *Pinus sylvestris* L. Environ. Pollut. Ser. A 40:287-302.
- Oleksyn J., Karolewski P., Giertych M.J., Werner A., Tjoelker M.G., Reich P.B. 1996. Altered root growth and plant chemistry of *Pinus sylvestris* seedlings subjected to aluminium in nutrient solution. Trees 10: 135-144.
- Oleksyn J., Karolewski P., Rachwał L. 1988. Susceptibility of European *Pinus sylvestris* L. populations to the action of SO₂, NO₂, SO₂+NO₂ and HF in laboratory and field conditions. Acta Soc. Bot. Pol., 57(1): 107-115.
- Oleksyn J., Rachwał L. 1994. Wzrost europejskich populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w doświadczeniu proweniencyjnym SP-IUFRO-1982 w Puszczy Niepołomickiej. Sylwan. 138: 57-69.
- Oleksyn J., Tjoelker M.G., Lorenc-Plucińska G., Konwińska A., Żytkowiak R., Karolewski P., Reich P.B. 1997. Needle CO₂ exchange, structure and defense traits in relation to needle age in *Pinus heldreichii* Christ - a relict of Tertiary flora. Trees 12: 82-89.
- Oleksyn J., Tjoelker M.G., Reich P.B. 1992. Whole-plant CO₂ exchange of seedlings of two *Pinus sylvestris* L. provenances grown under simulated photoperiodic conditions of 50° and 60°N. Trees 6: 225-231
- Pukacki P., Pukacka S. 1987. Freezing stress and membrane injury of Norway spruce (*Picea abies*) tissue. Physiol. plant. 69: 156-160.
- Rachwald H. 1996. Mchy jako bioindykatory środowiska leśnego Puszczy Białowieskiej. W: III Krajowe Sympozjum "Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe", (red. R. Siwecki), Poznań-Kórnik 23-26 maja 1994, SORUS, Poznań: 87-92.

- Rachwał L. 1996. Kolekcje drzew i krzewów o podwyższonej tolerancji na zanieczyszczenia przemysłowe. W: III Krajowe Sympozjum "Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe", (red. R. Siwecki), Poznań-Kórnik 23-26 maja 1994, SORUS, Poznań: 219-233.
- Rachwał L., Białobok S., Siwecki R. 1990. Field selection and conservation of Scots pine individuals less sensitive to air pollution. *Bulletins of the Finnish Forest Research Institute* 360: 209-215.
- Reich P.B.; Oleksyn J., Tjoelker M.G., 1994. Relationship of aluminum and calcium to net CO₂ exchange among diverse Scots pine provenances under pollution stress in Poland. *Oecologia* 97: 82-92.
- Rengel Z. 1992. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121: 499-513.
- Rengel Z., Graham R. D., Pedler J. F. 1994. Time-course of biosynthesis of phenolics and lignin in roots of wheat genotypes differing in manganese efficiency and resistance to take-all fungus. *Ann. Bot.* 74: 471-477.
- Richter C.M., Wild A. 1992. Phenolic compounds in needles of Norway spruce trees in relation to Novel Forest Decline. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 188: 305-320.
- Richter C.M., Wild A. 1994. Phenolic compounds in needles of Norway spruce trees in relation to Novel Forest Decline II. Studies on trees from twosites in Middle Western Germany. *Z. Naturforsch.* 49c: 619-627.
- Roost P., Sigg A. 1978. Erfahrungen mit einer potentiometrischen Fluor Bestimmungsmethode für biologische Materialien. *Staub-Reinhalt Luft* 38:363-366
- Rosemann D., Heller D., Sandermann H. Jr. 1991. Biochemical plant response to ozone. II Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 97: 1280-1286.

- Rubin B., Arcichowska J. 1971. Udział fenoli i ich pochodnych w reakcjach obronnych. W: Biochemia i fizjologia odporności roślin. PWRiL, Warszawa: 200-220.
- Siegelman H.W. 1964. Physiological studies on phenolic biosynthesis. W: W: Biochemistry of phenolic compounds. (Red. J.B. Harborne). Academic Press. London and New York. pp 437-456.
- Simons T. J., Ross A.F. 1971. Changes in phenol metabolism associated with induced systemic resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco. *Phytopath.* 61: 1261-1265.
- Singleton V.I. Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Viti.* 16: 144-158.
- Skrzypczak L., Thiem B. 1987. Metabolity stresowe roślin wyższych. *Wiadomości Botaniczne*, 31: 157-166.
- Sprawozdanie z grantu KBN. 1996. Rola czynników zewnętrznych i wewnętrznych w bioindykacji skażenia środowiska przy pomocy związków fenolowych. Numer tematu 6 PO4G 065 08.
- Sprawozdanie z grantu KBN. 1997. Mechanizmy reakcji i dziedziczenie stopnia tolerancji u sosny zwyczajnej w warunkach skażonego środowiska (SO₂, HF, Al³⁺). Numer tematu 6 P205 079 06.
- Stachurski A., Zimka J.R., Kwiecień M. 1994. Forest decline in Karkonosze (Poland). I. Chlorophyll, phenols, defoliation index and nutrient status of the Norway spruce (*Picea abies* L). *Ekol. pol.* 42: 289-316.
- Strack D., Heilemann J., Wray V., Dirks H. 1989. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochem.* 28: 2071-2078.

- Swain T., Hillis W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. - The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63-68.
- Theisen A. F., Rock B. N., Eckert R. T. 1994. Detection of changes in steady-state chlorophyll fluorescence in *Pinus strobus* following short-term ozone exposure. J. Plant Physiol. 144: 410- 419.
- Thielges B.A. 1972. Intraspecific variation in foliage polyphenols of *Pinus* (Subsection *sylvestris*). Silvea Genetica 21: 114-119.
- Thomson R.H. 1964. Structure and reactivity of phenolic compounds. W: Biochemistry of phenolic compounds. (Red. J.B. Harborne). Academic Press. London and New York. pp 1-32.
- Tingey D.T., Fites R.C., Wickliff C. 1976. Differential foliar sensitivity of soybean cultivars to ozone associated with differential enzyme activity. Physiol. Plant. 37: 69-72.
- Tjoelker M. G., Volin J. C., Oleksyn J., Reich P. B. 1995. Interaction of ozone pollution and light effects on photosynthesis in a forest canopy experiment. Plant, Cell and Environ. 18: 895-905.
- Tomaszewski M. 1961. Układ fenol-fenolaza i jego związek z procesami oddychania, lignifikacji oraz inaktywacji auksyny w pędach moreli i brzoskwini. Arbor. Kórnickie 6: 169-225.
- Tukiendorf A. 1992. Akumulacja Cd-fitochelatyn w liściach i korzeniach szpinkau w odpowiedzi na obecność jonów Cd^{+2} w pożywce. "Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczonego środowiska" - V Ogólnopolska Konf., Rogów 15-16th June 1992, pp. 186-187.
- Weiss M., Heller W., Mikolajewski S., Peipp H., Steiner K., Wray V., Sandermann H., Strack D. 1995. Secondary metabolites in mycorrhizal and non- mycorrhizal roots of conifers. Proc. of BIOFOSP, Ljubljana, August, 22-31. 125-130.

- Wierzbicka M., 1992. Adaptacja korzeni roślin do środowiska zawierającego ołów - badania cyklu komórkowego. "Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczonego środowiska" - V Ogólnopolska Konf., Rogów 15-16th June 1992, pp. 197-198.
- Wild A., Schmitt V. 1995. Diagnosis of damage to Norway spruce (*Picea abies*) through biochemical criteria. *Physiol. Plant.* 93: 375-382.
- Yanosaka K., Iwamura H., Shinozaki M., Yoshida K. 1991. Correlation between biosynthesis of chlorogenic acid and flowering in *Asparagus* seedlings induced by carbamate compounds. *Plant Cell Physiol.* 32: 447-451.
- Yee-Meiler D. 1974. Über den Einfluss fluorhaltiger Fabrikabgase auf den Phenolgehalt von Fichtennadeln. *Eur. J. For. Path.* 4: 214-221.
- Yee-Meiler D. 1977. Phenole als Indikatoren metabolischer Störungen bei fluorexponierten Waldbäumen. *Mitt. Eidg. Anst. Forstl. Versuchswes., Ber.* 53: 203-229.
- Yee-Meiler D. 1978. Der Einfluß von kontinuierlichen, niedrigen SO₂-Begasungen auf den Phenolgehalt und die Phenoloxidase-Aktivität in Blättern einiger Waldbaumarten. *Eur. J. For. Path.* 8: 14-20.
- Zieslin N., Abolitz M. 1994. Leakage of phenolic compounds from plant root - effects of pH, Ca²⁺ and NaCl. *Scientia Hort.* 58: 303-314.
- Zobel A., Nighswander J.E. 1991. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles after spraying with sulphuric acid: a possible bioindicator of air pollution. *New Phytol.* 117: 565-574.



21986

Biblioteka Instytutu
Dendrologii - Kórnik

VIII

108