

PIOTR KAROLEWSKI, MARIAN J. GIERTYCH

## Wpływ nawożenia wapniowego na poziom fenoli u sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w warunkach skażenia związkami glinu, siarki i fluoru

### Abstract

Karolewski P., Giertych M.J. 1995. Influence of lime fertilization on the level of phenols in Scots pine in the conditions of pollution by aluminium, sulphur and fluoric compounds. *Arbor. Kórnickie* 40: 169-184.

Studies on the influence of aluminum on phenolics in Scots pine needles were performed in a greenhouse and in an environment polluted by Al, S, and F. It was proved that these pollutants caused the increase of the content of phenolic compounds in young seedlings and in 12-year-old trees of Scots pine. Addition to the soil of Ca or Ca+Mg (dolomite) caused an increase of phenolics level, too. The injuries caused by the polluted environment were, to some degree, reduced one and two years after a single fertilization with dolomite ( $0.23 \text{ kg m}^{-2}$ ).

In the field and in laboratory studies, the level of orthodiphenols (o-dF) and total phenols (SF) were positively correlated. The changes in content of o-dF and SF caused by the influence of Al and Ca were similar, both in needles and in roots of seedlings.

*Additional key word:* *Pinus sylvestris*, provenances, phenolics, environmental pollution, aluminium.

*Address:* P. Karolewski, M.J. Giertych, Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik, Poland.

Accepted for publication, February 1995.

### WSTĘP

Związki fenolowe odgrywają różnorodną i znaczącą rolę we wzroście i rozwoju roślin (DeKock i Vaughan, 1975; Niemann, 1976; Niemann i Van Genderen, 1980; Gliński i in., 1986). Proste fenole, akumulujące się podczas rozwoju roślin, wykorzystywane są do wytworzenia polimerów fenolowych – składników lignin, odkładających się w ścianach komórkowych (Tomaszewski, 1961; González i in., 1991; Aerts i Baumann, 1994). Intensywny przebieg

tego procesu w tkankach ma istotne znaczenie dla odporności roślin na działanie czynników biotycznych: patogenów grzybowych oraz chorób wirusowych i bakteryjnych (Johnson i Schall, 1957a,b; Feldman i Hanks, 1968; Zimmermann, 1974; Vance i Sherwood, 1976; White, 1979; Glazener, 1982; Czech-Kozłowska i Krzywański, 1984), a także abiotycznych: uszkodzeń mechanicznych tkanek (Johnson i Schall, 1957a,b; Mireku i Wilkes, 1988) i spowodowanych przez toksyczne substancje (Skrzypczak i Thiem, 1987; Szkutnicka, 1979). Ponadto Hoque (1982) przytacza wyniki szeregu prac, które wskazują na podwyższenie stopnia tolerancji na działanie czynników abiotycznych po traktowaniu roślin związkami fenolowymi.

W porównaniu do stosunkowo dobrze poznanej roli związków fenolowych w reakcji roślin na czynniki biotyczne, wiedza o możliwości ich wykorzystania do oceny stopnia skażenia środowiska jest, jak dotychczas, słabo potwierdzona eksperymentalnie. Wyniki nielicznych badań terenowych wskazują, że wzrost poziomu fenoli następuje w środowisku skażonym przez  $\text{SO}_2$  i związki fluoru (Yee-Meiler, 1974, 1977; Keller, 1976; Karolewski i Giertych, 1992). Również wyniki badań przeprowadzonych w warunkach kontrolowanych świadczą o podobnych skutkach wpływu  $\text{SO}_2$  lub  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Karolewski i Daszkiewicz, 1988; Karolewski, 1990; Zobel i Nighswander, 1991; Giertych i Karolewski, 1993) i toksycznych metali (Karolewski i Giertych, 1994). Istnieją także prace, w których autorzy wskazują na brak wpływu toksycznych gazów na zmiany poziomu fenoli (Jordan i in., 1991).

Jednym ze skutków emisji do atmosfery toksycznych gazów jest zakwaszenie gleby, a przez to zwiększenie dostępności dla roślin glinu (Neitzke i Runge, 1985; McLaughlin i in., 1991). Szkodliwe jego działanie jest powszechnie znane i opisane w wielu pracach przeglądowych (Foy i in., 1978; Borkowska, 1988; Ślaski, 1992). Jednym z ważnych elementów tego zjawiska jest konkurencyjność glinu do jonów Ca i Mg. Glin powoduje zarówno ograniczenie pobierania tych pierwiastków przez rośliny z gleby (Farid, 1991; Göransson i Eldhuset, 1991; McLaughlin i in., 1991), jak i blokowanie ich transportu oraz wykorzystywania w procesach metabolicznych (Farid, 1991). Następuje wówczas niekorzystna zmiana stosunku Ca/Al na korzyść glinu i zmniejszenie zawartości magnezu (Neitzke i Runge, 1985; Rengel i Robinson, 1989; Rengel, 1990; Arovaara i Ilvesniemi, 1990). Konsekwencją tego jest zahamowanie wzrostu i rozwoju roślin (Neitzke i Runge, 1985; Geburek i Scholz, 1992), zaburzenia w gospodarce wodnej i mineralnej (Foy i in., 1978; Chen i in., 1991; Greger i in., 1992a, b) oraz przebiegu tak podstawowych procesów fizjologicznych, jak fotosynteza (Reich i in., 1994) i oddychanie (Dedonder i VanSumere, 1971; Czuba, 1985; Pfeffer i in., 1986; de Lima i Copeland, 1994).

Złagodzenie skutków szkodliwego wpływu glinu można uzyskać wprowadzając do środowiska dodatkowe ilości wapnia i magnezu (Henriksen i in.,

1992; Rademacher i Kriebitzsch, 1992). Wapnowanie gleby jest także jednym z podstawowych, agrotechnicznych zabiegów stosowanych w okręgach przemysłowych, gdzie występuje skażenie środowiska toksycznymi gazami i metalami (Rachwał, 1983; Komisarek i in., 1990). Brak jest jednak informacji dotyczących zmian poziomu fenoli w roślinach, następujących pod wpływem nawożenia Ca i Mg, zarówno w terenach nieskażonych, jak i skażonych.

Uwzględniając powyższe uwagi przeprowadzono badania zmierzające do lepszego poznania udziału związków fenolowych w reakcji na skażenie środowiska przez Al oraz SO<sub>2</sub> i związki fluoru, przy jednocześnie podwyższonym poziomie Ca lub Ca + Mg.

Wykorzystano w tym celu kilka populacji sosny zwyczajnej, różnych pochodzeń, wybranych wzdłuż północno-południowego transektu europejskiej części zasięgu tego gatunku. Informacje dotyczące międzypopulacyjnego zróżnicowania w poziomie fenoli, nie tylko sosny zwyczajnej, ale i innych gatunków drzew iglastych, są bardzo nieliczne (Forrest, 1975; Niemann, 1980). Natomiast zróżnicowanie międzypopulacyjne w tolerancji na różnego typu zanieczyszczenia środowiska u gatunków drzew iglastych, w tym sosny zwyczajnej, jest bardzo duże, co ma istotne znaczenie w badaniach dotyczących zmian poziomu różnych metabolitów (Schütt i in., 1970; Huttunen, 1978; Oleksyn, 1988a, 1991; Geburek i Scholz, 1992; Reich i in., 1994).

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych i terenowych. Doświadczenie w kontrolowanych warunkach przeprowadzono w szklarni, na 2-letnich siewkach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), uzyskanych z nasion z wolnego zapylenia szczepu klonu oznaczonego w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku numerem K-11-03. W systemie korzeniowym badanych siewek stwierdzono obecność grzybów mikoryzowych. Siewki rosnące w doniczkach o pojemności 0.5 dcm<sup>3</sup> (ziemia leśna zmieszana z torfem w stosunku 3:1) traktowano w sierpniu azotanem glinu. Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> dodawano w ilości 1, 2 lub 4 mM w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej do pojedynczej doniczki, raz w tygodniu przez okres 4 tygodni. Na następny dzień, po traktowaniu Al dodawano węglanu wapnia, także w 100 cm<sup>3</sup> wody. CaCO<sub>3</sub> 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 (powtórzenia). Po 5 tygodniach od rozpoczęcia doświadczenia (1 tydzień po ostatnim traktowaniu Al i Ca) oznaczono zawartość fenoli w igłach i korzeniach siewek.

Badania terenowe przeprowadzono na dwóch powierzchniach doświadczal-

nych – pierwszej oddalonej 2 km od Poznańskich Zakładów Nawozów Fosforowych (PZNF) w Luboniu k. Poznania (52°15'20"N i 16°50'31"E) i drugiej w Leśnictwie Doświadczalnym Zwierzyniec k. Kórnik (52°14'36"N i 17°05'00"E), w odległości około 15 km od tego zakładu i uznanej za wolną od zanieczyszczeń (kontrola). Ostatnia z wymienionych stanowi element międzynarodowego doświadczenia założonego pod auspicjami International Union of Forest Research Organizations (IUFRO), Working Party "Scots pine provenances and breeding" (Oleksyn, 1988b). Na tych powierzchniach w 1984 posadzono 2-letnie siewki.

W ostatnich latach nastąpiło znaczne ograniczenie ilości emitowanych przez PZNF do atmosfery toksycznych zanieczyszczeń ze względu na likwidację oddziały produkcji kwasu siarkowego metodą nitrozową (w 1982 roku) i wstrzymanie w 1990 roku produkcji tego kwasu oraz superfosfatu granulowanego (informacja ustna kierownika działu technicznego PZNF – mgr inż. R. Grycza, tabela 1). Jednakże, Reich i wsp. (1994) stwierdzili, że gleba ze skażonej

Tabela 1

Średnie wartości emisji z Poznańskich Zakładów Nawozów Fosforowych w Luboniu: dwutlenku siarki (SO<sub>2</sub>), związków fluoru (F) i tlenków azotu – NO<sub>x</sub> (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) w t r.<sup>-1</sup>, (R. Grycza – informacja ustna).

Table 1

Average emission rates from the Poznań Phosphate Fertilizer Factory in Luboń: SO<sub>2</sub>, fluorine compounds (F) and NO<sub>x</sub> (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in t yr<sup>-1</sup>, (R. Grycza – personal communication).

Rok Year	Emisja/Emission		
	SO <sub>2</sub>	F	NO <sub>x</sub>
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	0
1987	654	24.3	0
1988	468	19.5	0
1989	445	18.4	0
1990	220	6.3	0
1991	127	2.3	0
1992	156	1.1	0
1993	116	0.9	0

powierzchni posiada niższe pH niż z powierzchni kontrolnej. To zakwaszenie spowodowało, że charakteryzuje się ona wyższą zawartością dostępnego Al (10-krotnie) i P, a mniejszą K, Ca, Mg oraz mniejszą pojemnością wymienną

kationów (Reich i in., 1994). Autorzy ci wykazali również większą zawartość Mn, Al, Fe, Zn i S w igłach sosny zwyczajnej rosnącej na skażonej powierzchni. Ograniczenie emisji zanieczyszczeń spowodowało, że w 1993 roku brak było widocznych uszkodzeń igieł bieżącego rocznika, nawet w końcu sezonu wegetacyjnego, a niewielkie w przypadku igieł dwulettnich. W 1994 roku, prawdopodobnie na skutek interakcji pomiędzy skażeniem i panującą wówczas suszą, wystąpiły większe uszkodzenia, możliwe do określenia także u igieł bieżącego rocznika. Z tego powodu ocenę uszkodzeń w 1993 roku przeprowadzono na igłach dwulettnich, a w 1994 na igłach bieżącego rocznika. Uszkodzenia szacowano dwoma sposobami, określając powierzchnię uszkodzonych igieł, a także liczbę igieł z uszkodzeniami, w obydwu przypadkach w procentach całkowitej powierzchni lub liczby igieł danego drzewa. W doświadczeniu wykorzystano drzewa 4 proveniencji sosny zwyczajnej: nr 5 (Miłomłyn, Polska), nr 15 (Sumpberget, Szwecja), nr 16 (Zahorie, Słowacja) i nr 18 (Maočnica, Jugosławia), (tabela 2).

Tabela 2

Geograficzne dane o pochodzeniu populacji *Pinus sylvestris* L. użytych w badaniach (za Oleksyn, 1988b).

Table 2

Geographic data at place of origin for the *Pinus sylvestris* L. populations used in this study (after Oleksyn, 1988b).

Proweniencja nr <sup>1</sup> i pochodzenie Number <sup>1</sup> and provenance	Kraj State	Szerokość (Pn) Latitude (N)	Długość (W) Longitude (E)	Wysokość n.p.m. Altitude (m)
5 Miłomłyn	Polska	53°34'	20°00'	110
15 Sumpberget	Szwecja	60°11'	15°52'	185
16 Zahorie	Słowacja	48°46'	17°03'	160
18 Maočnica	Jugosławia	43°10'	19°30'	1200

<sup>1</sup> Nr proveniencji wg International Union of Forest Research Organizations (IUFRO 1982).

<sup>1</sup> International Union of Forest Research Organizations (IUFRO 1982) provenance number.

Nawożenie dolomitom (30% CaO + 20% MgO) przeprowadzono w połowie maja 1992 roku, stosując dla pojedynczego drzewa jednorazową dawkę 0.23 kg dolomitu m<sup>-2</sup> (500 kg Ca ha<sup>-1</sup>). Ocenę widocznych uszkodzeń igieł oraz analizy zawartości fenoli przeprowadzono 8 września 1993 (igły dwuletnie) i 12 września 1994 roku (igły bieżącego rocznika). Każdy wariant doświadczenia był reprezentowany przez 4 drzewa (powtórzenia).

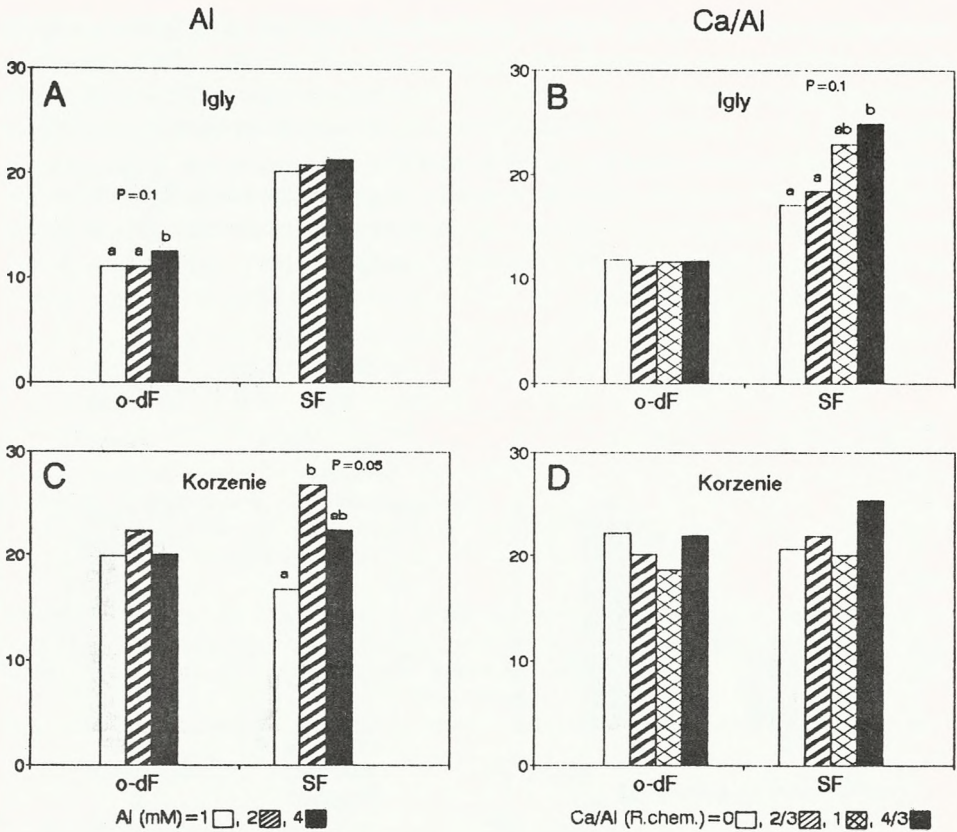
Zawartość związków fenolowych, określano w 1-gramowych próbkach, po dwukrotnej ekstrakcji przez 15 i 10 minut we wrzącym etanolu, w stężeniach odpowiednio 95 i 80%. Analizy przeprowadzono metodami spektrofotometrycznymi, z rozróżnieniem na orto-dwufenole (o-dF) i ogólną ich sumę (SF).

Do oznaczania o-dF zastosowano metodę opisaną przez Johnsona i Schaala (1957a) z użyciem odczynnika Arnowa. SF oznaczano także metodą Johnsona i Schaala (1957a), zmodyfikowaną przez Singletona i Rossiego (1965) z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu. Zawartość obu grup fenoli wyrażono w  $\mu\text{M}$  kwasu chlorogenowego  $\text{g}^{-1}$  świeżej masy (ś.m.).

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Po zakończeniu doświadczenia z kontrolowanym wpływem Al i Ca obserwacja siewek nie wykazywała widocznych objawów uszkodzeń igieł w postaci nekroz, w żadnym z jego wariantów. Göransson i Eldhaset (1991) badając wpływ Al w postaci mieszaniny roztworów azotanu i chlorku stwierdzili, że zahamowanie wzrostu korzeni i młodych, niezainfekowanych siewek sosny zwyczajnej następowało dopiero w stężeniu 6 mM, a u siewek zainfekowanych grzybami ektomikoryzowymi w stężeniu 10 mM. W ich doświadczeniach alokacja biomasy do korzeni była prawidłowa do 15 mM dla sosny bez i z grzybami ektomikoryzowymi. Autorzy twierdzą, że ich wyniki zaprzeczają hipotezie o toksyczności dla gatunków drzew leśnych glinu w niskich stężeniach w glebie. Jednakże autorzy stwierdzili, że pobieranie Ca i Mg było zredukowane wraz ze wzrostem stężenia Al już od 1 mM u niezainfekowanej i od 3 mM w przypadku sosny zainfekowanej grzybami ektomikoryzowymi. W odniesieniu natomiast do *Prunus cerasus*, Borkowska i Sas (1992) stwierdziły, że Al w niskim stężeniu ( $0.4 \text{ mM dcm}^{-3}$ ) jest nawet czynnikiem stymulującym wzrost.

Analiza wyników wpływu różnych dawek Al na poziom fenoli (ryc. 1) wykazywała istotny wpływ glinu na wzrost zawartości o-dF w igłach ( $F=2.49$ ,  $P<0.1$ ) i SF w korzeniach siewek ( $F=5.87$ ,  $P<0.01$ ). Jest to zgodne z wynikami naszych wcześniejszych badań wpływu tak Al, jak i innych toksycznych metali (Cd, Mn, Pb) (Karolewski i Giertych, 1994). W tych badaniach Al powodował także wzrost (nieistotny) poziomu o-dF w korzeniach i SF w igłach siewek. Przyczyną tego mogą być przeciwne kierunki oddziaływania kationów  $\text{Al}^{+3}$  i anionów  $\text{NO}_3^-$  na poziom związków fenolowych (Hoque, 1982). Stwierdzono bowiem u brzozy (Haukioja i in., 1985) oraz buka (Balsberg Pålsson, 1992) i jodły (Muzika i Pregitzer, 1992), że nawożenie azotowe powoduje w liściach i igłach obniżenie poziomu fenoli, czym autorzy uzasadniają wzrost podatności drzew na patogeny grzybowe po tego typu zabiegach. W naszych badaniach stosowaliśmy jednak świadomie azotan glinu. Jak to sugerują Boudot i wsp. (1994) rozbieżność wyników badań różnych autorów i niejednokrotne stwierdzanie braku wpływu soli glinowych w postaci siarczanów i fosforanów jest spowodowana powstawaniem nietoksycznych polymerów  $\text{Al}-\text{SO}_4^{-2}$  i  $\text{Al}-\text{PO}_4^{-3}$ , których skład zależy od stosunku stężeń Al do anionów.



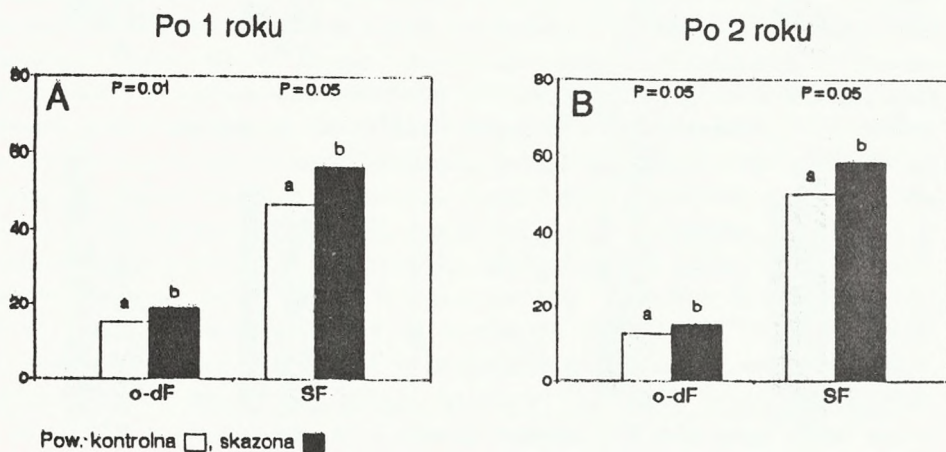
Ryc. 1. Zawartość orto-dwufenoli (o-dF) i sumy fenoli (SF), oznaczonych w  $\mu\text{M}$  kwasu chlorogenowego  $\text{g}^{-1}$  ś.m., w igłach (A, B) i korzeniach (C, D) siewek sosny zwyczajnej, traktowanych roztworami azotanu glinu (Al) w różnych stężeniach oraz azotanem glinu i węglanem wapnia przy różnym stosunku (Ca/Al) ich równoważników chemicznych (R. chem.). Symbole literowe oznaczają istotność różnic przy określonym poziomie ufności (P) dla każdego wariantu reprezentowanego przez  $n=4$  siewki.

Fig. 1. Content of ortho-diphenols (o-dF) and total phenols (SF) (estimated as  $\mu\text{M}$  chlorogenic acid  $\text{g}^{-1}$  f.wt.), in needles (A, B) and roots (C, D) of Scots pine seedlings, treated with a solution of aluminum nitrate (Al) at different concentrations and aluminum nitrate and calcium carbonate at different ratios (Ca/Al) of their chemical equivalents (R. chem.). The same letters indicate lack of the significant differences at the defined confidence level (P) for each variant (represented by  $n=4$  seedlings).

Wyższy stosunek Ca/Al powodował istotne zwiększenie poziomu SF w igłach siewek ( $F=2.17$ ,  $P<0.1$ ) (ryc. 1). Wprowadzanie do środowiska dodatkowych ilości Ca łagodzi skutki szkodliwego wpływu Al (Rengel, 1992), ograniczając jego pobieranie przez rośliny i zmniejszenie ilości jego ruchomych form w glebie (Kabata-Pendias i Pendias, 1993). Tym samym Ca powinien także umniejszać wzrost poziomu fenoli, będący skutkiem działania Al. Być

może, stosowanie Ca przy niskich dawkach Al wzmaga szkodliwe działanie glinu, a dopiero przy wyższych umniejsza je (Henriksen i in., 1992). Ponadto, jak stwierdzili ww. autorzy, wyższe dawki Ca wpływały korzystnie na obniżenie akumulacji Al w pędach i korzeniach siewek świerka pospolitego, ale jednocześnie niekorzystnie obniżały w nich poziom Mg.

Analizowanie wpływu różnego stosunku Ca/Al na obydwie badane grupy fenoli dla poszczególnych dawek Al okazało się niecelowe ze względu na stwierdzenie braku istotnej interakcji pomiędzy tymi cechami zarówno w igłach, jak i w korzeniach.



Ryc. 2. Zawartość orto-dwufenoli (o-dF) i sumy fenoli (SF), oznaczonych w  $\mu\text{M}$  kwasu chlorogenowego  $\text{g}^{-1}$  ś.m., w igłach dwuletnich po pierwszym (A) i bieżącego rocznika po drugim roku (B) po nawożeniu dolomitem, łącznie dla 4 populacji sosny zwyczajnej, drzew nienawożonych i nawożonych, w zależności od lokalizacji – na powierzchni kontrolnej i skażonej. Symbole literowe oznaczają istotność różnic przy określonym poziomie ufności (P) dla każdego wariantu reprezentowanego przez  $n=32$  drzewa.

Fig. 2. Content of ortho-diphenols (o-dF) and total phenols (SF) (estimated as  $\mu\text{M}$  chlorogenic acid  $\text{g}^{-1}$  f.wt.), in 2-year-old needles one year after fertilization with dolomite (A) and in current year needles two years after fertilization (B), on polluted and control site. The same letters indicate lack of the significant differences at the defined confidence level (P) for each variant (represented by  $n=32$  trees, average for four populations and fertilized and not fertilized).

Pomiędzy zawartościami o-dF i SF stwierdzono istotną dodatnią korelację, zarówno w przypadku igieł ( $r=0.61$ ,  $P<0.01$ ) jak i korzeni ( $r=0.67$ ,  $P<0.01$ ). Dane z literatury wskazują, że biologiczna aktywność związków fenolowych, a szczególnie o-dF, w dużej mierze związana jest z ich udziałem w procesach oksydacyjnych roślin. Najczęściej działają one jako przenośniki elektronów w końcowych reakcjach utleniania, katalizowanych przez oksydazy fenolowe



(Tomaszewski, 1961; Rubin i Arcichowska, 1971). Powodując wzrost natężenia oddychania przyczyniać się mogą do dostarczania energii niezbędnej w procesach obronnych i regeneracyjnych u roślin w stresie wywołanym przez toksyczne substancje (Ballantyne, 1973; Koziol i Jordan, 1978). Zarówno w tych, jak i wcześniejszych badaniach zmiany zawartości o-dF i SF pod wpływem Al i innych toksycznych metali, a także SO<sub>2</sub> były podobne (Giertych i Karolewski, 1993; Karolewski i Giertych, 1994).

Wyniki szeregu prac wskazują, że na działanie glinu bardziej narażone są korzenie niż liście roślin (Borkowska, 1988). W naszych badaniach stwierdziliśmy, że zmiany zawartości fenoli, następujące pod wpływem tych samych dawek Al i przy tym samym stosunku Ca/Al, przebiegały podobnie w igłach i w korzeniach siewek: o-dF ( $r=0.29$ ,  $P<0.05$ ), SF ( $r=0.25$ ,  $P<0.1$ ).

Tabela 3

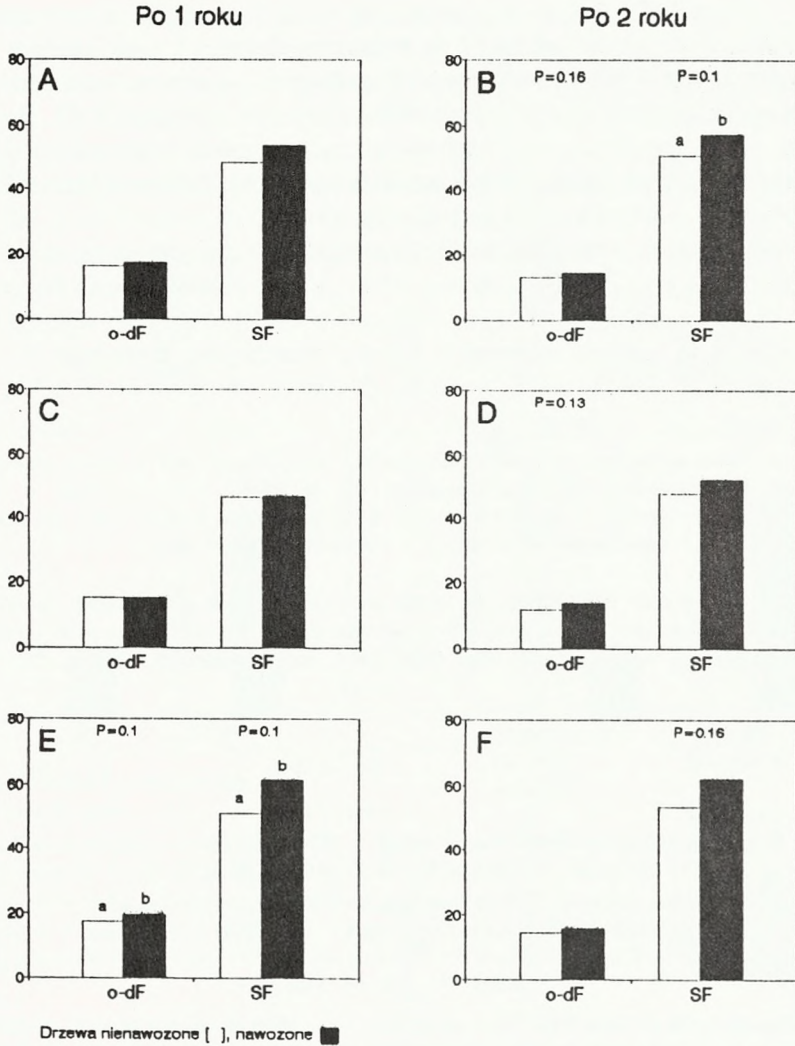
Analiza wariancji zawartości orto-dwufenoli (o-dF) i sumy fenoli (SF) w igłach siewek sosny zwyczajnej 4 proveniencji (P), zlokalizowanych (L) na dwóch powierzchniach: w Kórniku i Luboniu, nienawożonych i nawożonych (N), po pierwszym i drugim roku po nawożeniu dolomitom (\*- $P<0.1$ , \*\*- $P<0.05$ , \*\*\*- $P<0.01$ ).

Table 3

Analysis of variance of ortho-diphenols (o-dF) and total phenols (SF) content in needles of seedlings of four Scots pine populations (P), on two sites (L): Kórnik and Luboń, with and without fertilization (N), one and two years after fertilization with dolomite (\*- $P<0.1$ , \*\*- $P<0.05$ , \*\*\*- $P<0.01$ ).

Źródło zmienności Source of variation	Stopnie swobody Degrees of freedom	F			
		Po 1 roku After 1 year		Po 2 roku After 2 years	
		o-dF	SF	o-dF	SF
Ogółem/Total	63				
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*
L × P	3	0.45	1.07	1.34	1.34
L × N	1	2.36	1.72	0.24	0.38
P × N	3	0.09	0.93	0.12	0.79
L × P × N	3	1.11	0.30	0.80	1.47
Resztowa/Residual	48				

Wyniki badań terenowych wykazują, że u drzew rosnących na powierzchni skażonej zawartość fenoli w igłach była istotnie wyższa, niż na powierzchni kontrolnej (ryc. 2, tabela 2). Zależność ta stwierdzona została dla obydwu badanych grup fenoli (o-dF i SF) i potwierdzona w dwu kolejnych latach. Wyniki naszych badań potwierdzają w tym przypadku hipotezę wysuwaną przez niektórych badaczy o podobnej reakcji roślin (na poziomie fizjologiczno-biochemicznym), na działanie różnego rodzaju szkodliwych czynników



Ryc. 3. Wpływ nawożenia dolomitom na zawartość orto-dwufenoli (o-dF) i sumy fenoli (SF), oznaczonych w  $\mu\text{M}$  kwasu chlorogenowego  $\text{g}^{-1}$  ś.m., w igłach dwuletnich po pierwszym (A, C, E) i bieżącego rocznika po drugim roku (B, D, F) po nawożeniu dolomitom drzew sosny zwyczajnej 4 populacji (średnie wartości), rosnących na powierzchni kontrolnej i skażonej – łącznie (A, B,  $n=32$  drzewa) oraz oddzielnie na powierzchni kontrolnej (C, D,  $n=16$ ) i skażonej (E, F,  $n=16$ ).

Symbole literowe jak na rycinie 2.

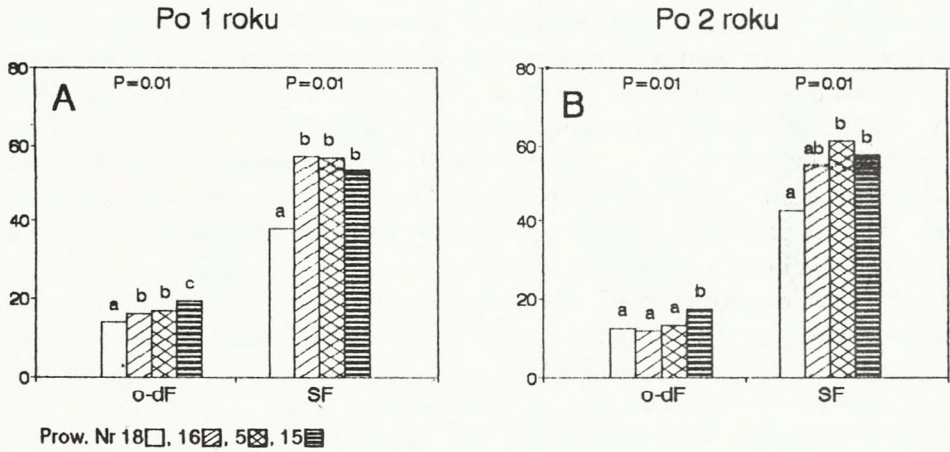
Fig. 3. Influence of dolomite fertilization on the content of ortho-diphenols (o-dF) and total phenols (SF) in needles of Scots pine (estimated as  $\mu\text{M}$  chlorogenic acid  $\text{g}^{-1}$  f.wt.) in 2-year-old needles after one year (A, C, E) and in 1-year-old needles after two years (B, D, F). Averages for  $n=32$  trees – (polluted and control together A, B), for  $n=16$  trees (control C, D) and  $n=16$  trees (polluted E, F). The same letters indicate lack of significant differences at the defined confidence level (P) for each variant.

(Jones, 1978; Chapin, 1991). Wpływ zanieczyszczeń na poziom fenoli był istotny, przy jednoczesnej podwyższonej zawartości glinu i emisji przez PZNF związków fluoru. Zarówno wyniki tych, jak i wcześniejszych badań wskazują, że zarówno Al (Karolewski i Giertych, 1994), jak i związki fluoru (Keller, 1976; Yee-Meiler 1974, 1977) powodują wzrost poziomu fenoli. Z drugiej strony, pomiędzy jonami Al i F następują reakcje z wytworzeniem kompleksów, co w efekcie obniża toksyczność jonów Al, osłabiając ich inhibujące działanie zarówno na przyrost roślin jak i pobieranie przez nie oraz transport Ca, Mg, P i K (MacLean i in., 1992).

W terenie skażonym obserwowano na igłach uszkodzenia typowe dla wpływu toksycznych substancji (gazów i toksycznych metali). Nekrozy, rozpoczynające się od wierzchołka igieł i powiększające w kierunku nasady, nie były tak duże jak to obserwowano we wcześniejszych latach (Oleksyn i in., 1988) i tylko sporadycznie przekraczały 10% powierzchni poszczególnych igieł. Nawożenie dolomitem przyczyniło się w istotnym stopniu ( $P < 0.15$ ) do zmniejszenia liczby igieł wykazujących uszkodzenia pod wpływem zanieczyszczeń, jednak tylko w drugim roku po nawożeniu.

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 (tabela 3). Wpływ nawożenia dolomitem na poziom o-dF i SF był zróżnicowany i zależał od długości okresu czasu od nawożenia (po pierwszym i drugim roku) oraz lokalizacji powierzchni (ryc. 3). Wpływ nawożenia na wzrost zawartości fenoli, analizowany łącznie na obydwu powierzchniach (ryc. 3A, B) i w terenie wolnym od zanieczyszczeń (ryc. 3C, D), był większy w drugim roku po nawożeniu. Na powierzchni skażonej nawożenie posiadało bardziej istotny wpływ na wzrost poziomu fenoli w pierwszym niż drugim roku (ryc. 3E, F).

Zawartość fenoli w dużym stopniu zależała od pochodzenia populacji, co jednak nie było związane ani z lokalizacją drzew, ani nawożeniem (tabela 3). Na duże zróżnicowanie w poziomie wolnych fenoli i polifenoli w igłach, w zależności od proveniencji, wskazał już wcześniej Forrest (1975) u *Picea sitchensis*. Należy dodatkowo podkreślić, że populacja nr 15 charakteryzująca się najwyższym poziomem fenoli (ryc. 4), we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w warunkach terenowych na tej samej powierzchni (Luboń) oraz innej, skażonej przez  $SO_2$  i metale ciężkie (Głogów), jak i w warunkach kontrolowanego wpływu  $SO_2$ , HF i  $NO_2$ , wykazywała bardzo wysoki stopień tolerancji w porównaniu do wielu innych populacji, w tym i pozostałych trzech uwzględnionych w tych badaniach (Oleksyn i in., 1988). Badania niektórych autorów (za Foy i in., 1978) świadczą, że bardziej tolerancyjne na Al są te rośliny, które zawierają duże ilości związków fenolowych, detoksyfikujących glin poprzez tworzenie z nim chelatów.



Ryc. 4. Zawartość orto-dwufenoli (o-dF) i sumy fenoli (SF), oznaczonych w  $\mu\text{M}$  kwasu chlorogenowego  $\text{g}^{-1}$  ś.m., w igłach dwuletnich po pierwszym (A) i bieżącego rocznika po drugim roku (B) po nawożeniu dolomitom drzew sosny zwyczajnej, łącznie dla drzew nienawożonych i nawożonych oraz rosnących na obydwu powierzchniach – kontrolnej i skażonej (średnie wartości), w zależności od pochodzenia populacji. Numery populacji jak w tabeli 2. Symbole literowe jak na rycinie 2,  $n=16$  drzew.

Fig. 4. Content of ortho-diphenols (o-dF) and total phenols (SF) (estimated as  $\mu\text{M}$  chlorogenic acid  $\text{g}^{-1}$  f.wt.), in 2-year-old needles one year after fertilization with dolomite (A) and in current year needles two years after fertilization (B), for four provenances (together for fertilized and not fertilized trees on the control and polluted site  $n=16$ ). Provenance numbers as in Table 2. The same letters indicate lack of the significant differences at the defined confidence level (P) for each variant.

#### STRESZCZENIE

Badania wpływu Al, przeprowadzone w szklarni i w terenie w warunkach skażenia środowiska przez Al, S i F wykazały, że zanieczyszczenia te powodują wzrost zawartości fenoli w igłach, zarówno u młodych siewek, jak i kilkuletnich drzew sosny zwyczajnej. Wprowadzenie do gleby dodatkowych ilości Ca lub Ca + Mg w postaci dolomitu, prowadzi również do zwiększenia poziomu fenoli. Zastosowanie jednorazowego nawożenia dolomitom ( $0.23 \text{ kg m}^{-2}$ ) w niewielkim stopniu redukowało uszkodzenia spowodowane skażeniem środowiska, zarówno w pierwszym jak i drugim roku po nawożeniu.

W badaniach terenowych oraz laboratoryjnych, poziom fenoli określanych jako orto-dwufenole (o-dF) był dodatnio skorelowany z sumą związków fenolowych (SF). Zmiany zawartości o-dF i SF, następujące pod wpływem Al i Ca, przebiegały podobnie w igłach i korzeniach siewek.

## LITERATURA

- AERTS R.J., BAUMANN T.W., 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *J. Exp. Bot.*, 45(273): 497-503.
- AROVAARA H., ILVESNIEMI H., 1990. Effects of soluble inorganic aluminium on the growth and nutrient concentration of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings. *Scand. J. For. Res.*, 5: 49-57.
- BALLANTYNE D.J., 1973. Sulphite inhibition of ATP formation in plant mitochondria. *Phytochem.*, 12: 1207-1209.
- BALSBERG PÅHLSSON A.M., 1992. Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Tree Physiology*, 10: 93-100.
- BORKOWSKA B., 1988. Toksyczność glinu. *Wiadomości Botaniczne*, 32(3): 157-166.
- BORKOWSKA B., SAS L., 1992. Tolerancja drzew owocowych na glin. "Mechanizmy regulacji morfogenezy roślin oraz ich funkcjonowanie w warunkach stresowych i zanieczyszczonego środowiska" – V Ogólnopolska Konf., Rogów 15-16 czerwca 1992: 117.
- BOUDOT J.P., BECQUER T., MERLET D., ROUILLER J., 1994. Aluminium toxicity in declining forests: A general overview with a seasonal assessment in a silver fir forest in the Vosges mountains (France). *Ann. Sci. For.*, 51: 27-51.
- CHAPIN F.S., 1991. Integrated response of plants to stress. *BioScience*, 41(1): 29-36.
- 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.
- CHECH-KOZŁOWSKA M., KRZYWAŃSKI Z., 1984. Phenolic compounds and the polyphenoloxidase and peroxidase activity in callus tissue culture-pathogen combination of red raspberry and *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *Phytopath.*, 109: 176-182.
- CZUBA G., 1985. Effect of aluminium on respiratory control of mitochondria from roots tips of Al-sensitive and Al-resistant wheat varieties. *Acta Physiol. Plant.*, 7(2): 103-106.
- DEDONDER A., VANSUMERE C.F., 1971. The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of *Chlorella vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 61: 176-182.
- DEKOCK P.C., VAUGHAN D., 1975. Effects of some chelating and phenolic substances on the growth of excised pea root segments. *Planta (Berl.)*, 126: 187-195.
- DE LIMA M.L., COPELAND L., 1994. The effect of aluminium on respiration of wheat roots. *Physiol. Plant.*, 90: 51-58.
- FARID J., 1991. Aluminium effects on growth, nutrient net uptake and transport in 3 rice (*Oryza sativa*) cultivars with different sensitivity to aluminium. *Physiol. Plant.*, 83: 441-448.
- 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.
- FOY C.D., CHANEY R.L., WHITE M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 511-566.
- GEBUREK T., SCHOLZ F., 1992. Response of *Picea abies* (L.) Karst. provenances to sulphur dioxide and aluminium: A pilot study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 62: 227-232.
- 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.
- 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.
- GLIŃSKI J., KRZACZEK T., WOLSKI T., 1986. Wpływ korowej frakcji fenolowej na kiełkowanie i wzrost korzeni wybranych roślin. *Roczniki Gleboznawcze*, 37(2-3): 391-402.

- GONZÁLEZ A., SÁNCHEZ TAMÉS R., RODRIGUEZ R., 1991. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. *Physiol. Plant.*, 83: 611-620.
- GÖRANSSON A., ELDHUSET T.D., 1991. Effects of aluminium on growth and nutrient uptake of small *Picea abies* and *Pinus sylvestris* plants. *Trees*, 5: 136-142.
- GREGER M., TILLBERY J.-E., JOHANSSON M., 1992a. Aluminium effect on *Scenedesmus obtusiusculus* with different phosphorus status. I. Mineral uptake. *Physiol. Plant.*, 84: 193-201.
- GREGER M., TILLBERY J.-E., JOHANSSON M., 1992b. Aluminium effect on *Scenedesmus obtusiusculus* with different phosphorus status. II. Growth, photosynthesis and pH. *Physiol. Plant.*, 84: 202-208.
- HAUKIOJA E., NIEMELA P., SIREN S., 1985. Foliage phenols and nitrogen in relation to growth, insect damage, and ability to recover after defoliation, in the mountain birch *Betula pubescens* ssp *tortuosa*. *Oecologia*, 65(2): 214-222.
- 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(4-5): 280-296.
- HUTTUNEN S., 1978. The effects of air pollution on provenances of Scots pine and Norway spruce in northern Finland. *Silva Fenn.*, 12: 1-16.
- JOHNSON G., SCHAAL L.A., 1957a. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease and resistance. *American Potato J.*, 34: 200-209.
- JOHNSON G., SCHAAL L.A., 1957b. Chlorogenic acid and other orthodihydroxyphenols in scab-resistant Ressel Burrank and scab-susceptible Triumph potato tubers of different maturities. *Phytopath.*, 47: 253-255.
- JONES H.G., 1978. How plants respond to stress. *Nature*, 271: 610.
- JORDAN D.N., GREEN T.H., CHAPPELKA A.H., LOCKABY B.G., MELDAHL R.S., GIERSTAD D.H., 1991. Response of total tannins and phenolics in loblolly pine foliage exposed to ozone and acid rain. *J. Chem. Ecology*, 17(3): 505-513.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1993. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa: 1-364.
- KAROLEWSKI P., 1990. Visible and invisible injury to Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles caused by sulphur dioxide. *Arbor. Kórnickie*, 35: 127-136.
- KAROLEWSKI P., DASZKIEWICZ P., 1988. Wpływ dwutlenku siarki na poziom fenoli w liściach topoli o zróżnicowanej wrażliwości na działanie tego gazu. *Arbor. Kórnickie*, 33: 231-238.
- KAROLEWSKI P., GIERTYCH M.J., 1992. Udział fenoli w reakcji sosny zwyczajnej na działanie zanieczyszczeń powietrza związkami fluoru. *Symp. "Metabolizm fluoru 92"*. PTBioch., Szczecin 25 września 1992: 116-118.
- KAROLEWSKI P., GIERTYCH M.J., 1994. Influence of aluminium, cadmium, manganese and lead ions on the level of phenols in needles and roots and on root respiration of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in laboratory conditions. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 63(1): 29-35.
- KELLER H., 1976. Histologische und physiologische Untersuchungen an Forstpflanzen in einem Fluorschadensgebiet. *Mitt. Eidg. Anst. forstl. Versuchswes., Ber.*, 154: 1-82.
- KOMISAREK J., KOCIAŁKOWSKI W., RACHWAŁ L., SIENKIEWICZ A., 1990. Wpływ CaCO<sub>3</sub> na zawartość różnych form Cu, Zn i Pb w glebach skażonych. *PTPN, Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśnych*, 69: 53-62.
- KOZIOL 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.
- MACLEAN D.C., HANSEN K.S., SCHNEIDER R.E., 1992. Amelioration of aluminium toxicity in wheat by fluoride. *New Phytol.*, 121: 81-88.

- McLAUGHLIN S.B., ANDERSEN C.P., HANSON P.J., TJOELKER M.G., ROY W.K., 1991. Increased dark respiration and calcium deficiency of red spruce in relation to acidic deposition at high-elevation southern Appalachian Mountain sites. *Can. J. For. Res.*, 21: 1234-1244.
- MIREKU E., WILKES J., 1988. Production of phenols in the sapwood of *Eucalyptus maculata* after wounding and infection. *Eur. J. For. Path.*, 18: 121-127.
- MUZIKA R.M., PREGITZER K.S., 1992. Effect of nitrogen fertilization on leaf phenolic production of grand fir seedlings. *Trees*, 6: 241-244.
- NEITZKE M., RUNGE M., 1985. Keimlings- und Jungpflanzen-entwicklung der Buche (*Fagus sylvatica* L.) in Abhängigkeit vom Al/Ca-Verhältnis des Bodenextraktes. *Flora*, 177: 237-249.
- NIEMANN G.J., 1976. Phenolics from *Larix* needles. XII. Seasonal variation of main flavonoids in leaves of *L. leptolepis*. *Acta Bot. Neerl.*, 25(5): 349-359.
- NIEMANN G.J., 1980. Phenolics from *Larix* needles. XVI. Inter- and infra-clonal variation in *Larix leptolepis*. *Can. J. Bot.*, 58(22): 2313-2317.
- NIEMANN G.J., VAN GENDEREN H., 1980. Chemical relationship between *Pinaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8: 237-240.
- OLEKSYN J., 1988a. Height growth of different European Scots pine *Pinus sylvestris* L. provenances in a heavily polluted and a control environment. *Environ. Pollut.*, 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., 1991. Inheritance of resistance to abiotic factors. W: *Genetics of Scots pine* (red. M. Giertych i C. Matyas), Elsevier Sci. Publ., Amsterdam: 219-229.
- OLEKSYN J., KAROLEWSKI P., RACHWAŁ L., 1988. Susceptibility of European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) provenances to the action of SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>+NO<sub>2</sub> and HF in laboratory and field conditions. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 57(1): 107-115.
- PFEFFER P.E., TU S.-I., GERASIMOWICZ W.V., CAVANAUGH J.R., 1986. *In vivo* <sup>31</sup>P NMR studies of corn root tissue and its uptake of toxic metals. *Plant Physiol.*, 80: 77-84.
- RACHWAŁ L., 1983. Tolerance variability of trees and shrubs to high concentrations of SO<sub>2</sub> and heavy metals. *Aquilo Ser. Bot.*, 19: 342-353.
- RADEMACHER P., KRIEBITZSCH W.U., 1992. Diagnostischer Düngungsversuch an Fichte am Standort "Postturm". W: *Luftverunreinigungen und Waldschäden am Standort "Postturm"*, Forstamt Farchau/Ratzenburg. W. Michaelis, J. Bauch (Hrsg.), GKSS-Forschungszentrum Geesthacht, GKSS 92/E/100: 287-306.
- REICH P.G., OLEKSYN J., TJOELKER M.G., 1994. Relationship of aluminium and calcium to net CO<sub>2</sub> exchange among diverse Scots pine provenances under pollution stress in Poland. *Oecologia*, 97: 82-92.
- RENGEL Z., 1990. Competitive Al inhibition of net Mg uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. II. Plant age effects. *Plant Physiol.*, 93: 1261-1267.
- RENGEL Z., 1992. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.*, 121: 499-513.
- RENGEL Z., ROBINSON D.L., 1989. Competitive Al inhibition of net Mg uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. I. Kinetics. *Plant Physiol.*, 91: 1407-1413.
- RUBIN B., ARCICHOWSKA J., 1971. Udział fenoli i ich pochodnych w reakcjach obronnych. W: *Biochemia i fizjologia odporności roślin*. PWRiL, Warszawa: 200-220.
- SCHÜTT P., LANG K.J., MARGAIT D., 1970. Ein Schnelltest zur Ermittlung der individuellen SO<sub>2</sub>-Empfindlichkeit bei Kiefern. *Forstw. Cbl.*, 89: 153-161.
- SINGLETON V.L., ROSSI J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viti*, 16: 144-158.
- SKRZYPczAK L., THIEM B., 1987. Metabolity stresowe roślin wyższych. *Wiadomości Botaniczne*, 31(3): 157-166.

- SZKUTNICKA K., 1979. Amoniako-liaza fenyloalaniny (PAL). I. Charakterystyka, występowanie, zmiany aktywności i rola fizjologiczna enzymu w roślinach. *Wiadomości Botaniczne*, 23(2): 89-101.
- ŚLASKI J., 1992. Mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie jonów glinu u roślin wyższych. *Wiadomości Botaniczne*, 36(1-2): 31-45.
- 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.
- VANCE C.P., SHERWOOD R.T., 1976. Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. *Plant Physiol.*, 6: 915-920.
- WHITE R.F., 1979. Acetylsalicylic acid induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99: 410-412.
- 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(4): 203-229.
- ZIMMERMANN G., 1974. Types of discoloration of *Acer pseudoplatanus* stemwood and their causes. *Forstw. Cbl.*, 93(5): 247-261, *For. abstr.* 1975 No 036-03632.
- ZOBEL A., NIGSWANDER 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.