

Krzysztof RAKOWSKI*

**FIZJOLOGICZNE I MOLEKULARNE PODSTAWY
REAKCJI DRZEW NA STRESY ŚRODOWISKOWE.
CZEŚĆ II. WPŁYW FLUOROWODORU I NISKICH
TEMPERATUR**

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BASES OF TREES RESPOND
TO ENVIRONMENTAL STRESS.
PART II. EFFECT OF HYDROGEN FLUORIDE AND LOW TEMPERATURE

***Abstract.** Physiological respond and adaptation of trees to environmental stress has been elaborated with emphasis to gaseous hydrogen fluoride and cold treatment. Molecular mechanisms of plants defence reaction has been discussed in respect to changes of plasma membrane properties and hormonal control.*

***Key words:** ATPase, cold, hydrogen fluoride, lipid composition, plasma membrane, stress adaptation.*

*Instytut Badawczy Leśnictwa w Warszawie, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Las, 05-090 Raszyn, e-mail: k.rakowski@ibles.waw.pl

1. WSTĘP

Szkodliwy wpływ zanieczyszczeń powietrza na drzewa jest odnotowywany od wielu stuleci. Pierwsze dane literaturowe dotyczące negatywnego oddziaływania zanieczyszczeń powietrza na las pochodzą od Pliniusza Starszego (63 p.n.e. – 23 n.e.). Jego dzieło, pt. „*Historia naturalis*”, zawiera opis giniecia lasów wokół pieców hutniczych, w których wytapiano srebro i inne metale (Kamiński 1987). W czasach nowożytnych John Evelyn w swoim klasycznym dziele z 1661 r. pt. „*Fumifugium, or the Inconvenience of the Aer and Smoake of London Dissipated*” opisuje negatywny wpływ dymów, produkowanych podczas spalania węgla, na ludzi, zwierzęta i roślinność (Treshow i Anderson 1989). Także Linneusz opisuje zamieranie lasów wokół hut i stwierdza, że: „dymy niszczą nie tylko roślinność, ale i glebę, na której potem nic już nie rośnie” (Kamiński 1987).

Zmiany środowiska naturalnego w skali świata, które zaszły na terenach leśnych w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX w. należy zaliczyć do największych z dotychczas znanych, a związane z tym zamieranie lasów zaczęło mieć znamiona globalnej katastrofy. Prognozy pochodzące z lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia zakładały dalszy wzrost stężenia substancji szkodliwych w powietrzu na terenach Europy oraz Ameryki Północnej (Guderian 1977) oraz związane z tym dalsze nasilenie się katastrofalnych skutków ich oddziaływania. Dzięki postępowi technologicznemu oraz wpływowi opinii publicznej na terenie centralnej Europy już od początku lat osiemdziesiątych rozpoczął się spadek zawartości dwutlenku siarki, tlenków azotu oraz innych substancji szkodliwych zawartych w powietrzu. W efekcie tych zmian, lasy pozostają obecnie pod wpływem oddziaływania niższych niż poprzednio stężeń substancji szkodliwych zawartych w powietrzu (Treshow i Anderson 1989, Zimmermann i in. 2003). Ekspozycja roślin na zanieczyszczenia powietrza ma teraz charakter permanentny, a szkodliwe oddziaływanie obejmuje wielki obszar. Dodatkowym negatywnym czynnikiem powszechnie obserwowanym jest akumulacja substancji szkodliwych w środowisku leśnym. W związku z obserwowanymi zmianami nastąpiła także modyfikacja ekologicznego znaczenia substancji trujących występujących w powietrzu (Trojanowski 1985). Obok zmniejszenia zakresu oddziaływania tych pierwotnych, uznawanych dotąd za najbardziej szkodliwe (dwutlenek siarki, ozon, fluorki i tlenki azoty), wzrosło znaczenie wpływu związków wtórnych, będących produktem interakcji polutantów pierwotnych.

Taka sytuacja (permanentne oddziaływanie na dużych obszarach przy zmniejszonej koncentracji oraz akumulacja w środowisku leśnym) nie powoduje co prawda gwałtownych skutków o charakterze katastrofy ekologicznej, lecz może wywoływać występowanie zjawiska tzw. presji selekcyjnej. Zanieczyszczenia powietrza mogą pełnić w tym wypadku rolę silnych czynników selekcyjnych oddziałujących na strukturę i sposób funkcjonowania ekosystemów leśnych (Scholz 1981, Sinclair 1969). Zjawisko presji selekcyjnej polega na stopniowym eliminowaniu z poszczególnych populacji osobników najmniej odpornych oraz preferencyjnym

odtworzeniu genotypów najmniej wrażliwych na zanieczyszczenia powietrza (Scholz i Venne 1989). Występujące w wyniku tego procesu zawężenie puli genowej oraz zmniejszenie różnorodności genetycznej może być podstawowym elementem decydującym o odporności zbiorowisk leśnych na oddziaływanie innych, szkodliwych czynników środowiska zewnętrznego. Może też decydować o jakości i ilości produkowanego surowca drzewnego. Poznanie mechanizmów odpornościowych, zdolności regeneracyjnej oraz skutków fizjologicznych spowodowanych wpływem zanieczyszczeń powietrza na poziomie molekularnym może mieć podstawowe znaczenie nie tylko z punktu widzenia naukowego i poznawczego, lecz także gospodarczego.

2. ODDZIAŁYWANIE GAZOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ POWIETRZA NA PRZYKŁADZIE FLUOROWODORU

Do najbardziej toksycznych, dość powszechnie występujących, składników zanieczyszczeń powietrza zaliczane są związki fluoru, a wśród nich gazowy fluorowódor (HF) (Guderian 1977, Weinstein 1977, Saxe 1990). Pierwsze opisy negatywnych skutków spowodowanych przez fluor pochodzą sprzed ok. 1000 lat z terenów Islandii i dotyczą zatrucia zwierząt domowych związkami fluoru po erupcji wulkanicznej (Treshow i Anderson 1989). Natomiast bezpośredni, szkodliwy wpływ związków fluoru na rośliny został pierwszy raz odnotowany na terenie Niemiec w roku 1883 (Treshow i Anderson 1989).

Związki fluoru wydzielane są do atmosfery przez fabryki zajmujące się produkcją aluminium, stali, szkła, ceramiki oraz nawozów fosforowych (Saxe 1990). Ich stężenie w powietrzu waha się w zakresie od 0,1 ppb poza ośrodkami miejskimi i przemysłowymi do ponad 2,3 ppb na terenach zurbanizowanych i uprzemysłowionych (Envir. Prot. Ag. 1978).

Uszkodzenia wywołane przez fluor występują w postaci jasnobrązowych nekroz postępujących od wierzchołka igieł lub od brzegu blaszki liściowej ku podstawie. Dość częstą i charakterystyczną cechą uszkodzeń wywołanych przez fluor jest występowanie rudobrązowej linii oddzielającej część nekrotyczną od zdrowej tkanki (Treshow i Anderson 1989, Saxe 1990). W związku z wysoką reaktywnością roślin na fluor uszkodzenia spowodowane przez fluorowódor pojawiają się bardzo szybko i to nawet przy relatywnie niskich stężeniach w powietrzu. Wyniki doświadczeń wykazały, że u wrażliwych drzew leśnych, takich jak: sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris*), świerk pospolity (*Picea abies*), sosna wejmutka (*Pinus strobus*), jodła kaukaska (*Abies nordmanniana*), jarzab szwedzki (*Sorbus intermedia*) czy buk zwyczajny (*Fagus sylvatica*), przy stężeniu fluorowodoru w powietrzu wynoszącym 1,3 mg/m³ nekrozy mogą wystąpić już po upływie kilku dni (Guderian 1977, Treshow i Anderson 1989). Dlatego związek ten, nawet jeśli występuje w bardzo niskich koncentracjach, jest traktowany jako jeden z naj-

bardziej szkodliwych składników zanieczyszczeń powietrza, decydujący w dużym stopniu o ukierunkowaniu presji selekcyjnej w środowisku leśnym.

Wpływ fluoru na szereg podstawowych procesów fizjologicznych, takich jak: fotosynteza, oddychanie oraz metabolizm węglowodanów, tłuszczów i kwasów nukleinowych (Treshow i Anderson 1989) sprawia, że dokładne zbadanie mechanizmu jego oddziaływania jest bardzo ważne z punktu widzenia naukowego i może dać podstawę do szczegółowego poznania mechanizmów reakcji odpornościowych, zdolności regeneracyjnych oraz kierunku presji selekcyjnej występujących w populacjach drzew leśnych także pod wpływem innych polutantów.

Fluor *in vitro* przejawia hamujący wpływ na aktywność enzymów, takich jak enolaza (Warburg i Christian 1942) oraz ATPaza izolowana z plazmalemmy (Giannini i in. 1987). Jednocześnie wyniki badań *in vivo* nie wykazały wyraźnego zahamowania aktywności enzymatycznej w ekstraktach z roślin potraktowanych fluorem (McCune i in. 1964). Ta pozorną sprzeczność rezultatów może wskazywać, że w organizmie roślinnym funkcjonują mechanizmy kompensacyjne lub ochronne, zabezpieczające w pewnym stopniu system biologiczny przed szkodliwym działaniem związków fluoru.

Wyniki niektórych badań wykazały, że strukturami najwcześniej reagującymi na oddziaływanie fluoru są komórki aparatów szparkowych (Poovaiah i Wiebe 1973) oraz chloroplasty, a zwłaszcza tylakoidy – ich najbardziej wrażliwe elementy (Miller i Miller 1974, Soikkeli i Karenlampi 1984, Zwiazek i Shay 1987). Stwierdzono także, że fluor we wczesnych etapach oddziaływania może powodować uszkodzenia membran cytoplazmatycznych. Wniosek taki wyciągnięto na podstawie obserwowanego pojawiania się kropli tłuszczu w cytoplazmie oraz obniżania zawartości fosfolipidów przy jednoczesnym wzroście poziomu neutralnych lipidów u siewek traktowanych fluorem (Zwiazek i Shay 1987, 1988).

Rezultaty innych badań (Rakowski i Zwiazek 1992, Rakowski i in. 1995, Rakowski 1997a, 1997b) wskazują, że zastosowanie niskich stężeń fluorowodoru może pozwolić na uwidocznienie wczesnych fizjologicznych reakcji siewek sosny wejmutki na działanie tego szkodliwego czynnika. Fizjologiczne, biochemiczne i molekularne zmiany nastąpiły jeszcze przed wystąpieniem zewnętrznych objawów uszkodzenia, a nawet przed mierzalnym wzrostem stężenia fluoru w igłach. Obserwowana na początku doświadczenia zawartość fluoru w igłach, wynosząca ok. 2,0 ppm, jest niższa od uznawanej za naturalną w 1–2 letnich igłach (7–9 ppm) u drzew rosnących na terenie Polski (Bytnerowicz i in. 1983). Pojawienie się uszkodzeń przy zawartości ok. 10 ppm fluoru w igłach wydaje się wskazywać na większą wrażliwość siewek sosny wejmutki w porównaniu do innych wrażliwych gatunków iglastych, dla których stężenie progowe fluoru w liściach wynosi ok. 30 ppm.

Obniżona intensywność transpiracji, podwyższona wielkość potencjału wodnego oraz zwiększona zawartość wody, a także podwyższony wypływ elektrolitu, to zaobserwowane fizjologiczne zmiany spowodowane działaniem niskich stężeń gazowego fluorowodoru (Rakowski i Zwiazek 1992). Jest bardzo prawdopodobne,

że zwiększona zawartość wody oraz podwyższony potencjał wodny spowodowane były zamknięciem aparatów szparkowych, co potwierdzają wyniki innych badań (Poovaiah i Wiebe 1973) wskazujące na to, że komórki szparkowe w liściach soi reagują jako pierwsze na działanie gazowego fluoru, powodując zamknięcie aparatów szparkowych i stabilizując w ten sposób gospodarkę wodną.

Jednocześnie, obserwacje wielkości wypływu elektrolitu mogą wskazywać na zmiany przepuszczalności błon biologicznych igieł, w tym także błon komórek aparatów szparkowych i plazmalemy innych komórek. Przeprowadzone zabiegi eksperymentalne nie powodowały stresu wodnego, a zatem zmiany wypływu elektrolitu z igieł mogły być bezpośrednim skutkiem destabilizacji błon biologicznych wywołanej oddziaływaniem fluoru (Rakowski i Zwiazek 1992).

Wyniki badań Rakowskiego i Zwiazka (1992) nie wykazały wyraźnego wpływu fluorowodoru na proces fotosyntezy u siewek *Pinus strobus*. Pewne niewielkie obniżenie intensywności fotosyntezy netto mogło być wywołane zmniejszoną przepuszczalnością aparatów szparkowych. Podobnie wyniki innych badań (Hill 1969, Lorenc-Plucińska i Oleksyn 1982) wskazują, że – pomimo wyraźnej wrażliwości błon tylakoidów (Horvath i in. 1978) – fotosynteza nie jest procesem pozostającym pod wyraźnym wpływem niskich stężeń fluoru.

Nie stwierdzono także wyraźnych zmian w strukturze komórek miękiszu asymilacyjnego roślin, u których jednocześnie obserwowano zmiany w strukturze plazmalemy (Rakowski i in. 1995). Wyniki innych badań (Zwiazek i Shay 1987) wykazały wprawdzie zmiany w strukturze komórek miękiszu asymilacyjnego u roślin podlewanych roztworem fluorku sodu, jednak zmiany te mogły być częściowo wynikiem silnego stresu wodnego, a ponadto badania obejmowały prawdopodobnie tylko siewki o wyraźnych zewnętrznych symptomach uszkodzeń.

Jednocześnie zaobserwowano szereg zmian w strukturze lipidów plazmalemmowych oraz możliwość zmian aktywności plazmalemmowej ATPazy u roślin poddanych oddziaływaniu gazowego fluorowodoru. Wyniki tych samych badań (Rakowski i in. 1995, Rakowski 1997a, 1997b) wykazały także wyraźną zmianę składu steroli oraz stosunku steroli do fosfolipidów w plazmalemmie roślin rosnących po 2 dniach, a u roślin w stanie spoczynku – po 28 dniach traktowania fluorowodorem. Po 2 dniach oddziaływania fluorowodoru o stężeniu 0,5 ppb aktywność ATPazy u roślin rosnących zmniejszyła się nieznacznie, a wyraźnie wzrosła po 8 dniach. Rośliny pozostające w stanie spoczynku również wykazywały podwyższoną aktywność ATPazy, lecz dopiero po 28 dniach trwania doświadczenia. Wczesne zmiany w składzie lipidów plazmalemmowych oraz późniejsze zmiany aktywności ATPazy wydają się wskazywać, że przebudowa składu lipidów plazmalemmowych może być czynnikiem stabilizującym aktywność ATPazy *in vivo* przynajmniej w pierwszym okresie zastosowania niskich stężeń fluorowodoru. Sterole aktywują plazmalemmową ATPazę u roślin (Grandmougin i in. 1989, Sandstrom i Cleland 1989), a podwyższony stosunek zawartości steroli do fosfolipidów powoduje zmniejszenie szczelności membran (Anderson i in. 1981, Shinitzky 1984, Rakowski i Zwiazek 1992, Rakowski i in. 1995). Przyczyną wzrostu stosunku zawartości steroli do fosfolipidów i nastę-

pującego po nim wzroście aktywności ATPazy może być fakt, że do badań wybierano wyłącznie rośliny nie wykazujące zewnętrznych objawów uszkodzenia, a zatem rośliny najbardziej odporne na działanie gazowego fluorowodoru w zastosowanych stężeniach. Opisany mechanizm może zatem decydować o zwiększonej odporności badanych roślin (Rakowski i Zwiasek 1992, Rakowski i in. 1995). Ponadto stwierdzono, że rośliny w stanie spoczynku reagują z opóźnieniem na oddziaływanie gazowego fluorowodoru (Rakowski 1997a, 1997b). Rezultat ten jest zgodny z wynikami innych doświadczeń wykazującymi zmniejszoną wrażliwość roślin w stanie spoczynku na zanieczyszczenia powietrza (Maclean i in. 1986) oraz inne czynniki stresowe (Lahr 1997).

3. ODDZIAŁYWANIE NISKICH TEMPERATUR

Innym ważnym czynnikiem stresowym dla roślin jest oddziaływanie niskich temperatur. Wyodrębniono dwa typy stresu niskotemperaturowego: 1) chłód (chilling) obejmujący oddziaływanie temperatur w zakresie od 0 do 10 °C, oraz 2) mroź (freezing) obejmujący oddziaływanie temperatur poniżej 0 °C. W zależności od natężenia i czasu trwania, skutki wpływu niskich temperatur mogą powodować różny stopień uszkodzenia roślin. Wrażliwość na chłód jest powszechna u roślin stref tropikalnej i subtropikalnej, a uszkodzenie tych roślin jest spowodowane głównie destabilizacją błon komórkowych (Lewitt 1980). Mechanizm oddziaływania chłodu polega głównie na uszkodzeniu plazmalemy, przejawiającym się zwiększonym wypływem elektrolitu z tkanek (Minchin i Simon 1973). Niektórzy badacze uważają, że obserwowany zwiększony wypływ elektrolitu może być wywołany przejściem fazowym plazmalemy związanym ze zmianą składu lipidów lub białek membranowych (Williams 1990).

Rośliny strefy umiarkowanej są natomiast generalnie odporne na oddziaływanie chłodu. Rośliny tej strefy poddawane są oddziaływaniu mrozu w warunkach naturalnych zimą i w konsekwencji wykształciły system odporności na ten typ stresu. Stres mrozowy jest wynikiem funkcjonowania dwóch zasadniczych mechanizmów. Pierwszy z nich ma charakter wewnątrzkomórkowy i polega na wytworzeniu się kryształków lodu, które uszkadzają plazmalemę i inne membrany. Drugi – zewnątrzkomórkowy, mechanizm oddziaływania związany jest z formowaniem się w przestrzeniach międzykomórkowych i w ścianie komórkowej kryształków lodu, które wytwarzając niski potencjał wodny powodują odwodnienie komórek (Steponkus 1984, Guy 1990). Proces ten związany jest głównie z odwodnieniem cytoplazmy (Sakai i Larcher 1987). Stres spowodowany tego typu mrozową dehydratacją wywołuje skutki analogiczne do suszy. Dlatego też rośliny, aby przetrwać okres mrozu, musiały wykształcić system odpornościowy związany z wytrzymałością na odwodnienie komórek. Podobnie jak w przypadku oddziaływania chłodu, początkowym miejscem uszkodzeń mrozowych są błony biologiczne,

których destabilizacja prowadzi do zwiększonego wypływu elektrolitów z komórek (Steponkus i in. 1993, Palta i Weiss 1993). Tolerancja drzew na chłód i mróz zależy od długości dnia oraz temperatury (Weiser 1970) i wiąże się ze wzrostem poziomu zawartości kwasu abscysynowego (ABA) w komórkach (Wright 1975). Nie bez znaczenia dla stopnia odporności mrozowej roślin wydaje się być także proces adaptacji związany ze zmianami właściwości membran, składem białek, wzrostem zawartości cukrów, zmianami poziomu hormonów oraz zmianami w ekspresji informacji genetycznej (Chen i in. 1983, Steponkus i Lynch 1989, Palta i Weiss 1993, Guy i in. 1992, Palva 1994, Lang i in. 1994) w powiązaniu z indukcją specyficznego mRNA i białek (Chen i in. 1983, Mohapatra i in. 1989, Ryu i Li 1994).

Aklimacja do warunków obniżonej temperatury obejmuje zatem szereg zjawisk fizjologicznych występujących na różnych poziomach organizacji roślin. Do najważniejszych z nich należą: wzrost zawartości cukrów rozpuszczalnych (Perras i Sarham 1984, Ristic i Ashwoth 1993), wzrost zawartości wolnej proliny (Koster i Lynch 1992), wzrost stopnia nienasylenia lipidów membranowych (Miquel i in. 1993), zmiana ultrastruktury plazmalemy (Steponkus i in. 1988, Ristic i Ashwoth 1993), oraz synteza specyficznych białek antymrozowych (Hon i in. 1994). Spośród wymienionych reakcji fizjologicznych pierwszoplanową rolę przypisuje się zmianom struktury i funkcji plazmalemy. Panuje niemal powszechna opinia, że błona komórkowa odgrywa tak ważną rolę w reakcji i odporności roślin na mróz ze względu na jej peryferyczne położenie w komórce na granicy między roztworem zewnątrzkomórkowym a cytoplazmą oraz jej udział w gospodarce wodnej i równowadze jonowej komórek. Możliwości przetrwania przez roślinę okresu oddziaływania chłodu czy mrozu zależą zatem w sposób decydujący od zachowania stabilności plazmalemy.

Omawiane możliwości aklimacyjne wykorzystywane są między innymi przy przechowywaniu nasion w niskiej temperaturze. Jednak konsekwencje fizjologiczne zastosowania takich warunków przechowywania nasion nie są do końca wyjaśnione. Wyniki niektórych badań wykazały, że zastosowanie niskich temperatur w czasie przechowywania nasion świerka pospolitego nie spowodowało wyraźnych zmian ich żywotności mierzonej procentem kiełkowania (Rakowski i in. 1998). Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami nie wykazującymi zmian żywotności nasion drzew leśnych po zastosowaniu niskich temperatur przechowywania (Ahuja 1986, Jorgensen 1990). Zmiany płynności plazmalemy kiełkujących nasion świerka poddanych wcześniej oddziaływaniu temperatury -75°C oraz zmiany zależności tej płynności od temperatury u kiełkujących nasion poddanych wcześniej oddziaływaniu temperatury -25°C wskazują na możliwość wystąpienia pewnych fizjologicznych zmian związanych z indukcją procesu aklimacji, której skutki mogą być obserwowane w okresie późniejszym, podczas kiełkowania (Rakowski i in. 1998). Otrzymane wyniki są zgodne z obserwacjami zmian właściwości membran u innych roślin podczas oddziaływania chłodu i mrozu (Shewfelt 1992), a także z badaniami Sato i Murata (1981), wskazującymi,

że adaptacja do warunków niskiej temperatury może obejmować utrzymanie stałej płynności membran niezależnie od obniżania temperatury poprzez zwiększenie stopnia nienasyceń lipidów membranowych. Omawiane wyniki (Rakowski i in. 1998) wskazują, że podobny mechanizm może funkcjonować na poziomie plazmalemy w wypadku adaptacji fizjologicznej nasion świerka pospolitego przechowywanych w warunkach niskiej temperatury. Jednocześnie nie stwierdzono wyraźnych zmian ilościowych i jakościowych białek frakcji plazmalemmowej badanych siewek. Nie zaobserwowano także zmian aktywności plazmalemmowej ATPazy. Rezultaty te mogą wskazywać, że głównym czynnikiem decydującym o podwyższonej odporności siewek świerka na mróz może być zwiększenie płynności frakcji plazmalemmowej, prawdopodobnie w wyniku zmiany składu lipidów błony komórkowej. Podobne wyniki uzyskane wcześniej (Jian i in. 1982) nie wykazały różnic w aktywności plazmalemmowej ATPazy u hartowanych i nie hartowanych siewek zbóż rosnących w temperaturze 22 °C. Analiza aktywności enzymów membranowych, a zwłaszcza ATPazy, wykazała, że u roślin wrażliwych na chłód czy mróz, po obniżeniu temperatury może nastąpić częściowa lub całkowita inaktywacja tych enzymów (Yoshida i in. 1989, Yoshida 1991, Kasamo 1988). Z drugiej jednak strony można zacytować wyniki badań nie wykazujących obniżenia aktywności wakuolarniej H⁺-ATPazy po okresie chłodu (Hotsubo i in. 1997). Jest zatem możliwe, że także u siewek świerka pospolitego stabilność aktywności plazmalemmowej H⁺-ATPazy, przejawiająca się w ich tolerancji na niskie temperatury, polegała na stabilizacji struktury cząsteczek i aktywności tego enzymu na drodze modyfikacji składu lipidów błony komórkowej.

Innym zagadnieniem są skutki zastosowania niskich temperatur w okresie przechowywania nasion na zawartość hormonów podczas kiełkowania. Otrzymane rezultaty (Rakowski 2001) wskazują, że efekty oddziaływania silnego mrozu na nasiona świerka mogą przejawiać się nie tylko w zmianie płynności plazmalemy, lecz także w zmianie równowagi hormonalnej. Zaobserwowano bowiem, że przechowane w temperaturze -75 °C nasiona świerka, charakteryzujące się zwiększoną płynnością frakcji plazmalemmowej (Rakowski i in. 1998), podczas kiełkowania miały również wyraźnie podwyższoną zawartość wolnej frakcji kwasu abscysynowego (Rakowski 2001).

Stwierdzono zatem, że zarówno oddziaływanie gazowego fluorowodoru, jak i niskich temperatur powoduje prawdopodobnie zmiany aklimacyjne związane z przebudową składu lipidów plazmalemmowych prowadzącą do stabilizacji struktury i funkcji tej membrany. Obserwowane zmiany mogą mieć zatem charakter bardziej uniwersalny, chociaż następowały w różny sposób – zależnie od zastosowanego czynnika stresowego. W wypadku oddziaływania gazowego fluorowodoru zaobserwowano zwiększenie wypływu elektrolitu z igieł. Przejściowy charakter tego zjawiska wskazuje, że aklimacja może zachodzić na drodze przebudowy składu lipidów plazmalemmowych, tzn. podwyższenia zawartości steroli oraz, w wypadku roślin aktywnie rosnących, podwyższenia zawartości frakcji nasyconej kwasów tłuszczowych związanej ze zwiększeniem poziomu kwasu

oleinowego (18:1). Takie przemiany, typowe także dla aklimacji roślin do wysokich temperatur (Leshem i in. 1992), były obserwowane w membranach chloroplastów igieł świerka pospolitego traktowanych ozonem (Wolfender i Wellburn 1991). Tego typu zmiany, prowadzące jednocześnie do zmniejszenia płynności membran, mogą zabezpieczać je przed rozpadem.

Podwyższenie płynności plazmalemy po zastosowaniu niskich temperatur wskazuje, że w wypadku tego szkodliwego czynnika, aklimacja siewek mogła być związana ze wzrostem poziomu nienasyconych kwasów tłuszczowych w tej frakcji membranowej. Na występowanie takiego właśnie mechanizmu wskazują wyniki badań Sato i Murata (1981). Jednocześnie analiza aktywności plazmalemmowej ATPazy wskazuje, że zastosowane czynniki szkodliwe w różny sposób oddziałują na plazmalemmę badanych roślin. Zastosowanie niskich temperatur nie przejawiało się zmianami aktywności plazmalemmowej ATPazy (Rakowski i in. 1998), podczas gdy oddziaływanie gazowego fluorowodoru spowodowało wahania aktywności tego enzymu (Rakowski i in. 1995). Te różnice w aktywności ATPazy wykazują, że omawiane czynniki szkodliwe oddziałują z różnym natężeniem i wywołują różne reakcje roślin. Należy przy tym zaznaczyć, że w trakcie przeprowadzonych doświadczeń nie zaobserwowano wyraźnych symptomów destrukcji czy też uszkodzeń nieodwracalnych. Nawet wpływ elektrolitu z igieł roślin poddanych oddziaływaniu gazowego fluorowodoru pozostawał na podobnym poziomie podczas całego doświadczenia (Rakowski i Zwiazek 1992). Obserwowane zmiany były zatem odwracalne i obejmowały aklimację roślin do warunków szkodliwych.

Dotychczasowe wyniki wskazują na potrzebę kontynuacji badań nad mechanizmami odporności i aklimacji drzew, zwłaszcza w celu określenia możliwości wyselekcjonowania genotypów charakteryzujących się zwiększoną odpornością na oddziaływanie czynników szkodliwych, identyfikacji genów związanych z występowaniem tej odporności oraz możliwości jej zaindukowania i zachowania w następnych pokoleniach. W dalszej perspektywie wskazane jest przeprowadzenie badań nad wyhodowaniem bardziej odpornych sadzonek z przeznaczeniem do zalesienia terenów zdegradowanych o zwiększonym nasileniu oddziaływania czynników szkodliwych (np. niskie i wysokie temperatury, susza, zasolenie oraz zanieczyszczenia wody, powietrza i gleby), na których odnowienie lasu tradycyjnymi metodami nie jest w pełni skuteczne.

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BASES OF TREES RESPOND TO ENVIRONMENTAL STRESS. PART II. EFFECT OF HYDROGEN FLUORIDE AND LOW TEMPERATURE

Summary

Destruction of natural habitats and decline of forest tree populations attributable to air pollution and climate changes, rise the issue of forest genetic resources conservation and biological diversity protection.

Fluoride is a common air pollutant released during various industrial operations such as those producing steel, aluminium, ceramics and phosphate fertilizers. Fluoride is highly phytotoxic and it has been believed that plant injury occurs when a certain threshold tissue level is reached. The mechanism of fluoride action on plants is a complex one and involves numerous secondary changes which are difficult to separate from direct initial effects. Changes in membrane leakiness, plasma membrane ATPase activity and its lipid composition may be among the primary, hidden effects of fluoride injury.

Scientific evidence provides strong support for biophysical mediation of membranes in the development of chilling and freezing injury as well as cold acclimation. Several research results suggest that cold treatment can induce acclimation processes involved changes in hormones level and increased plasma membrane fluidity caused probably by altered lipid composition.

LITERATURA

- Ahuja M. R. 1986: Storage of forest tree germplasm in liquid nitrogen (-196 °C). *Silvae Gen.*, 35: 5-6.
- Anderson R. L., Minton K. W., Li C. G., Hahnig M. 1981: Temperature induced homeoviscous adaptation of Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 641: 334-348.
- Bytnerowicz A., Dmuchowski W., Molski B. 1983: Fluoride content of Scots pine needles in the presence of long term low fluoride air pollution. Influence of forest site, time of sample collection, tree's age and needle's age. *Rocz. Dendrol.*, 35: 9-14.
- Chen H. H., Li P. H., Brenner M. L. 1983: Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.*, 71: 362-365.
- Giannini J. L., Pushnik J. C., Briskin D. P., Miller G. W. 1987: Fluoride effects on plasma membrane ATPase of sugarbeet. *Plant Science*, 53: 39-44.
- Grandmougin A., Benveniste P., Hartman M. A. 1989: Plasma membrane-bound H⁺-ATPase from maize roots cells: effects of sterols. [W:] *Plant membrane transport: the current position.* (eds: J. Dainty, M. I. DeMichels, E. Marre and F. Rasi-Caldogno). Elsevier, Amsterdam: 111-114.
- Guderian R. 1977: *Air pollution: phytotoxicity of acidic gases and its significance in air pollution control.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Guy C. L. 1990: Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 187-223.
- Guy C., Haskell D., Nevel L., Klein P., Smerser C. 1992: Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, 188: 265-270.
- Hill A. C. 1969: Air quality standards for fluoride vegetation effects. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 19: 331-336.
- Hon W. C., Griffith M., Chong P., Yang D. C. 1994: Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant physiol.*, 104: 971-980.

- Horvath I., Klasova A., Navara J. 1978: Some physiological and ultrastructural changes of *Vicia faba* L. after fumigation with hydrogen fluoride. *Fluoride*, 11: 89-99.
- Hotsubo K., Kawamura Y., Takazewa D., Arakawa K., Yoshida S. 1997: Characterisation of vacuolar H⁺-ATPases that are sensitive and tolerant to cold. [W:] *Plant Cold Hardiness. Molecular biology, biochemistry and Physiology* (eds: P. H. Li and T. H. H. Chen). Plenum Press. New York and London, 237-244.
- Jian L.-C., Sun L.-H., Dong H.-Z. 1982: Adaptative changes in ATPase activity in the cells of winter wheat seedlings during cold hardening. *Plant Physiol.*, 70: 127-131.
- Jorgensen J. 1990: Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. *J. Plant Physiol.*, 136: 373-376.
- Kamiński E. 1987: Zasiarczenie atmosfery jako najpoważniejszy czynnik zamierania lasów i perspektywy jego ograniczenia. *Mat. II Krajowego Sympozjum: Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe. Kórnik, 16–19 maja 1984*, 61-70.
- Kasamo K. 1988: Response of tonoplast and plasma membrane ATPases in chilling-sensitive and insensitive rice (*Oryza sativa* L.) culture cells to low temperature. *Plant Cell Physiol.*, 29: 1085-1095.
- Koster K. L., Lynch D. V. 1992: Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol.*, 98: 108-113.
- Lahr J. 1997: Ecotoxicology of Organisms Adapted to Life in Temporary Freshwater Ponds in Arid and Semi-Arid Regions. *Arch. Envir. Contam. Tox.*, 32: 50-57.
- Lang V., Mantyla E., Welin B., Sundberg B., Palva E. T. 1994: Alterations in water status, endogenous abscisic acid induce common polipeptides in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 104: 1341-1349.
- Leshem Y. Y., Shewfelt R. L., Willmer R. L., Pantoja O. 1992: Plant membranes. A biophysical approach to structure, development and senescence. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/ London.
- Levitt J. 1980: Stress terminology. [W:] *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* (eds: N. C. Turner and P. J. Kramer). Wiley, New York, 437-443.
- Lorenc-Plucińska C., Oleksyn J. 1982: Effect of HF on the photosynthesis, photorespiration and dark respiration in Scotch pine. *Fluoride*, 15(3): 149-156.
- Maclean D. C., Schneider R. E., Weinstein L. H. 1986: Responses of five species of conifers to sulphur dioxide and hydrogen fluoride during winter dormancy. *Environ. Exp. Botany*, 26: 291-296.
- McCune D. C., Weinstein L. H., Jacobson J. S., Hitchcock A. E. 1964: Some effects of atmospheric fluoride on plant (*Milo maize, Phaseolus vulgaris*) metabolism. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 14: 465-468.
- Miller J. E., Miller G. W. 1974: Effect of fluoride on mitochondrial activity in higher plants. *Physiol. Plant.*, 32: 115-121.
- Minchin A., Simon E. W. 1973: Chilling injury in cucumber leaves in relation to temperature. *J. Exp. Bot.*, 24(83): 1231-1235.
- Miquel M., James D., Dooner H., Browse J. 1993: *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 6208-6212.
- Mohapatra S. S., Wolfrain L., Poole R. J., Dhindsa R. S. 1989: *Plant Physiol.*, 89: 375.
- Palta J. P., Weiss L. S. 1993: Ice formation and freezing injury: An overview on the survival mechanisms and molecular aspects of injury and cold acclimation in herbaceous plants. [W:] *Advances in Plant Cold Hardiness*. (eds: Li P. H. and Christersson L.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA, 143-176.
- Palva E. T. 1994: Gene expression under low temperature stress. [W:] *Stress Induced Gene Expression in Plants* (ed.: A. S. Basra). Hardwood academic Publishers, New York, 103-130.
- Perras M., Sarham F. 1984: Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides. *Physiol. Plant.*, 60: 129-132.
- Pooavaiah B. W., Wiebe H. H. 1973: Influence of hydrogen fluoride fumigation on water economy of soybean plants. *Plant Physiol.*, 51: 396-399.

- Rakowski K. J. 1997a: Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition and ATPase activity in needles of white pine (*Pinus strobus*) seedlings pretreated with 12 h photoperiod. *Trees: Structure and Function*, 11: 248-253.
- Rakowski K. J. 1997b: Hydrogen fluoride effects on plasma membranes sterol and phospholipid composition in needles of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) seedlings pretreated with different photoperiod conditions. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2: 161-173.
- Rakowski K. J. 2001: Hormonal level and viability of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) seeds germinating after treatment with different storage temperatures. *Plant Genet. Resour. Newslet.*, 128: 21-25.
- Rakowski K. J., Behzadipour M., Ratajczak R., Kluge M. 1998: Effect of seed freezing and storage conditions on plasma membrane properties of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) seedlings. *Botanica Acta*, 11: 236-240.
- Rakowski K. J., Zwiazek J. J. 1992: Early effects of hydrogen fluoride on water relations, photosynthesis and membrane integrity in eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. *Environ. Exp. Botany*, 32(4): 377-382.
- Rakowski K. J., Zwiazek J. J., Sumner M. J. 1995: Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition, ATPase activity and cell structure in needles of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. *Trees: Structure and Function*, 9: 190-194.
- Ristic Z., Ashworth E. N. 1993: Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*, 172: 111-123.
- Ryu S. B., Li P. H. 1994: Potato cold hardiness development and abscisic acid. II. De novo protein synthesis is required for the increase in free abscisic acid during potato (*Solanum commersonii*) cold acclimation. *Physiol. Plant.*, 90: 21-26.
- Sakai A., Larcher W. 1987: *Frost Survival of Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- Sandstrom R. P., Cleland R. E. 1989: Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes. Lack of short-term change in response to auxin. *Plant Physiol.*, 90: 1207-1213.
- Sato N., Murata N. 1981: Studies on the temperature shift-induced desaturation of fatty acid in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-alga (*Cyanobacterium*), *Anabaena variabilis*. *Plant Cell Physiol.*, 22: 1043-1050.
- Saxe H. 1990: Air pollution, primary plant physiological responses, and diagnostic tools. Ph.D. thesis – Department of Plant Physiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Thorvaldsesvej 40, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark.
- Scholz F. 1981: Genecological aspects air pollution effects on northern forests. *Silva Fen.*, 15: 384-391.
- Scholz F., Venne H. 1989: Structure and first results of a research program on ecological genetics of air pollution effects in Norway spruce. [W:] *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations* (eds: Scholz F., Gregorius H.-R., Rudin D.) Proc. of the Joint Meeting of the IUFRO Working Parties held in Großhansdorf, August 3-7, 1987.
- Shewfelt R. L. 1992: Response of plant membranes to chilling and freezing. [W:] *Plant Membranes. A biophysical approach to structure, development and senescence* (ed.: Y. Y. Leshem). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 193-219.
- Shinitzky M. 1984: Membrane fluidity and cellular functions. [W:] *Physiology of membrane fluidity*. (ed.: M. Shinitzky). CRC Press, Inc., Boca Raton, Vol. 1, 1-51.
- Sinclair W. A. 1969: Polluted air: Potent new selective force in forests. *J. Forestry* 69: 923-931.
- Soikkeli S., Karenlampi L. 1984: Cellular and ultrastructural effects. [W:] *Air Pollution and Plant Life* (ed.: M. Treshow). Wiley, Chichester, 159-174.
- Steponkus P. L. 1984: Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 543-584.
- Steponkus P. L., Uemura M., Balsamo R. A., Arvine T., Lynch D. V. 1988: Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 9026-9030.

- Steponkus P. L., Lynch D. V. 1989: Freeze-thaw-induced destabilisation of the plasma membrane and the effects on cold acclimation. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21: 21-41.
- Steponkus P. L., Uemura M., Webb M. S. 1993: A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat: two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. [W:] *Advances in Low Temperature Biology* (ed.: P. L. Steponkus). UK, JAI Press, London, 211-313.
- Treshow M., Anderson F. K. 1989: *Plant stress from air pollution*. John Wiley & Sons, Toronto.
- Troyanowsky C. 1985: *Air pollution and plants* (ed.: C. Troyanowsky). VCH, Weinheim, Germany, 3-9.
- Warburg O., Christian W. 1942: Isolierung und Kristallisation des Garungsferment enolase. *Biochem. Z.*, 310: 385-421.
- Weinstein L. H. 1977: Fluoride and plant life. *J. Occup. Med.*, 19: 49-78.
- Weiser C. J. 1970: Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 169: 1269-1278.
- Williams W. P. 1990: *Philos. Trans. R. Soc. London, B, Biol. Sci.*, 326: 555.
- Wolfender J., Wellburn A. R. 1991: Effects of summer ozone on membrane lipid composition in Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytol.*, 118: 323-330.
- Wright S. T. C. 1975: Seasonal changes in the levels of free and bound abscisic acid in blackcurrant (*Ribes nigrum*) buds and beech (*Fagus sylvatica*) buds. *J. Exp. Bot.*, 26(91): 161-174.
- Yoshida S. 1991: Chilling-induced inactivation and its recovery of tonoplast H⁺-ATPase in mung bean cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 95: 456-460.
- Yoshida S., Matsuura-Endo C., Etani S. 1989: Impairment of tonoplast H⁺-ATPase as a initial physiological response of cells to chilling in mung bean (*Virginia radiata* [L.] Wilczek). *Plant Physiol.*, 89: 634-642.
- Zimmermann F., Lux H., Maenhaut W., Matschullat J., Plessow K., Reuter F., Weinhaus O. 2003: A review of air pollution and atmospheric deposition dynamics in southern Saxony, Germany, Central Europe. *Atmos. Env.*, 37(5): 671-691.
- Zwiazek J. J., Shay J. M. 1987: Fluoride- and drought-induced structural alternations of mesophyll and guard cells in cotyledons of jack pine (*Pinus banksiana*). *Can. J. Bot.*, 65: 2310-2317.
- Zwiazek J. J., Shay J. M. 1988: The effects of sodium fluoride on cytoplasmic leakage and the lipid and fatty acid composition of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Can. J. Bot.*, 66: 535-541.