Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
w Lublinie

ACTA AGROPHYSICA

75

Riccardo Paolo Bennicelli

INDUKCJA SYSTEMU OBRONNEGO U PSZENICY I PSZENŻYTA W WARUNKACH STRESU TLENOWEGO

Monografia

Lublin 2002

Komitet Redakcyjny

Redaktor Naczelny - prof. dr hab. Jan Gliński, czł. rzecz. PAN

Z-cy Redaktora Naczelnego:
prof. dr hab. Ryszard T. Walczak, czł. koresp. PAN - fizyka środowiska
prof. dr hab. Bogusław Szot - fizyka materiałów roślinnych
prof. dr hab. Ryszard Dębicki - gleboznawstwo

Rada Redakcyjna

prof. dr hab. J. Haman, czł. rzecz. PAN - przewodniczący

prof. dr hab. T. Brandyk
prof. dr hab. I. Dechnik
prof. dr hab. D. Drozd
prof. dr hab. F. Dubert
prof. dr hab. J. Fornal
prof. dr hab. E. Kamiński
prof. dr hab. A. Kędziora
prof. dr hab. T. Kęsik
prof. dr hab. Cz. Koźmiński
prof. dr hab. J. Laskowski
prof. dr hab. P.P. Lewicki
prof. dr hab. S. Nawrocki, czł. rzecz. PAN
prof. dr hab. E. Niedźwiecki
prof. dr hab. J. Sielewiesiuk
prof. dr hab. W. Stępniewski
prof. dr hab. Z. Ślipek
prof. dr hab. S. Zawadzki, czł. rzecz. PAN

Redaktor tomu

dr Riccardo Paolo Bennicelli

Opiniowali do druku

prof. dr hab. Emil Nalborczyk, czł. rzecz. PAN
prof. dr hab.Witold Stępniewski

Adres redakcji

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, P.O. Box 201
20-290 Lublin 27, tel. (0-81) 744-50-61, e-mail: editor@demeter.ipan.lublin.pl
http: //www.ipan.lublin.pl

Publikacja indeksowana przez
Polish Scientific Journals Contents - Life Sci. w sieci Internet
pod adresem http://www.psjc.icm.edu.pl

© Copyright by Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin 2002

Publikacja dofinansowana przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1234 - 4125

Wydanie I. Nakład 150 egz. Ark. wyd. 6,1
Skład komputerowy: Piotr Lewczyński
Druk: Zakład Usług Poligraficznych TEKST s.c., ul. Wspólna 19, 20-344 Lublin

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY 5
1. WPROWADZENIE 7
2. ROLA TLENU W PROCESACH GLEBOWYCH 9
2.1. Dynamika fazy gazowej w glebie 9
2.2. Makro- i mikrodyfuzja gazów w glebie 10
2.3. Ocena stanu natlenienia gleby 15
2.3.1. Porowatość powietrzna (Eg) 15
2.3.2. Mikrodyfuzja tlenu (ODR) 15
2.3.3. Potencjał oksydoredukcyjny (Eh) 16
3. TEORIA CZYNNIKÓW STRESOWYCH 16
3.1. Pojęcie stresu w roślinie 16
3.2. Fizjologia stresu tlenowego w roślinie 19
3.3. Zmiany struktury tkanek roślinnych wywołane przez anoksję 23
3.4. Zmiany metaboliczne wywołane niedoborem tlenu 24
3.5. Reakcja na stres - rola reaktywnych form tlenu 26
3.6. Zaburzenia w reakcjach oksydoredukcyjnych 27
3.7. Funkcja i struktury membran komórkowych poddanych anoksji 28
4. ANOKSJA I EKSPRESJA GENÓW 28
5. SYSTEM ODBIORU I PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW OSTRZEGAJĄCYCH PRZED STRESEM TLENOWYM 29
5.1. Bezpośredni odbiór obecności tlenu 29
5.2. Cykl oksydoredukcyny żelaza i siarki 31
5.3. Przekształcanie O_2 w ponadtlenek przez oksydazy NAD(P)H 31
5.4. Inhibicja kompleksu IV (oksydazy cytochromowej c) w mitochondriach. 31
6. REAKTYWNE FORMY TLENU 31
7. PEROKSYDACJA LIPIDÓW 33
8. ANTYOKSYDACYJNY SYSTEM OBRONNY 34
8.1. Dysmutazy ponadtlenkowe 35
8.2. Katalaza 36
9. ZWIĄZKI OKSYDOREDUKCYJNIE CZYNNE 36
9.1. Kwas askorbinowy 36
9.2. Glutation 38
9.3. Związki fenolowe 40
9.4. Tokoferole 40
9.5. Karotenoidy 41

10. CEL PRACY 41
11. MATERIAŁY I METODY 43
12. PARAMETRY DOŚWIADCZEŃ 45
12.1. Porowatość powietrzna gleby (Eg) 45
12.2. Natężenie dyfuzji tlenu w glebie (ODR) 46
12.3. Potencjał oksydoredukcyjny gleby (Eh) 47
12.4. Opór dyfuzyjny (Rd) 48
12.5. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) 49
12.6. Reduktaza glutationowa (GR) 49
12.7. Dialdehyd malonowy (MDA) 50
12.8. Chlorofil a + b 50
12.9. Biomasa 50
13. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA 51
13.1. Zmienność parametrów glebowych w warunkach stresu tlenowego 51
13.1.1. ODR 51
13.1.2. Eh 52
13.2. Zmienność parametrów roślinnych w warunkach stresu tlenowego 53
13.2.1. Rd 53
13.2.2. Biomasa 55
13.2.3. Chlorofil a+ b 58
13.2.4. SOD 59
13.2.5. MDA 63
13.2.6. GR 65
14. PODSUMOWANIE 66
15. WNIOSKI 69
16. PIŚMIENNICTWO 70
17. STRESZCZENIE 78
18. SUMMARY 79

WYKAZ SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY

ABA - kwas abscysynowy
ACC - kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy
AEC - adenylowy ładunek energetyczny w komórce
ADH - dehydrogenaza alkoholowa
ATP - adenozynotrójfosforan
COC - krytyczne stężenie tlenu
DA - dehydrogenaza alkoholowa
DHA - kwas askorbinowy
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy
E_0 - porowatość całkowita gleby (objętość porów glebowych) [$m^3 \cdot m^{-3}$]
Eg - porowatość gazowa gleby (zawartość powietrza w glebie) [$m^3 \cdot m^{-3}$]
Eh - potencjał oksydoredukcyjny [mV]
d - gęstość objętościowa gleby
GMO -genetycznie zmodyfikowane organizmy
GR - reduktaza glutationowa
GSH - glutationy
GSSG - glutationy
LDH - dehydrogenaza mleczanowa
LP - peroksydacja lipidów
MDA - dialdheyd malonowy
NADP+ - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona)
NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)
NEK - nasycona elektroda kalomelowa
PAR - radiacja fotosyntetycznie czynna (400~700nm)
Rd - opór dyfuzyjny liści [$s \cdot cm^{-1}$]
RFT- reaktywne formy tlenu
ρ - gęstość fazy stałej gleby [$Mg \cdot m^{-3}$]
SOD - dysmutaza ponadtlenkowa
TBA - kwas tiobarbiturowy
TOH - tokoferole
W - wilgotność gleby w stosunku do masy gleby suchej [$kg\ kg^{-1}$]
Θ_v - objętościowa wilgotność gleby [$m^3 \cdot m^{-3}$]

1. WPROWADZENIE

Dyscyplina naukowa zwana Agrofizyką zajmuje się m. in. wpływem czynników i zjawisk fizycznych na procesy glebowe i ich oddziaływaniem na plonowanie roślin.

Proces kolonizowania siedlisk ma źródło w czynnikach abiotycznych takich jak: temperatura, intensywność światła, dostępność wody i składników pokarmowych oraz zanieczyszczeniach organicznych i nieorganicznych. Czynniki te oraz ich interakcje decydują bowiem o występowaniu i rozprzestrzenieniu się roślin. Wpływ czynników biotycznych (konkurencja, drapieżność) jest często uzależniony od tych samych parametrów [62, 77, 146].

W produkcji rolnej, nawet jeśli dąży się do jej optymalizacji, działanie stresów abiotycznych, będących wynikiem zmian fizycznych, chemicznych i fizykochemicznych środowiska jest ewidentne zarówno na poziomie jakościowym jak i ilościowym [50, 98, 103, 106].

Stresy wywołane przez zmiany temperatury, dostępność wody i składników pokarmowych oraz promieniowanie, odpowiedzialne są za obniżenie o ponad 50% potencjalnych plonów dziesięciu podstawowych upraw [83]. Ponadto, stres wywołany zanieczyszczeniem środowiska stale nabiera wagi z powodu wzrastającego poziomu zanieczyszczeń organicznych i metalami ciężkimi w glebach [135].

Podczas monitorowania poziomu ozonu w przyziemnej warstwie troposfery coraz częściej obserwuje się przekroczenie dopuszczalnych prawnie norm oraz obserwuje się spadek plonów, co wskazuje na poważne ograniczenie potencjalnych możliwości roślin. Również dziura ozonowa w stratosferze przyczynia się do obniżenia plonów w granicach 20%.

Jedynie 12,1 % powierzchni lądów nie ulega skutkom pogarszających się parametrów fizycznych. Jeśli chodzi o jakość plonów to czynniki fizyczne wywierają poważny wpływ zwłaszcza na owoce i ziarniaki [163].

Przebieg syntezy, akumulacji i gromadzenia białek jest przede wszystkim poddany wpływowi temperatury, wzrost roślin natomiast jest spowolniony niemalże przez wszystkie rodzaje stresów środowiskowych. Następuje wówczas ograniczenie, bądź modyfikowanie syntezy i gromadzenia polisacharydów, co wywołuje obniżenie biomasy i zmianę wartości odżywczej produktów. Obecność zanieczyszczeń nieorganicznych (takich jak metale ciężkie) może również być przyczyną zakłócenia odżywiania mineralnego i obniżenia wartości odżywczej

produktów lub, co gorsza, może prowadzić do tworzenia połączeń toksycznych i ich metabolitów.

Mówiąc bardziej ogólnie, zabiegi stosowane w celu podniesienia produktywności upraw i w celu złagodzenia konsekwencji stresów abiotycznych wprowadzają dodatki chemiczne i energetyczne, które często pogarszają stan środowiska (pestycydy, nawozy mineralne, wody irygacyjne itp.).

Wobec istniejącej niepewności, czy proces pogarszania się warunków klimatycznych naszej planety będzie trwał nadal, czy też obserwowany jest obecnie jedynie okres cyklicznej zmiany w meteorologii Ziemi, badania nad globalnym ociepleniem, w tym także nad wzrostem stężenia dwutlenku węgla, mogą być pomocne rolnictwu i rolnikom.

Faktycznie na niektórych obszarach, gdzie warunki fizyczne są już "warunkami granicznymi", dalsze ich pogorszenie mogłoby prowadzić do rezygnacji z rolniczego wykorzystania ziemi. Mimo to, ulepszanie materiału roślinnego w kierunku zwiększenia tolerancji na stres i ich zdolności adaptacyjnej, może być w tych warunkach nadzieją dla rolnictwa wobec ryzykownej przyszłości.

Lata '90 stanowiły kolejny przełom w badaniach nad stresem środowiskowym w celu rozwiązywania problemów istotnych dla rolnictwa dzięki, nigdy wcześniej nie stosowanej, ingerencji człowieka w rośliny na poziomie biochemicznym i molekularnym. Biotechnologia pozwala bowiem wyizolować geny, modyfikować i wstawiać je na nowo w roślinach transgenicznych (GMO) modyfikując przez to ich fenotyp. Obecnie badacze izolują geny, ekspresja których ma miejsce w okresie stresowym i starają się również określić i wyłonić te czynniki, które regulują ekspresję tychże genów [2, 4, 26, 54, 87, 106].

Możliwość wyizolowania genów i modyfikacja ich ekspresji daje więc sposobność do pogłębienia stanu wiedzy i zrozumienia zjawisk stresowych na poziomie podstawowym.

Hodowla roślin natomiast powinna zmierzać do zwiększenia tolerancji wobec poszczególnych abiotycznych czynników stresowych, szczególnie uwzględniając tolerancję fizjologiczną (tj. syntezę białek stresowych, optimum enzymów, akumulację roztworów i związków) bardziej niż morfologiczno-anatomiczną Zwiększona zdolność adaptacyjna roślin bowiem pozwoliłaby im przetrwać okresy stresowe panujące w danym środowisku.

Wśród licznych możliwych stresów abiotycznych nadal stosunkowo mało poznany jest stres tlenowy, wynikający z ograniczonej dyfuzji tlenu z atmosfery do gleby i poprzez rizosferę do organizmu roślinnego.

Niniejsza praca dotyczy wpływu stanu natlenienia gleby (od pełnego natlenienia - normoksja do warunków stresowych – anoksja) na indukcję systemu obronnego pszenicy i pszenżyta (w juwenilnej fazie ich rozwoju) charakteryzowanego aktywnością enzymów obronnych (dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationowej) i stężeniem aldehydu dwumalonowego, będącego produktem destrukcji błon komórkowych.

Intensywność stresu tlenowego określano w glebie wartością potencjału oksydoredukcyjnego, w roślinie zaś - oporem dyfuzyjnym aparatów szparkowych, poziomem barwników fotosyntetycznych oraz produkcją biomasy.

Praca stanowi wkład w poznanie funkcjonowania systemu korzeniowego roślin oraz w wyjaśnienie roli gazowego tlenu, mającego fundamentalne znaczenie w procesach fizycznych, chemicznych i biochemicznych, zachodzących w *continuum* gleba-roślina-atmosfera.

2. ROLA TLENU W PROCESACH GLEBOWYCH

2.1. Dynamika fazy gazowej w glebie

Skład powietrza glebowego ulega nieustannym zmianom, jest on bowiem efektem biologicznych i chemicznych procesów pochłaniania i wydzielania gazów zależnych od aktywności biologicznej mikroorganizmów glebowych i korzeni roślin jak też od procesów fizycznych transportu gazów w ośrodku glebowym.

Zawartość powietrza w profilu glebowym zmienia się dynamicznie, zależnie od wilgotności i zagęszczenia fazy stałej, która na ogół nie przekracza ona w glebach 0,4-0,5 m^3m^{-3}.

Podstawowe składniki powietrza glebowego (N_2, O_2, CO_2, H_2O_{para}) występują zarówno w fazie gazowej jak i ciekłej gleby a ich prężność w fazie gazowej zależy od temperatury i ciśnienia atmosferycznego (Tabela 1).

Ponadto wykazują one duże różnice rozpuszczalności w wodzie. Przy bardzo małych współczynnikach rozpuszczalności azotu i tlenu niemal całość tych gazów występuje w fazie gazowej, natomiast zawartość dwutlenku węgla praktycznie nie ulega znacznym zmianom w szerokim zakresie porowatości powietrznej.

W porównaniu z powietrzem atmosferycznym, w powietrzu glebowym występuje mniej tlenu (0- 0,21 m^3 m^{-3}) i zdecydowanie więcej dwutlenku węgla (od 0,001 m^3 m^{-3} do 0,1 m^3 m^{-3} a niekiedy nawet więcej). Natomiast zawartość azotu zmienia się w granicach kilku procent, co na ogół jest wynikiem zmian

udziału tlenu i dwutlenku węgla w całkowitej objętości gazów. Aktywne pobieranie azotu przez *Rhizobia* może wywołać dostrzegalny jego ubytek tylko lokalnie.

Tabela 1. Właściwości gazów, będących składnikami powietrza glebowego
Table 1. Properties of the soil-air components

Składnik	Średnia droga swobodna $x10^{-8}$[m] przy 101,3 kPa[a]	V_m [dm^3] NTP[b]	Gęstość [kg m^{-3}] NTP[b]	Rozpuszczalność w wodzie, α_B, w temperaturze [°C]		Współczynnik dyfuzji	
				0[b]	20[b]	w powietrzu, D_0, $x10^{-5}$ [m^2s^{-1}] NTP[b]	w wodzie, D_W, $x10^{-9}$ [m^2s^{-1}] t=25°C, NP[b]
N_2	8,50	22,40	1,251	0,0235	-	1,81	1,90
O_2	9,05	22,39	1,429	0,489	0,0333	1,78	2,50
CO_2	5,56	22,26	1,977	1,713	0,942	1,39	1,96
CH_4	-	22,36	0,717	0,0556	0,0331	-	-
NH_3	5,92	22,08	0,771	1110,0	-	1,98	2,00
H_2S	-	22,14	1,539	4,670	2,582	-	-
N_2O	-	22,25	1,978	-	0,629	1,43	-
H_2	-	22,43	0,080	0,0215	-	6,34	5,85
H_2O (para)	-	23,45	0,768	-	-	2,82	-
C_2H_4	-	22,24	1,261	0,226	0,122	1,37	-
Ar	-	22,39	1,784	-	-	-	-

[a] NTP = warunki normalne, ciśnienie 101,3 kPa, temp. 0°C.
[b] Np. = ciśnienie normalne, 1010,3 kPa, V_m – objętość molarna.

Właściwości poszczególnych gazów, występujących w powietrzu glebowym oraz ich parametry fizyczne jak: objętość molowa, gęstość objętościowa, rozpuszczalność w wodzie jak również współczynniki dyfuzji w powietrzu i wodzie decydują o ich migracji i podziale pomiędzy poszczególne fazy ośrodka glebowego.

2.2. Makro- i mikrodyfuzja gazów w glebie

Wymiana gazów w środowisku glebowym obejmuje :
1. Makrodyfuzję, obejmującą przepływ gazów pomiędzy glebą i atmosferą wywołaną gradientem stężenia,

2. Mikrodyfuzję, związaną z przemieszczaniem gazów do korzeni roślin, silnie ograniczoną istnieniem błonek wodnych na ich powierzchni, ze względu na bardzo niski współczynnik dyfuzji gazów w wodzie.

Wymiana gazów pomiędzy glebą a atmosferą wynosi od kilku do kilkudziesięciu Mg $ha^{-1}rok^{-1}$ i dotyczy głównie tlenu i dwutlenku węgla. Udział przepływu dyfuzyjnego i przepływu lepkiego, wywołanego grandientem ciśnienia może zmieniać się w dość szerokich granicach. Dla roślin lądowych podstawowe znaczenie ma jednakże przepływ dyfuzyjny gazów przez glebę, dla roślin wodnych - przepływ gazów przez roślinę (drogą tzw. transportu wewnętrznego) [67, 81].

W ośrodku porowatym jakim jest gleba, przepływ gazów wywołany gradientem ciśnienia może mieć charakter laminarny (bez zawirowań) bądź turbulencyjny (burzliwy).

Przepuszczalność powietrzna (k) przyjmuje w glebie wartości zawarte w przedziale od 0,01 do 500 10^{-12} m^2 i warunkowana jest porowatością powietrzną gleby, wyznaczaną przez: wilgotność, zagęszczenie i geometrię porów glebowych.

Przepływ lepki gazów w ośrodku porowatym, zachodzący pod wpływem gradientu ciśnienia, wahań temperatury i wilgotności gleby może być wywołany przez deszcze, zraszanie, parowanie, ruchy wody gruntowej czy wiatr.

Zmiany temperatury szczególnie dotyczą powierzchniowej warstwy gleby (0-20 cm) a zakres dobowych zmian występujących na tej głębokości na ogół nie przekracza 20°C. Przykładowo wahaniom temperatury w zakresie od 27 °C do 7°C (co odpowiada od 300 do 280K) towarzyszy, zgodnie z prawami gazowymi, zmniejszenie objętości o 7%. Takie więc znaczne obniżenie temperatury gleby powoduje wymianę gazową zaledwie do głębokości 1,4 cm (7% z 20 cm). Istnieje zatem przekonanie, że czynnik temperaturowy nie ma istotnego znaczenia w wymianie gazowej całego profilu glebowego [61].

Zmiany ciśnienia atmosferycznego w ciągu jednej doby na ogół nie przekraczają 4%, a więc takim samym zmianom będzie ulegało ciśnienie powietrza glebowego, co przy założeniu jednorodności ośrodka glebowego (jednakowa porowatość i ograniczenie np. na głębokości 1m warstwą nieprzepuszczalną taką jak lita skała bądź zalegająca woda gruntowa) spowoduje wymianę gazową zaledwie do głębokości 4cm (4% ze 100 cm). Zasięg strefy napowietrzania pod wpływem wahań ciśnienia atmosferycznego zależy od miąższości ośrodka i w glebach, gdzie do głębokości kilku metrów nie występuje

bariera w postaci wody gruntowej bądź litej skały (np. wytworzone z lessu), może być znacznie głębszy i dochodzić do kilkudziesięciu centymetrów.

Woda opadowa wsiąkając w glebę wypiera z porów glebowych powietrze, równocześnie wprowadzając niewielką ilość rozpuszczonego w niej tlenu (ok. 30 razy mniej niż zawiera w tej samej objętości powietrze w temp. 20°C). Odparowanie wody z gleby na odwrót powoduje wypełnienie porów glebowych powietrzem atmosferycznym a 1 cm ubytek wody, zależnie od porowatości gleby wynoszącej np. 0,1 czy 0,3 m^3 m^{-3} spowoduje wymianę powietrza na głębokości odpowiednio 1 cm i 3 cm. Straty wody wskutek parowania, przypadające na jedną dobę, wynoszą około 0,4 cm we Francji, 0,7 cm na południu USA i aż 0,9 cm np. w Egipcie. Odpowiednie zmiany głębokości napowietrzania gleby, wynikające z wielkości parowania, mogą osiągać wartość 4 cm we Francji, 7 cm w południowych rejonach USA i sięgać do 9 cm w Egipcie, przy założeniu jednakowej porowatości powietrznej, wynoszącej 0,1 m^3 m^{-3} .

Stosowane zaś zabiegi melioracyjne, prowadzące do obniżenia poziomu wód gruntowych nawet o kilkanaście cm, istotnie przyczyniają się do napowietrzenia profilu glebowego przez zasysanie powietrza atmosferycznego.

Udział wiatrów w wymianie gazowej jest niewielki i dotyczy w sposób pośredni powierzchniowej warstwy gleby.

Przepływ dyfuzyjny ma na ogół znacznie większy udział w przepływie gazów niż przepływ lepki i wywołany jest gradientem stężeń zaistniałym pomiędzy powietrzem glebowym i atmosferycznym. Jest to ciągły proces powodujący ruch gazów w kierunku niższego stężenia i często nazywany jest dyfuzją stężeniową.

Dyfuzyjny przepływ (f_x) przedstawiający przepływ dowolnego czynnika przez jednostkową powierzchnię w jednostce czasu proporcjonalny jest do gradientu stężenia dc/dx oraz do współczynnika dyfuzji D. Zależność tę opisuje tzw. I równanie Ficka w postaci:

$$f_x = -D\,(dC/dx)$$

gdzie: C – oznacza stężenie odniesione do jednostki objętości powietrza glebowego, D – efektywny współczynnik dyfuzji odniesiony do całej masy gleby.

Często właściwości dyfuzyjne gleby charakteryzujemy przy pomocy względnego współczynnika dyfuzji D_G, będącego ilorazem współczynnika dyfuzji w glebie (D) i współczynnika dyfuzji w powietrzu (D_0):

$$D_G = D/\,D_0$$

W przypadku zastąpienia gradientu stężenia tlenu gradientem ciśnienia parcjalnego, współczynnik charakteryzujący ośrodek nosi nazwę stałej dyfuzji i oznaczany jest literą K. Stałą dyfuzji w powietrzu K_o przedstawia równanie:

$$K_o = \alpha_a D_o,$$

a w wodzie:

$$K_w = \alpha_w D_w,$$

gdzie: D_o i D_w oznaczają współczynniki dyfuzji danego gazu w powietrzu i wodzie, zaś α_a i α_w są współczynnikami „rozpuszczalności" gazu w powietrzu i wodzie.

Dyfuzja gazu w wodzie zależy od gradientu ciśnienia parcjalnego i przebiega $\alpha D_w/D_o$ razy wolniej niż w powietrzu. Porównanie tych wartości wskazuje, że dyfuzja w wodzie np. tlenu przebiega około 300 000 razy a dwutlenku węgla 10 000 razy wolniej niż w powietrzu (odniesione do temp. 20°C).

Współczynnik dyfuzji gazów w glebie stanowi ułamek współczynnika dyfuzji gazów w atmosferze, gdyż zależy on od ilości porów wypełnionych powietrzem, od ich ciągłości i krętości. Zależy również od rodzaju gazu oraz panującego ciśnienia i temperatury. Wartość względnego współczynnika dyfuzji gazów, będącego ilorazem D/D_o (przy danym ciśnieniu i temperaturze) jest wartością bardziej uniwersalną, ponieważ niezależną od rodzaju dyfundującego gazu, temperatury i ciśnienia.

W glebie może zaistnieć dyfuzja w porach wypełnionych powietrzem bądź wodą a zależnie od wilgotności proces ten może obejmować glebę suchą lub w stanie całkowitego wysycenia. Głębokość natlenienia może wynosić zaledwie kilka cm w glebach nasyconych wodą, które pozostają w kontakcie z powietrzem atmosferycznym lub też od 10 do 1000 cm w glebach suchych.

Mikrodyfuzja tlenu do korzeni roślin ograniczona jest istnieniem cienkiej warstwy wodnej, pokrywającej ich powierzchnię, którą charakteryzuje współczynnik dyfuzji 300 000 razy mniejszy niż w powietrzu i która stanowi zasadniczą przeszkodę w transporcie gazów. Znaczenie nie tyle stężenia tlenu w strefie korzeniowej roślin co jego dostępność i pobieranie przez korzenie zauważył Hutchins [cyt. za 61] już w 1926 roku. Dopiero jednak w 1952 roku Lemon i Erickson [95] skonstruowali elektrodę umożliwiającą pomiar ilościowy natężenia przepływu tlenu do powierzchni spolaryzowanej elektrody platynowej, która miała symulować pobieranie tlenu przez korzeń.

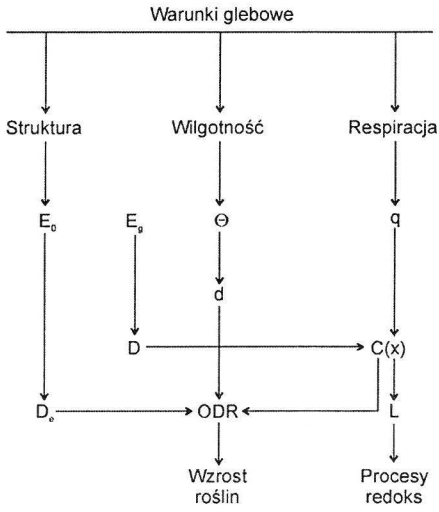
Jednostkowy dopływ tlenu do elektrody (f_r) nosi potoczną nazwę wydatku dyfuzji tlenu i oznaczany jest symbolem ODR (od Oxygen Diffusion Rate). Pomiar natężenia prądu, odpowiedniego do redukcji tlenu na spolaryzowanej elektrodzie platynowej zależny jest od prędkości dyfuzji tlenu z otaczającego elektrodę ośrodka do powierzchni elektrody, który opisany jest równaniem:

$$ODR = M\ i/n\ F\ A$$

gdzie: M – ciężar cząsteczkowy tlenu (32 g mol^{-1}), i – natężenie dyfuzji tlenu, n – ilość równoważników na mol tlenu (= 4), F – stała Faraday'a (= 96 500 kulombów/równoważnik), A – powierzchnia elektrody (m^2). Podstawienie wartości stałych prowadzi do następującej postaci tego równania:

$$ODR\ [\mu g\ m^{-2}\ s^{-1}] = 8{,}29\ 10^{-5}\ i\ [\mu A]/A\ [m^2]$$

Powiązanie parametru ODR z warunkami glebowymi takimi jak: struktura, wilgotność i respiracja przedstawia Rys. 1.



Rys. 1. Czynniki glebowe wpływające na dostępność tlenu dla korzeni roślin i ich wzajemne powiązania. Eg - porowatość powietrzna; D - współczynnik dyfuzji gazów w glebie; C(x) - zawartość tlenu w powietrzu glebowym; L - głębokość natlenienia; d - efektywna grubość błonki wodnej wokół korzenia; De - efektywny współczynnik dyfuzji w błonce wodnej wokół korzenia [wg. 82].

Fig. 1. Soil parameters affecting oxygen availability to roots and their interrelationships. Eg - air-filled porosity; D - diffusion coefficient of gases in soil; C(x) - oxygen content in soil air; L - depth of oxygenation; d - thickness of water film around the roots; De - diffusion coefficient of gases in the water film around the root [82].

Wartości ODR w glebie zawierają się w przedziale od 0 $\mu g\ m^{-2}\ s^{-1}$ (przy dużej wilgotności gleby i znacznym zagęszczeniu) do 200 $\mu g\ m^{-2}\ s^{-1}$ (w glebach o wysokiej porowatości powietrznej i umiarkowanej wilgotności).

2.3. Ocena stanu natlenienia gleby

Przebieg wielu procesów glebowych (reakcje utlenienia i redukcji składników mineralnych gleby oraz ich trwałość [49, 58, 61, 112, 121, 136, 140], pobieranie aktywne jonów przez korzenie roślin [116, 117, 138, 139, 144, 161, 164], rozwój odpowiednich grup mikroorganizmów i ich czynności enzymatyczne [29, 114] warunkowany jest stanem natlenienia gleby, który oceniać można drogą pomiarów:

- bezpośrednich związanych z oznaczeniem składu powietrza glebowego, makro- oraz mikrodyfuzji tlenu, porowatości i przepuszczalności powietrznej;
- pośrednich obejmujących pomiary efektów wywołanych brakiem czy dostępnością tlenu jak potencjał oksydoredukcyjny, aktywność enzymów z grupy oksydoreduktaz, aktywność respiracyjna gleby, obecność Fe^{+2} w oglejonych glebach, symptomy roślinne (epinastia, żółknięcie liści, płytkie korzenienie) oraz zmiany w składzie chemicznym roślin.

2.3.1. Porowatość powietrzna (Eg)

Przestrzeń w glebie, wypełniająca tę objętość, która nie jest zajęta przez fazę stałą bądź ciekłą, nazywana jest porowatością powietrzną (E_g). Jest ona różnicą porowatości całkowitej gleby i aktualną wilgotnością wyrażoną objętościowo (θ):

$$E_g = E_o - \theta = E_o - \rho W,$$

gdzie: ρ - gęstość gleby w $Mg\ m^{-3}$, W- wilgotność gleby wyrażona wagowo w $kg\ kg^{-1}$.

Jak wynika z wcześniejszych badań zawartość powietrza glebowego powyżej 0,25 m^3m^{-3} jest wystarczająca dla zapewnienia dobrej aeracji. Zakres 0,1-0,25 m^3m^{-3} wskazuje na ograniczone natlenienie w pewnych warunkach temperaturowych w strefie korzeniowej, podczas gdy wartości poniżej 0,1 m^3m^{-3} odnoszą się do zdecydowanie niedostatecznego natlenienia gleby [145].

2.3.2. Mikrodyfuzja tlenu (ODR)

Dla określenia dostępności tlenu w glebie w strefie korzeniowej najbardziej użytecznym jest wydatek dyfuzji tlenu (ODR). Wskaźnik ODR charakteryzuje

mikrodyfuzję tlenu do spolaryzowanej elektrody platynowej w glebie [95, 102].

W metodzie tej drut platynowy, jest modelem korzenia absorbującego tlen, a intensywność przepływu tlenu do elektrody spolaryzowanej wskazuje na maksymalną ilość tlenu, która może być dostępna dla korzeni umieszczonych w tym samym ośrodku co spolaryzowana elektroda. Wartości ODR w glebie zmieniają się, przeważnie w zakresie od 0 do 200 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$. Obniżają się one wraz ze wzrostem zagęszczenia i uwilgotnienia gleby, a rosną w miarę wzrostu porowatości powietrznej gleby i stężenia tlenu w powietrzu glebowym [144].

2.3.3. Potencjał oksydoredukcyjny (Eh)

Potencjał oksydoredukcyjny jest jednym z najważniejszych wskaźników charakteryzujących stan aeracji gleby, szczególnie przydatnym w warunkach nadmiernego uwilgotnienia, w zakresie niskich stężeń tlenu lub po jego zaniku, kiedy inne wskaźniki, jak wydatek dyfuzji tlenu (ODR) przestają już być użyteczne [60]. Jest wskaźnikiem skutków niedotlenienia zaistniałych w ośrodku glebowym i pozostaje w bezpośrednim związku ze stężeniami form utlenionych i zredukowanych, obecnych w glebie [136, 137, 138, 142, 145, 164].

Niedotlenienie gleby, wywołuje wzmożoną działalność mikroorganizmów beztlenowych (bezwarunkowych i fakultatywnych), które zamiast tlenu wykorzystują w charakterze akceptorów elektronów, w pierwszej kolejności azotany a następnie tlenki manganu i żelaza [163]. Redukcji tych związków towarzyszy wzrost stężenia ich form na niższym stopniu utlenienia, wywołujących obniżenie potencjału redoks od wartości >500 mV, charakteryzujących gleby natlenione, nawet do wartości ujemnych (w skrajnym przypadku do -400 mV), przy których zachodzi fermentacja metanowa i redukcja siarczanów do siarczków. Tempo procesów redukcyjnych w glebie zależy od wielu czynników takich jak: temperatura, aktywność mikrobiologiczna, związana z obecnością łatwo rozkładanej materii organicznej, a także z buforowością redoks gleby, wynikającą z zawartości poszczególnych akceptorów elektronów.

3. TEORIA CZYNNIKÓW STRESOWYCH

3.1. Pojęcie stresu w roślinie

Środowisko, w którym żyją rośliny zawiera cały kompleks czynników klimatycznych, edaficznych oraz biotycznych, działających na organizm roślinny

lub na populację ekologiczną i decydujących o ich morfologii oraz zdolności przetrwania.

Badania nad fizjologią stresów środowiskowych przyciągają uwagę różnych badaczy roślin od przeszło 100 lat. Jest to zrozumiałe, bowiem badania te przez zakłócenia normalnej reakcji rośliny i wprowadzanie czynnika zaburzającego czyli stresującego (stres, od *stringere*) pozwalają na obserwowanie fundamentalnych procesów fizjologicznych, takich jak fotosynteza, wzrost i rozmnażanie się roślin.

W odpowiedzi na stres, roślina zmuszona jest do integrowania w nowy sposób różnych procesów na poziomie molekularnym, biochemicznym, komórkowym i wreszcie na poziomie całego organizmu.

Selye [129] określił stres jako "sumę wszystkich, swoistych zmian, wywołanych czynnością lub uszkodzeniami". W warunkach niekorzystnych dla danego organizmu, następuje w nim ogólna mobilizacja wobec skutków czynnika stresotwórczego, zwanego przez tego autora "stresorem".

W sytuacji stresu, zmienność parametrów środowiskowych (światło, ciepło, woda, potencjały elektryczne, gazy, pH, pierwiastki mineralne, substancje organiczne) jest na tyle znacząca dla organizmu roślinnego, że powoduje ona powstawanie siły, która zmusza roślinę do odpowiedzi poprzez oddawanie lub przyjmowanie energii bądź materii (Tabela 2).

Tabela 2. Parametry energii i masy w środowisku roślin wywierające na nie wpływ oraz potencjały stosowane do opisu ich poziomu [wg 126 - zmodyfikowane]

Table 2. Environmental energy and mass parameters affecting plants and their describing potentials [126 - modified].

		Potencjał	
Parametry	Jednostka	Miara	Jednostka
ENERGETYCZNE			
Energia promieniowania (w tym światło)	$J\ m^{-2}$	Iradiancja odnoszona do zdolności pochłaniającej pigmentów	$W\ m^{-2}$ $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$
Ciepło	$J\ kg^{-1}$	Temperatura	kelvin
MASY			
Gaz	Kg lub mol	Ciśnienie lub ciśnienie parcjalne	Pa ($N\ m^{-2}$)
CIECZE I ROZTWORY			
Woda	Kg; mol	Potencjał wodny	pascal
Roztwory wodne	Kg; mol	Potencjał chemiczny; stężenie	$mol\ m^{-3}$; $kg\ m^{-3}$
Jony wodorowe w wodzie	Kg; mol	pH	jednostki pH
Ciała stałe	Kg; mol	stężenie	kg; $mol\ m^{-3}$

Dla Levitta [96] stres w znaczeniu fizycznym oznacza nacisk (presję) na ciało stałe, powodujący uszkodzenia lub deformację odwracalną (elastyczną) lub nieodwracalną (plastyczną), a w sensie biologicznym oznacza "presję" czynników środowiskowych (zewnętrznych) działającą na komórkę (lub cały organizm), powodując zaburzenia przebiegu procesów życiowych, jak również deformację i nawet śmierć Autor ten klasyfikował ogólną strategię przetrwania stresu przez rośliny według dwóch kategorii: unikanie i tolerowanie, prowadzące ostatecznie do zmniejszania sił czynnika zaburzającego oraz do zwiększania odporności na dany stres. Według Salysbury'ego i Rossa [126] stresorem można nazwać każdy czynnik środowiska, który ogranicza procesy życiowe, czyli obniża ich intensywność poniżej potencjalnych możliwości, zdeterminowanych genetycznie. Czas trwania i natężenie stresu decydują o stopniu destabilizacji funkcji organizmu. W warunkach naturalnych najczęściej spotykamy się z interakcją kilku współzależnych stresów, np. wysokiej temperatury, deficytu wody lub zasolenia gleby [103, 135] (Tabela 3).

Tabela 3. Rodzaje stresów abiotycznych doświadczanych przez rośliny [wg. 134 zmodyfikowane]
Table 3. Some environmental abiotical stresses which can affect plants [134 - modified]

Rodzaj stresu	Wyraża się jako:	Przyczyna
Tlenowy	Nadmiar wody	Zawodnienie, zagęszczenie gleby
Wodny	Deficyt wody	Susza
Termiczny	Wzrost temperatury	Przegrzanie
	Spadek temperatury	Chłód, mróz
Chemiczny	Wysokie stężenie soli w roztworze	Zasolenie, nadmierne nawożenie
	Środki ochrony roślin	Użycie niezgodne z normami
	Toksyczność Al	
Zanieczyszczenie powietrza	Nadmierna emisja NO_x, SO_x; Obniżenie pH gleby	Zanieczyszczenie powietrza, kwaśne deszcze
	Stres oksydatywny	Wysokie stężenie O_3, wysokie stężenie CO_2
Fizyczny	Stres oksydatywny	Promieniowanie UV, IR, Światła widzialnego, pole magnetyczne

Skutki stresów mają charakter dynamiczny i następują wieloetapowo. W momencie pojawienia się stresora metabolizm rośliny wkracza w tzw.:

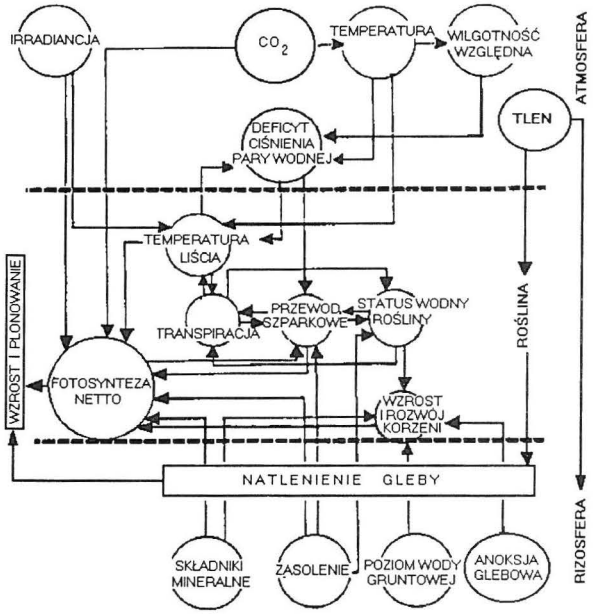
1. Fazę alarmu - kiedy dana funkcja życiowa odbiega znaczącą od normy, dalej w:

2. Fazę odporności – podczas której organizm dopasowuje się do stresora a funkcja życiowa powraca do normalnego stanu nie osiągając go, a następnie w:
3. Stadium wyczerpania – kiedy działania stresora nasila się lub przedłuża na tyle, że funkcja życiowa może coraz bardziej znacząco odbiegać od normy. Może to doprowadzić do zaburzenia funkcji i struktury, prowadząc do śmierci organizmu roślinnego.

Mechanizmy zwiększające odporność roślin na niekorzystne czynniki środowiska przekazywane dziedzicznie nazwane są adaptacją. Dotyczą one zarówno zmian strukturalnych, jak i procesów fizjologicznych i reakcji biochemicznych, mechanizmy zaś obniżające wrażliwość na niekorzystne warunki środowiska w czasie trwania ontogenezy (czyli nie dziedziczne) nazywane są aklimatyzacją

3.2. Fizjologia stresu tlenowego w roślinie

Wielość czynników środowiskowych mających wpływ na wzrost i plonowanie roślin wzajemnie oddziaływują wzajemnie tworząc bardzo złożony układ pozostający w wewnętrznej dynamicznej równowadze (Rys. 2.).



Rys. 2. Schemat czynników środowiskowych, decydujących o wzroście i plonowaniu roślin
Fig. 2. Schematic model of processes influencing growth and productivity of plants

Droga tlenu cząsteczkowego z atmosfery przez rizosferę do komórek korzeniowych oraz bodźce powodujące jego przemieszczanie się na poszczególnych etapach decydują o stanie natlenienia komórek i tkanek korzeni w czasie ontogenezy. Z atmosfery tlen dyfunduje poprzez pory glebowe oraz/lub poprzez tkanki rośliny do warstwy gleby a oddychanie korzeni, bakterii i mezofauny decyduje o jego aktualnej obecności w powietrzu glebowym i w konsekwencji o ilości tlenu rozpuszczonego w roztworze glebowym. W przypadku pobierania tlenu przez korzenie z gleby włośniki korzeniowe wprowadzają go do wewnątrz drogą apoplazmatyczną, transmembranową a następnie poprzez błonę plazmatyczną, plazmodezmę (drogą symplastu) do ksylemu. W sytuacji, gdy wymiana gazowa zachodzi głównie na drodze dyfuzji wewnętrznej poprzez tkanki rośliny (np. u ryżu), kierunek migracji tlenu w układzie korzeń – gleba ulega odwróceniu i to gleba jest natleniana poprzez korzenie roślin.

Zróżnicowanie roślin pod względem zdolności przetrwania w środowisku pozbawionym tlenu (głównie w skutek okresowego lub długotrwałego zalania gleby wodą) wynika z istnienia kilku mechanizmów adaptacji roślin do takich warunków.

Znany jest fakt, że rośliny mogą w pewnym zakresie adaptować się do zmienionych warunków środowiska: *drogą ewolucyjną* - wynikiem długoterminowej adaptacji (long-term adaptation); *drogą morfologiczną* - usprawniając transport wewnętrzny gazów w tkankach aerenchymatycznych np. CO_2 z korzeni do atmosfery i O_2 z atmosfery do korzeni, co powoduje detoksyfikację rizosfery oraz przez płytkie korzenienie się pozwalające na zachodzenie procesu dyfuzji tlenu z atmosfery do korzeni jak również *drogą biochemiczną* - poprzez zmniejszenie efektu Pasteura i usuwanie etanolu z tkanek roślin czy poprzez alternatywne szlaki metaboliczne (short-term adaptation).

Zawartość tlenu w powietrzu glebowym nie wyznacza w sposób jednoznaczny jego dostępności dla roślin, ponieważ pobór tlenu zależy od wielu czynników, takich jak temperatura, wilgotność, dostępność substratu organicznego w glebie, struktury gleby, a także od stanu pokrywy roślinnej i tempa jej wzrostu [18, 38, 61, 82]. Proces ten jest zależny od wilgotności gleby, zarówno poprzez jej wpływ na zmniejszenie ilości porów wypełnionych powietrzem, jak również poprzez zmianę grubości błonek wodnych na powierzchni korzeni. Stąd też nadmiernie uwilgotnienie, może powodować niedotlenienie korzeni roślin, wprowadzając roślinę w stan stresu tlenowego.

W warunkach hipoksji i anoksji glebowej wykazano akumulację w tkankach roślin toksycznych produktów, wynikających z zaburzeń metabolicznych [61]. Transport wody i jonów z korzeni do części nadziemnej jest zahamowany, co częściowo wiąże się ze spadkiem przewodnictwa hydraulicznego ksylemu. W części nadziemnej obserwuje się wówczas zahamowanie wzrostu i epinastię. Następują wówczas u roślin ogólnie zaburzenia hormonalne [158].

Z powyższych faktów wynika, że deficyt tlenu (czynnik stresowy) działa na system korzeniowy, a objawy uszkodzeń dotyczą całej rośliny [135].

Względna odporność poszczególnych gatunków i odmian roślin na zalanie gleby wodą nie jest zawsze jednakowa, gdyż zależy od takich czynników, jak temperatura gleby czy faza rozwojowa roślin. Niemniej jednak, wielu autorów próbowało porównywać różne rośliny w ustalonych warunkach eksperymentalnych.

Wśród roślin motylkowych wrażliwość na stres tlenowy jest różna. Ich odporność na pełne wysycenie gleby wodą, wynosi od 5 do 20 dni zalania, przy czym kolejność według malejącej odporności jest następująca: *Lotus corniculatus* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium fragiferum* L. > *Trifolium pratense* L., *Trifolium hybridum* L., *Medicago media* Pers. > *Melilotus alba* Desr., *Astrtagalus cicer* L. > *Onobrychis viciaefolia* Scop. [67].

Również trawy wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem odporności na zalanie gleby wodą. Przykładowo *Agrostis palustris* Huds., jest rośliną bardzo odporną, *Poa pratensis* L. i *Poa annua* L. są średnio odporne, natomiast *Festuca rubra* L. jest zupełnie nieodporna [12].

Rośliny takie jak: *Oryzae sativa* L., *Phaseolus radiatus* L., *Allium cepa* L., *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Daucus carota* L., *Glycine max* L. plasują się wśród odpornych i średnio odpornych (malejąco) na zalanie [147]. Wśród uprawnych zaliczane jako bardzo wrażliwe, są te rośliny, które już po okresie kilkudniowego zalania obumierają - np. *Pisum sativum* L. i *Nicotiana tabacum* L. [18].

W warunkach zalania gleby system korzeniowy jest organem najbardziej cierpiącym z powodu niedoboru tlenu. Ponieważ w warunkach naturalnych w glebie przelotna hipoksja poprzedza właściwą anoksję i ze względu na to, że istnieje coraz więcej dowodów świadczących o tym, iż niskie stężenie tlenu może wywoływać reakcję metaboliczną, istnieje potrzeba zdefiniowania odpowiednich pojęć.

Aeracja gleby dotyczy całości zagadnień związanych ze składem powietrza glebowego, jego rolą dla roślin oraz procesami pobierania, wydzielania i transportu gazów w glebie. W celu określenia całokształtu zagadnień związanych

z rozmieszczeniem stężenia tlenu w glebie i jego dostępnością dla mikroorganizmów i korzeni roślin, stosowany jest termin „natlenienie gleby" [5, 82]. Uwzględniając gradację stężenia tlenu w glebie, można rozróżnić stan **normoksji** - kiedy to proces dyfuzyjny zaopatrywania w tlen z atmosfery porów glebowych i korzeni roślin jest wystarczający i pokrywa w pełni zapotrzebowanie gleby i roślin, stan **hipoksji** - kiedy to w agregatach glebowych współistnieją równocześnie obszary dotlenione i niedotlenione oraz **anoksji** - kiedy to w skutek braku dyfuzji tlenu z atmosfery panują w glebie warunki anaerobowe.

Na poziomie fizjologicznym tkanek roślinnych, można wyróżnić analogicznie **normoksję** - kiedy dopływ tlenu nie limituje fosforylacji oksydatywnej, **hipoksję** - kiedy niskie ciśnienie parcjalne O_2 ogranicza produkcję ATP w mitochondriach oraz **anoksję** - kiedy to produkcja ATP podczas fosforylacji oksydatywnej jest niska w porównaniu z ilością produkowanego ATP w procesie glikolizy oraz fermentacji [47]. Przedstawia to Rys. 3.

Rys. 3. Stany natlenienia w glebie i w komórce roślinnej.
Fig. 3. Oxygen status in soil and in plant cell.

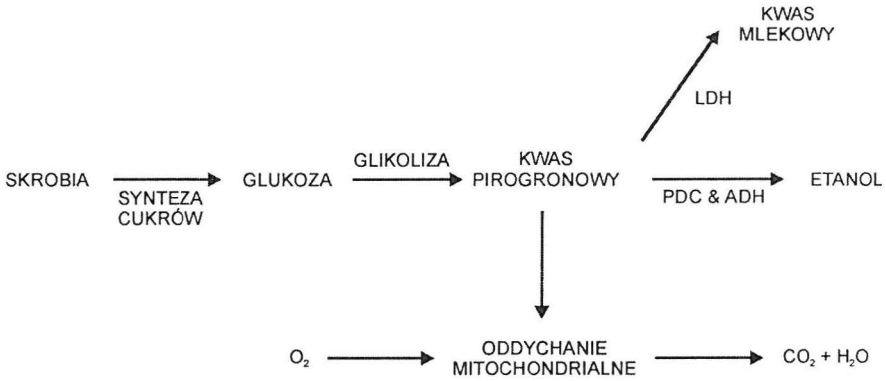
Dodatkowe źródło ATP w poddanej stresowi tlenowemu komórce stanowi stymulacja procesu glikolizy, znana jako efekt Pasteur'a (Rys. 4).

Wpływ stężenia tlenu na respirację komórek korzeni związany jest z pojęciem krytycznego stężenia tlenu (COC = Critical Oxygen Concentration) na powierzchni korzeni. Ponieważ aktywność oksydazy cytochromowej spada

wyraźnie dopiero przy bardzo niskich stężeniach (< 1%), można przyjąć, że przy COC na powierzchni korzeni, stężenie tlenu w osi korzenia zbliża się do zera, COC zależy bowiem nie tylko od maksymalnej respiracji korzeni (q_{max}) ale również od współczynnika radialnej dyfuzji tlenu (D_r) w tkance korzenia i od jego promienia (R), co wyraża równanie:

$$COC = q_{max} \times R^2 / 4D_r.$$

Z tego równania wynika, że im grubszy jest korzeń oraz im mniejszy jest współczynnik dyfuzyjności gazu w jego tkance, tym krytyczne stężenie tlenu jest wyższe. Poza tym ponieważ w warunkach glebowych trudno jest określić grubość błonki wodnej na powierzchni korzenia i jej rolę w ograniczaniu dopływu tlenu do korzeni oraz nie łatwo jest stwierdzić na ile stężenia tlenu w powietrzu glebowym odpowiada jego stężeniu na powierzchni epiblemy korzenia [6, 61].



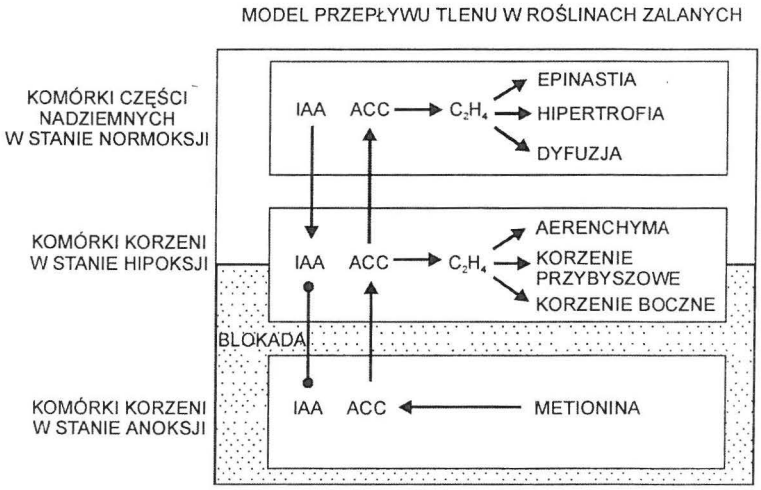
Rys. 4. Szlak fermentacyjnego oddychania w komórkach roślinnych znajdujących się w warunkach hipoksji bądź anoksji

Fig. 4. Outline of fermentative respiration in hipoxic and anoxic plant cells

3.3. Zmiany struktury tkanek roślinnych wywołane przez anoksję

Warunki beztlenowe w korzeniu stymulują produkcję etylenu w częściach nadziemnych [64, 71, 72, 76, 112], mechanizm tej stymulacji polega na zwiększonej syntezie ACC (kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego) w warunkach beztlenowych w korzeniach, następnie ACC jest transportowany drogą ksylematyczną do części nadziemnych, gdzie w obecności tlenu ulega przekształceniu w etylen. Podwyższenie zawartości etylenu w częściach nadziemnych powoduje epinastię, tj. zmianę kąta odchylenia ogonka liścia od łodygi. Z obecnością etylenu związane jest także powstawanie korzeni

przybyszowych i tkanek aerenchymatycznych [76]. Powstawanie aerenchymy w częściach nadziemnych i korzeniach roślin wodnych oraz tolerujących anoksję pozwala na długodystansowe dotlenienie tkanek w stanie hipoksji [46, 150, 151] (Rys. 5).



Rys. 5. Model przepływu etylenu w roślinach zalanych
Fig. 5. Model of ethylene fluxes in flooded plants

Stwierdzono, że nawet bardzo niskie stężenie etylenu w powietrzu otaczającym korzeń rzędu 0,1-1,0 $cm^{3}m^{-3}$, sprzyja selektywnemu obumarciu komórek oraz wywołuje nekrozę w korzeniach, w warunkach anoksji. Równocześnie wykazano obecność w hipoksycznych korzeniach wyższych stężeń ACC i etylenu oraz wzmożoną aktywność enzymów sprzyjających jego biosyntezie [67]. Bennicelli [13] w badaniach rizotronowych wykazał obecność nekrozy i nowo uformowanych przestrzeni aerenchymatycznych w korzeniach kukurydzy poddanych zlokalizowanemu stresowi tlenowemu.

3.4. Zmiany metaboliczne wywołane niedoborem tlenu

W ostatnich latach dużo uwagi poświęcono fizjologicznej i biochemicznej reakcji organizmów i komórek przechodzących od stanu dobrego do ograniczonego natlenienia [135, 147].

W warunkach naturalnych stres tlenowy powoduje przechodzenie zarówno w glebie jak i na poziomie komórkowym, ze stanu hipoksji do anoksji. Na poziomie komórki i tkanki prowadzi to do zaburzeń homeostazy, czyli przesunięcia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania [132]

i w efekcie - do podwyższenia stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu (RFT). Zjawisko to nosi nazwę stresu oksydacyjnego [11], jakkolwiek każda sytuacja stresowa, podczas której homeostaza redoks jest zaburzona, może wskazać na obecność stresu oksydacyjnego [3].

W warunkach braku tlenu następuje powstrzymanie transportu elektronów w mitochondriach, co powoduje inhibicję syntezy adenozyntrójfosforanu (ATP). Komórki w warunkach niedostatku energii przechodzą do produkcji anaerobowego ATP, pochodzącego z procesu glikolizy. Wówczas bardzo ważna staje się dostępność cukrów jako substratów tego procesu.

Również w warunkach anoksji zaburzona jest mobilizacja skrobi: w nie tolerujących anoksji ziarnach pszenicy ustaje proces rozkładu skrobi w endospermie, natomiast u bardziej tolerującego stres tlenowy ryżu, indukowana jest produkcja amylazy, odpowiedzialnej za rozkład skrobi [110].

Uogólniając można stwierdzić, że anoksja powoduje znaczące obniżenie poziomu ATP, szczególnie, ale nie tylko, u roślin nie wykazujących tolerancji, a zdolność roślin tolerujących anoksję do podtrzymywania dopływu energii przez dłuższy czas, co stanowi kluczowy czynnik przetrwania w warunkach anoksji [37, 65].

Inną ważną cechą wynikającą z metabolizmu beztlenowego jest zakwaszenie cytoplazmy i akumulacja produktów fermentacji. Spadek pH cytoplazmy od 7,3 do 6,8 przypisuje się obecności kwasu mlekowego. Inhibicja dehydrogenazy mleczanowej i aktywacja dekarboksylazy pirogronianowej w kwaśnym środowisku prowadzi do akumulacji aldehydu octowego, który jest przekształcany w etanol [przez dehydrogenazę alkoholową (DA) - EC 1.1.1.1.] stanowiący jeden z końcowych produktów metabolizmu anaerobowego. Jednakże, poziom zakwaszania nie jest wyłącznym atrybutem akumulacji kwasu mlekowego; inną możliwość stanowi bierny przeciek H^+ z wakuoli w warunkach limitowanej dostępności ATP oraz inhibicji H^+-ATP-azy w wakuoli [119].

W warunkach przedłużonej anoksji etanol jest najczęściej spotykanym produktem fermentacji, nawet u roślin tolerujących anoksję, które są zdolne do uwolnienia go do otaczającego środowiska. Wykazano, że zdolność do usunięcia lotnych, końcowych produktów fermentacji (tj. etanolu i aldehydu octowego) prowadzi do wzrostu tolerancji na anoksję nawet we wrażliwych roślinach grochu (*Cicer arietinum* L.) [41].

3.5. Reakcja na stres - rola reaktywnych form tlenu

Szeroki wachlarz stresów środowiskowych (wysokie i niskie temperatury, susza, zasolenie, promieniowanie UV, stres spowodowany wysoką zawartością ozonu w przyziemnej warstwie troposfery oraz infekcje wywołane przez patogeny) jest potencjalnie niebezpieczny dla roślin. Wspólny aspekt wszystkich tych niekorzystnych warunków środowiskowych (wywołanych przez czynniki stresowe) związany jest ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) w różnych częściach składowych komórek roślinnych [1, 3, 10, 11, 24, 44, 51, 52, 54, 56, 69, 74, 78, 80, 88, 89, 92, 93, 98, 105, 115, 146, 150, 157, 165] (Tabela 4).

Tabela 4. Reaktywne formy tlenu (wg. [5] - zmodyfikowane)
Table 4. Reactive oxygen species ([5] - modified)

Reaktywne formy tlenu	Symbol
Tlen singletowy	O_2
Ozon	O_3
Rodnik wodoronadtlenkowy	$HO_2^{\cdot}$
Aninorodnik ponadtlenkowy	O_2^{-}
Nadtlenek wodoru	H_2O_2

Anoksja prowadzi do takiej modyfikacji metabolizmu komórkowego oraz stanu funkcjonalnego membran komórkowych, której wynikiem jest powstawanie RFT.

Towarzyszące temu na przykład zmiany w ilości i składzie lipidów oraz płynności membrany [33, 70], zmniejszenie adenylowego ładunku energetycznego (AEC) [37, 65] oraz obniżenie pH cytoplazmy (acydoza) sprzyjają produkcji RFT i postępującej peroksydacji lipidów (LP) [32, 40]. Zatem, sekwencja zdarzeń stanowiących reakcję na stres, tak jak wygenerowanie RFT, peroksydacja lipidów oraz obronna reakcja antyoksydacyjna jest indukowana przez zmiany metaboliczne w warunkach niedoboru tlenu.

Niekorzystne warunki środowiskowe oprócz ubocznych produktów metabolizmu, powodują więc zwiększenie stężenia RFT, prowadzącego do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w komórce z przewagą reakcji utleniania, gdzie tlen występuje jako akceptor elektronów podlegając redukcji do nadtlenku wodoru lub wody.

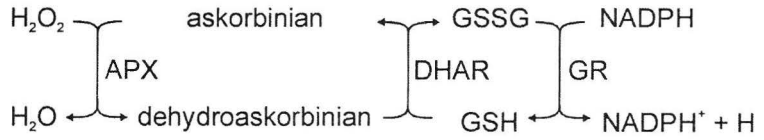
Przesadne wygenerowanie RFT, będące jednym z sygnałów wskazujących na obecność stresu oksydacyjnego, jest częścią składową wielu sytuacji stresowych [107]. Naruszenie równowagi stacjonarnej pomiędzy wygenerowanymi RFT a ich

metabolizowaniem w komórce może indukować zarówno adaptacyjną odpowiedź rośliny [94], jak również szkodliwe zmiany w strukturze komórkowej i w jej metabolizmie.

Mechanizm "odczuwania" obecności RFT nie jest znany, ale wiele istniejących modeli uważa zmiany redoks za kluczowe i sugeruje, że zarówno hipoksja jak i RFT mogą być "wyczuwane" przez te same mechanizmy [130].

3.6. Zaburzenia w reakcjach oksydoredukcyjnych

Zdaniem wielu autorów, jednym z podstawowych efektów różnorodnych stresów zarówno natury fizycznej (temperatura, promieniowanie światła widzialnego i UV, promieniowanie jonizujące), jak i chemicznej (toksyczne substancje w tym również herbicydy oraz metale ciężkie) bądź stresów biotycznych (infekcje różnych patogenów) są zaburzenia reakcji oksydoredukcyjnych, w efekcie których w reakcjach łańcuchowych powstają wolne rodniki [95, 97, 98]. Ograniczony dopływ energii w warunkach anoksji powoduje zmiany stanu redoks komórki. Kiedy tlen, jako końcowy akceptor elektronów w łańcuchu transportu elektronów jest niedostępny, następuje redukowanie pośrednich przenośników elektronów. W konsekwencji proces ten zakłóca metabolizm aktywnych reakcji redoks. Faktycznie, wykazana zdolność do zachowania stosunku NADH/NAD^+ na niezmienionym poziomie przez dłuższy czas, w przypadku tolerujących anoksję roślin ryżu oraz *Glyceria* [34] jest istotna do przetrwania roślin w warunkach anoksji. Natomiast obniżenie NADH/NAD^+ obserwowano u roślin nie tolerujących anoksji takich jak pszenica i fasola [35]. Dodatkowo mechanizm wiązania pojawiających się w nadmiarze protonów (H^+) i produkcja NADH, podczas pierwszego etapu anaerobiozy może zachodzić podczas metabolizmu kwasu askorbinowego (DHA) i glutationu (GSH) (redukcja do form o antyoksydatywnym działaniu) (Rys. 6.).



Rys. 6. Cykl redoks askorbinianu w chloroplastach (szlak Halliwell-Asada)
Fig. 6. The redox cycle of ascorbate in the chloroplast often referred to as the Halliwell-Asada pathway

Zmiany redoks w komórce mogą doprowadzić do modyfikacji innych zależnych od stanu oksydoredukcyjnego reakcji np. utlenianie Fe^{+2}, które są

inicjatorami powstawania RFT poprzez reakcję Fentona oraz peroksydację lipidów. Jeśli niedobór tlenu przedłuża się, zapotrzebowanie na utleniony NAD^+ i ATP prowadzi na szlaku fermentacji, gdzie zarówno dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jak i dehydrogenaza alkoholowa (ADH) mogą regenerować NAD^+.

3.7. Funkcja i struktury membran komórkowych poddanych anoksji

Zmiana właściwości fizycznych membran komórkowych oraz ich funkcji i składu stanowi niespecyficzną reakcję na stres wywołany przez różne stresory [31, 123].

Zmiana zawartości i składu lipidów membranowych pod wpływem anoksji [32], aktywacja peroksydacji lipidów [22, 31, 38, 39], wzmożony wyciek elektrolitów [35] oraz zmniejszanie się AEC [61, 65], wskazują na osłabienie struktury samych membran.

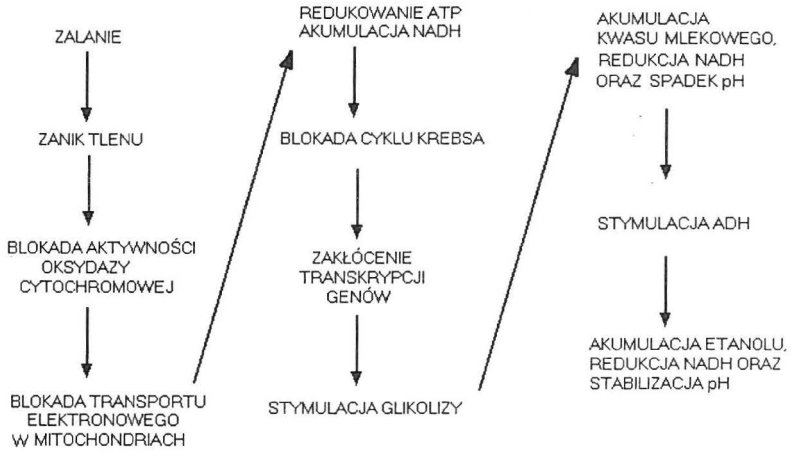
W ostatnim czasie zbierano coraz więcej dowodów wskazujących na ważną rolę metabolizmu lipidów, a szczególnie nienasyconych kwasów tłuszczowych w indukowaniu reakcji obronnych pod wpływem stresów zarówno abiotycznych, jak biotycznych. Ponieważ synteza lipidów jest energochłonna i z trudnością może zachodzić w warunkach braku tlenu, strategia zachowania lipidów membranowych jest najbardziej wydajnym sposobem utrzymywaniu funkcji membran. Lipidy membranowe ulegają zmianom adaptacyjnym w warunkach anoksji: najpierw występuje próba podtrzymywania wysokiego poziomu nienasyconych kwasów, później pojawiają się wolne kwasy tłuszczowe i ma miejsce produkcja małych ilości reaktywnych form tlenu, pochodzących z łańcucha transportu elektronowego membran.

4. ANOKSJA I EKSPRESJA GENÓW

Zmiany metaboliczne wywołane anoksją są powiązane ze zmianami w ekspresji genów [43, 45, 63, 73, 118]. Obserwowano obniżenie translacji mRNA i aktywizację ekspresji genów anoksji (Rys. 7.).

W warunkach anoksji ograniczona jest normalna synteza białek i pojawia się jedynie 10-20 anaerobowo-indukowanych białek [123]. Większość indukowanych genów kodyfikuje enzymy biorące udział w uruchamianiu skrobi oraz glukozy w procesie glikolizy i fermentacji etanolowej [33]. Jednakże odkryto dwa geny nie mające związku z metabolizmem cukrów, które są indukowane w warunkach braku tlenu, i mogą wpływać na formowanie się tkanki aerenchymatycznej [123].

Nowa rodzina anaerobowo-indukowanych genów u jednej z odmian ryżu (*Oryza sativa),* wysoko-odpornej na anoksję została opisana w ostatnim czasie [73].



Rys. 7. Regulacja transkrypcji genów przez anoksję
Fig. 7. Model of regulation of gene transcription by anoxia

5. SYSTEM ODBIORU I PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW OSTRZEGAJĄCYCH PRZED STRESEM TLENOWYM

Żywe organizmy rejestrują większość zmian fizycznych i chemicznych zachodzących w ich otoczeniu oraz mają zdolność do odpowiadania na nie we właściwy sobie sposób [94, 152, 153].

Powstanie pytanie w jaki sposób roślina „wyczuwa" brak tlenu w rizosferze i następnie w komórce, by móc zaradzić stresowi tlenowemu.

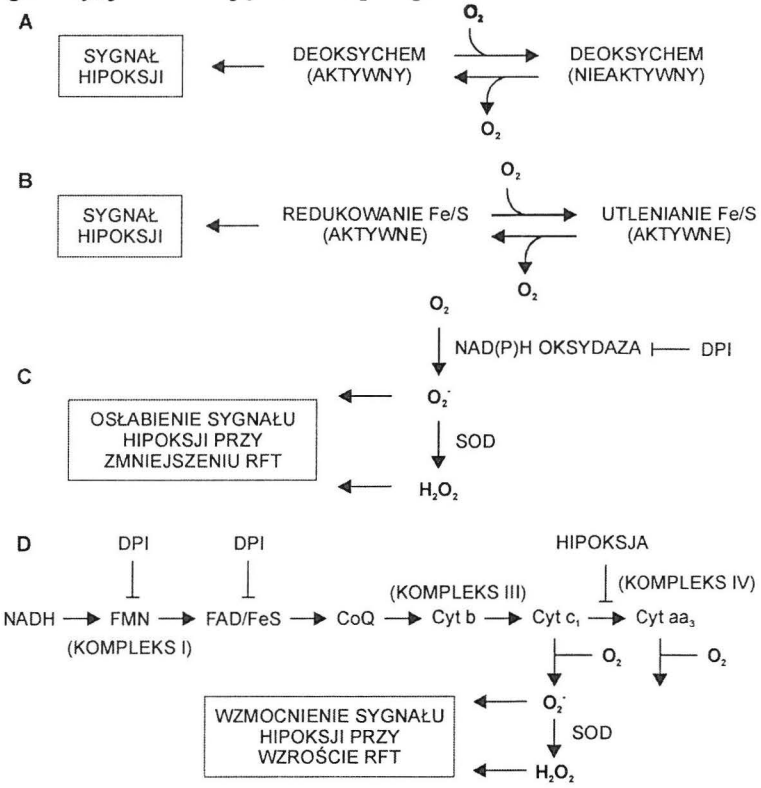
Aby uzyskać odpowiedź adaptacyjną roślina musi odbierać sygnał, który jest następstwem zmian homeostazy. Zmiany: pH, stanu oksydoredukcyjnego, poziomu RFT i AEC uczestniczą w przekazywaniu tych sygnałów.

Zaproponowano wiele modeli percepcji stanu tlenowego środowiska przez komórki roślinne, wśród których wyróżniają się modele opracowane przez Semenza [130].

5.1. Bezpośredni odbiór obecności tlenu

Grupy hemu będące swego rodzaju czujnikami, wiążą bezpośrednio O_2 przechodząc w formę utlenioną nieaktywną,, a w momencie gdy stężenie tlenu

maleje, następuje deoksygenacja grup hemu (Rys. 8A). Proces ten uważa się za pierwszy etap w percepcji obecności tlenu. Jest coraz więcej dowodów na to, że w korzeniach wielu gatunków roślin jest obecna hemoglobina. Alternatywną funkcją hemoglobiny roślinnej może być wskazywanie poziomu stężenia tlenu i „przełączenie" metabolizmu komórkowego ze szlaku oksydatywnego na szlak fermentacyjny [38]. Dwa geny kodujące hemoglobinę wykryto w *Arabidopsis thaliana*, przy czym jeden z nich indukowany jest przez hipoksję [45]. W korzeniach jęczmienia poddanych stresowi tlenowemu zaobserwowano indukcję genu hemoglobiny, jako reakcję na stres [149].



Rys. 8. Modele percepcji obecności tlenu przez komórki roślinne [wg 130 - zmodyfikowane]. A – bezpośredni odbiór obecności lub braku tlenu; B – cykl redoks żelaza i siarki; C – przekształcenie tlenu w ponadtlenek przez oksydazy NAD(P)H; D – inhibicja kompleksu IV (oksydazy cytochromowej c) w mitochondriach.

Fig. 8. Models of O_2 sensing [130 – modified]. A – direct sensing of the presence or lack of oxygen; B – Fe and S oxidation cycle, C – transformation of oxygen into superoxide through NAD(P)H oxidase; D – inhibition of the compled IV (cytochrome oxidase c) in mitochondria.

5.2. Cykl oksydoredukcyny żelaza i siarki

Kolejną możliwość dalszego przekazywania sygnału o obecności tlenu daje cykl oksydororedukcyjny żelaza i siarki (Rys. 8. B). W tym przypadku utlenione związki żelaza i siarki stanowią formę nieaktywną, zaś ich odpowiedniki zredukowane – formę aktywną dającą sygnał o hipoksji.

5.3. Przekształcanie O_2 w ponadtlenek przez oksydazy NAD(P)H

Percepcja tlenu poprzez metabolity stresu oksydatywnego (RFT) sugeruje również kolejne mechanizmy. Oksydaza NAD(P)H katalizuje transformację O_2 do ponadtlenku, który następnie ulega dysmutacji przy udziale SOD do H_2O_2. Model ten przewiduje, że w warunkach niedotlenienia zmniejsza się produkcja reaktywnych form tlenu i w ten sposób generuje się sygnał redoks o zaistniałej hipoksji (Rys. 8 C).

5.4. Inhibicja kompleksu IV (oksydazy cytochromowej c) w mitochondriach.

Inhibicja kompleksu IV zachodzi na etapie łańcucha transportu elektronów w mitochondriach w warunkach hipoksji, a strumień wyciekających elektronów prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu w kompleksie III [130] (Rys. 8D).

Dane eksperymentalne dotychczas zebrane nie są jednoznaczne i częściowo potwierdzają wszystkie zaproponowane modele. Uwikłanie reaktywnych form tlenu w procesie sygnalizacji i indukcji reakcji na stres tlenowy jest dobrze opisane dla roślin bardzo wrażliwych na warunki niedotlenienia. Uczestnictwo RFT w reakcjach na stresy zostało opisane fenomenologicznie w różnych warunkach środowiskowych takich jak: susza, wysokie zasolenie, niska temperatura, anoksja, starzenie się oraz wysokie stężenie ozonu, co sugeruje fundamentalną rolę spełnianą przez RFT w niespecyficznych adaptacjach na stres i w jego sygnalizacji [62, 93].

6. REAKTYWNE FORMY TLENU

Reaktywne formy tlenu (wolne rodniki), takie jak anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, oraz tlen singletowy, są ubocznymi produktami metabolizmu komórek. Powstają one w wyniku jednoelektronowego utleniania zredukowanych form wielu związków przez tlen cząsteczkowy oraz szereg reakcji enzymatycznych. Są one bardziej aktywne chemicznie niż tlen

atmosferyczny (tlen tripletowy) i mogą powodować uszkodzenia struktur komórkowych. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają głównie w mitochondriach i chloroplastach oraz w peroksysomach i glioksysomach. Na pierwszym etapie reakcja ta wymaga zainicjowania (w wyniku jednoelektronowej reakcji redoks, fotolizy, działania związków chemycznych), podczas gdy następne etapy jak prolongacja i terminacja) są już egzotermiczne i mogą przebiegać spontanicznie z udziałem lub bez udziału katalizatorów [153].

W wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu, powstaje **anionorodnik ponadtlenkowy** zdolny do samodzielnego istnienia:

$$O_2 + e^- \rightarrow \mathbf{O_2^{-\bullet}}$$

Do jego powstania w mitochondriach dochodzi wskutek "wycieku" elektronów z łańcucha oddechowego. Zredukowane formy ubichinonu i koenzymu dehydrogenazy NADH wchodzą w jednoelektronową reakcję z tlenem tworząc $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$ [10]. Wolny rodnik $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$ produkowany jest także w chloroplastach. Proces ten jest związany z fotosystemem I i ferredoksyną. Przy niskim stężeniu NADP w chloroplastach, zredukowana ferredoksyna przekazywać może elektrony na cząsteczki tlenu. Dzieje się tak np. w warunkach silnego oświetlenia, gdy obniżone zostaje stężenie CO_2 w chloroplastach. Alternatywnym źródłem $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$ jest jedno z centrów Fe-S fotosystemu I. W chloroplastach powstawać może również tlen singletowy, w wyniku przeniesienia energii ze wzbudzonego chlorofilu na tlen atmosferyczny [125]. Rodnik ponadtlenkowy może powstawać także w peroksysomach i glioksysomach.

Organella te są również głównym źródłem **nadtlenku wodoru** w komórce, dzięki obecności różnych rodzajów oksydaz flawinowych. Nadtlenek wodoru może powstawać także w wyniku spontanicznej lub enzymatycznej dysproporcjacji rodników ponadtlenkowych.

Nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy, choć znacznie bardziej reaktywne od tlenu, są stosunkowo mało groźne dla komórki i bezpośrednio nie powodują większych uszkodzeń. Jednak w obecności jonów metali przejściowych mogą one reagować ze sobą:

$$O_2^{-\bullet} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$$ (reakcja Habera-Weissa)

Reakcja ta przebiega w dwóch etapach:

$$Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + \mathbf{OH^{\bullet}}$$ (reakcja Fentona)

Powstający w niej wolny **rodnik wodorotlenowy** ($\mathbf{OH^{\bullet}}$) jest niezwykle aktywny chemicznie. Będąc bardzo silnym utleniaczem, reaguje praktycznie ze wszystkimi składnikami komórki, powodując uszkodzenia białek, DNA oraz peroksydację lipidów [11]. Rodnik $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$ ułatwia natomiast uwalnianie żelaza z białek.

Obecność wolnych rodników w różnych strukturach komórkowych, szczególnie w chloroplastach i w mitochondriach, powoduje stres oksydatywny, polegający m. in. na oksydacji wielu związków np. lipidów występujących w różnych błonach, co jest szczególnie groźne w tylakoidach. Pierwszy stopień redukcji O_2 jest względnie krótkotrwały i nie prowadzi do całkowitego przemieszczania się rodników wodoronadtlenkowego $HO_2^{\bullet}$ i ponadtlenkowego $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$. Czas połowicznego rozkładu $\mathbf{O_2^{-\bullet}}$ wynosi 2 -4 μs [80, 146].

7. PEROKSYDACJA LIPIDÓW

W warunkach normalnych, tj. bez działania stresora, peroksydacja lipidów (LP) jest procesem fizjologicznym. W sytuacji stresu oksydatywnego LP prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych. Peroksydacja lipidów dotyczy utleniania (wielo)nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów membranowych, będącymi głównymi budulcami błon komórkowych, lub innych lipidów, w wyniku którego powstają nadtlenki tych związków. W procesie tym zachodzą trzy etapy: inicjacja, prolongacja i terminacja [131].

Rodnik wodorotlenowy ($\mathbf{^{\bullet}OH}$), rodnik ponadtlenkowy ($\mathbf{O_2^{-\bullet}}$) oraz rodnik wodoronadtlenkowy ($\mathbf{HO_2^{\bullet}}$.), inicjują proces peroksydacyjny odrywając wodór od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego. Również ozon, tlenek i dwutlenek azotu oraz dwutlenek siarki mogą zainicjować peroksydację lipidów. Reakcja ta przekształca cząsteczkę kwasu tłuszczowego w wolny rodnik alkilowy, gdyż przy atomie węgla, który stracił atom wodoru, pozostaje nie sparowany elektron.

W fazie propagacji wolne rodniki alkilowe ($\mathbf{L^{\bullet}}$) reagują z tlenem tworząc wolne rodniki nadtlenkowe ($\mathbf{LOO^{\bullet}}$), które są zdolne do odrywania kolejnych atomów wodoru z cząsteczki kwasu tłuszczowego. Reakcja pomiędzy wolnymi rodnikami (rekombinacja wolnych rodników) prowadzi do powstawania produktu, który nie jest wolnym rodnikiem, czyli do terminacji procesu

peroksydacji lipidów. Produktami reakcji są dimery fosfolipidów oraz keto- lub hydroksykwasy tłuszczowe – a więc zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów.

Rozkład (inicjowany przez jony metali przejściowych takich jak żelazo i miedź) produktów nierodnikowych peroksydacji lipidów może prowadzić do ponownego powstawania produktów wolnorodnikowych (zjawisko reinicjacji).

Dalsze przemiany produktów peroksydacji, prowadzą do rozpadu resztek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i powstania fragmentów kilku- i kilkunastowęglowych. Najpopularniejszym wśród nich jest dialdehyd malonowy (MDA) [10, 44, 86, 121, 163].

Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA), oparte jest na jego reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA).

8. ANTYOKSYDACYJNY SYSTEM OBRONNY

Wszystkie organizmy tlenowe posiadają antyoksydacyjny system ochrony komórek przed reaktywnymi formami tlenu. Również w warunkach niedotlenienia, rośliny aktywują system obronny.

Stopień wrażliwości rośliny na stresy zależy w mniejszym stopniu od ilości powstających wolnych rodników niż od sprawności ich likwidacji [136]. W procesie tym zaangażowane są różne związki niskocząsteczkowe [1], jak również liczne białka enzymatyczne chroniące przed prekursorami wolnych rodników, których aktywność wzrasta. (Tabela 5).

Tabela 5. Antyoksydanty biorące udział w procesie likwidacji wolnych rodników
Table 5. Antioxidant system in plants

SYSTEM OBRONNY ANTYOKSYDATYWNY U ROŚLIN	
ENZYMATYCZNY	NIE ENZYMATYCZNY
Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	Glutation (GSH)
Katalaza	Kwas askorbinowy (DHA)
Peroksydaza glutationowa	Tokoferole (TOH)
Reduktaza glutationowa	Karotenoidy
	Flavonoidy, hydrochinony

Rośliny wykazujące odporność na różne rodzaje stresów środowiskowych mają zwykle zwiększoną aktywność jednego lub kilku enzymów antyoksydacyjnych [2, 31, 46, 47, 68, 88, 103, 109, 119].

Ogólnie można stwierdzić, że odporność na stres zakłada zdolność rośliny do reagowania na stresor w sposób pozwalający na utrzymywanie homeostazy (rośliny nieodporne) lub zdolności zmiany homeostazy w kierunku adaptacyjnym (rośliny odporne). Te dwie strategie pozwolają roślinom nieodpornym przetrwać przez niedługi okres czasu a roślinom odpornym pokonać stres.

8.1. Dysmutazy ponadtlenkowe

Dysmutazy ponadtlenkowe (EC 1.15.1.1.) są metaloproteinami katalizującymi reakcję dysproporcjacji (dysmutacji) anionorodników ponadtlenkowych:

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Reakcja zachodzi w dwóch etapach, w których związany z enzymem jon metalu przejściowego ulega kolejno redukcji i utlenieniu przez anionorodnik ponadtlenkowy:

$$\text{Me-utl.} + O_2^{-\bullet} \rightarrow \text{Me-red.} + O_2$$

$$\text{Me-red.} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow \text{Me-utl.} + H_2O_2$$

Bardzo wysoka stała szybkości katalizowanej reakcji (ok. 2×10^9 $Mol^{-1}s^{-1}$) jest dowodem ograniczenia reakcji praktycznie tylko przez dyfuzję substratu.

Dysmutazy ponadtlenkowe obecne są u prawie wszystkich organizmów tlenowych oraz u większości fakultatywnych anaerobów [10, 86]. Obecność ich tworzy system obronny komórek przed stresem oksydacyjnym i warunkuje stężenie tlenu singletowego ($^1O_2$) i nadtlenku wodoru (H_2O_2), substratów reakcji Habera-Weissa [19, 22, 25-28, 30, 53, 57, 79, 84, 99, 104, 127, 154, 163, 165, 168].

Ze względu na rodzaj związanego kofaktora, wyróżnia się trzy klasy dysmutaz ponadtlenkowych:

- dysmutazy cynkowo-miedziowe (CuZnSOD)
- dysmutazy manganowe (MnSOD)
- dysmutazy żelazowe (FeSOD)

W organizmach roślinnych występują wszystkie trzy typy dysmutaz ponadtlenkowych: dysmutazy cynkowo-miedziowe występują w cytoplazmie, chloroplastach i w peroksysomach [57]. Dysmutaza manganowa zlokalizowana jest w mitochondriach [10]. Wykryto także obecność MnSOD w peroksysomach roślinnych [30]. Według obecnych danych dysmutazy żelazowe często spotykane

są u bakterii natomiast w królestwie roślin występują rzadko. Rozpowszechnione są one wśród jedno i wielokomórkowych glonów, natomiast u roślin wyższych posiadają je przedstawiciele tylko kilku rodzin: *Ginkgoaceae, Nymphaceae, Cruciferae, Rutaceae, Leguminacae* i *Solonaceae* [124, 125].

Ostatnio zidentyfikowano nową izoformę CuZn-SOD z wysokim punktem izoelektrycznym, która zlokalizowana jest w aparacie Golgiego oraz w błonie plazmatycznej [79]. Wszystkie izoformy SOD są kodowane w genomie jądrowym, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie.

8.2. Katalaza

Katalaza (EC 1.11.1.6) jest enzymem zawierającym hem i katalizuje ona dysmutację nadtlenku wodoru do wody i tlenu. Enzym ten został stwierdzony u wszystkich aerobowych eukariotów. Spełnia on ważną rolę w usuwaniu nadtlenku wodoru wytwarzanego w peroksyzomach poprzez oksydazy wywołujące β-oksydację kwasów tłuszczowych, biorące udział w cyklu fotorespiracji i katabolizmie puryny [53]. Wszystkie formy katalazy są tetramerami o ciężarze molekularnym przekraczającym 220 000. Obecność wielu form katalazy opisano w licznych roślinach. Formy te były klonowane z kukurydzy [128] a homologiczne geny były klonowane z wielu roślin. W kukurydzy występują trzy izoformy Cat-1, Cat-2 i Cat-3, które obecne są na oddzielnych chromosomach, wyrażają się w zróżnicowany sposób i są regulowane niezależnie [128]. Cat-1 i Cat-2 zlokalizowane są w peroksyzomach i cytosolu, podczas gdy Cat-3 znajduje się w mitochondriach. Katalazy są bardzo wrażliwe na światło i wykazują szybki rozkład, podobny do obserwowanego u białka D1 w PSII. Różnego typu stresy spowalniają przemiany białek a także powodują zmniejszenie aktywności katalazowej.

9. ZWIĄZKI OKSYDOREDUKCYJNIE CZYNNE

9.1. Kwas askorbinowy

Kwas L-askorbinowy jest niezwykle ważną witaminą występującą w tkance roślinnej. Askorbinian pełni zasadniczą rolę w niektórych procesach fizjologicznych roślin takich jak funkcje wzrostowe, różnicujące i metaboliczne. Działa jako reduktor wobec wolnych rodników, zmniejszając uszkodzenia wywołane stresem oksydatywnym lecz wydaje się posiadać inne funkcje dotąd jeszcze niewyjaśnione.

Synteza askorbinianu przebiega w cytosolu, ponieważ specyficzny translokator askorbinianowy był zidentyfikowany na otoczkach chloroplastów. Kwas L-askorbinianowy syntetyzowany jest z heksoz u roślin wyższych lecz kontrowersyjnymi pozostają pewne etapy tej syntezy. Chociaż dwa szlaki przemian są możliwe, rośliny wyższe na początku przemieniają D-glukozę w askorbinian poprzez prostą konwersję, w której łańcuch węglowy zachowuje swoją sekwencję. Na drodze przemian następuje oksydacja węgla – 1 w D-glukozie i formowanie się enediolu (nienasyconego dwu-alkoholu) pomiędzy węglem 2 i 3.

Askorbinian może bezpośrednio zmiatać wolne rodniki tlenkowe z lub bez udziału katalizujących enzymów oraz pośrednio poprzez przemienianę tokoferoli w ich zredukowane formy [8, 107]. Reagując z RFT szybciej niż jakiekolwiek inne komponenty w roztworze wodnym, askorbinian zabezpiecza makromolekuły przed oksydatywnym uszkodzeniem. Reakcja z rodnikami hydroksylowymi jest limitowana wyłącznie przez dyfuzję. Kwas askorbinowy syntetyzowany jest z D-glukozy. Jako antyoksydant, askorbinian reaguje z nadtlenkami, nadtlenkiem wodoru albo rodnikami tokoferylowymi i ulega utlenieniu do kwasu monodehydroaskorbinowego lub kwasu dehydroaskorbinowego. Formy utlenione są przekształcane w kwas askorbinowy przez reduktazę monodehydroaskorbinianową i reduktazę dehydroaskorbinianową przy użyciu redukujących równoważników NAD(P)H lub odpowiednio glutationu. Dehydroaskorbinian może ulegać rozkładowi do soli potasowej kwasu winowego i kwasu szczawiowego.

Reakcja kwasu L-askorbinianowego z nadtlenkami może odgrywać rolę podobną do roli dysmutazy ponadtlenkowej (SOD):

$$2O_2 + 2H^+ + \text{askorbinian} \longrightarrow 2H_2O_2 + \text{dehydroaskorbinian}$$

Reakcja z nadtlenkiem wodoru katalizowana jest przez peroksydazę askorbinianową:

$$H_2O_2 + 2\ \text{askorbinian} \longrightarrow 2H_2O + 2\ \text{monodehydroaskorbinian}$$

Pośrednia rola askorbinianu jako antyoksydanta polega na regenerowaniu antyoksydantów membranowych, takich jak α-tokoferole, które zmiataja rodniki nadtlenkowe i syngletowy tlen zgodnie z reakcją:

$$\text{rodnik tokoferoksylowy} + \text{askorbinian} \longrightarrow \text{tokoferol} + \text{monodehydroaskorbinian}$$

Powyższe reakcje wskazują , że istnieją dwa różne produkty utleniania askorbinianu: monodehydroaskorbiniany i dehydroaskorbiniany, które odpowiadają przemieszczeniu odpowiednio jednego lub dwóch elektronów.

Monodehydroaskorbiniany mogą spontanicznie ulegać dysmutacji albo też podlegać redukcji do askorbinianu przy udziale reduktazy monodehydroaskorbinianowej NAD(P)H.

Dehydroaskorbinian jest nietrwały przy pH wyższym niż 6 i przechodzi w postać kwasu szczawiowego i soli potasowej kwasu winowego. Aby temu zapobiec, dehydroaskorbinian jest szybko redukowany poprzez reduktazę dehydroaskorbinianową przy użyciu równoważników redukujących pochodzących od glutationu (GSH).

Obecność askorbinianu stwierdzono w chloroplastach, cytosolu, wakuolach i składnikach ekstracelularnych. Około 20-40% askorbinianu w komórkach mezofilu liści występuje w chloroplastach. Chloroplasty zawierają wszystkie enzymy zdolne do regeneracji zredukowanego askorbinianu z jego utlenionych produktów.

Foyer i Halliwell [55] zaproponowali reakcję, w której nadtlenek wodoru jest rozkładany w chloroplastach poprzez parę askorbinian/glutation w cyklicznej reakcji redoks.

9.2. Glutation

Glutation (GSH) jest trójpeptydem (Glu-Cys-Gly), który pełni funkcję antyoksydanta z powodu łatwości utleniania grup sulfydrylowych cysteiny [9, 55, 101, 160]. Podczas oksydacji, siarczek daję początek rodnikom tiolowym, które reagują z inną utlenioną formą glutationu, formując wiązanie dwusiarczkowe (GSSG). Niektóre warzywa zawierają homoglutation (hGSH), który jest homologicznym trójpeptydem (Glu-Cys-Ala). Potencjał redoks GSH wynosi –340 mV, co pozwala na zredukowanie dehydroaskorbinianu do askorbinianu lub też na zredukowanie wiązań dwusiarczkowych w białkach.

GSH występuje w większości tkanek, komórkach oraz składnikach komórkowych roślin wyższych. Jego poziom zmniejsza się z wiekiem tkanek i zależy od warunków środowiskowych. Na przykład poziom glutationu jest większy na świetle niż w ciemności. Na poziomie subkomórkowym, GSH wykazuje stężenie najwyższe w chloroplastach, średnio od 1 do 4 mM, ale znaczne ilości kumulują się również w cytosolu. W GSH dominuje forma zredukowana, której szacunkowy udział wynosi od 70% w przypadku chloroplastów jęczmienia do 90% u grochu.

GSH pełni funkcji antyoksydanta na wiele sposobów. Może reagować z tlenem singletowym, rodnikami ponadtlenkowymi i nadtlenkowymi, dlatego też działa jako bezpośredni wymiatacz wolnych rodników. GSH może stabilizować strukturę membran poprzez usuwanie acylowych nadtlenków powstałych podczas reakcji utleniania lipidów (LP). W rozdziale 9.1. przedstawiono jego rolą w recyklingu kwasu askorbinowego z formy utlenionej do zredukowanej przy udziale reduktazy dehydroaskorbinianowej. GSH może również redukować dehydroaskorbinian w reakcji nieenzymatycznej przy pH > 7 i stężeniu GSH powyżej 1 mM. Stanowi to znaczący szlak w chloroplastach, gdzie pH w stromach na świetle wynosi około 8 a stężenie GSH może osiągać 5 mM [55]. Obecność enzymów katalizujących syntezę i degradację GSH stwierdzono zarówno w chloroplastach, jak i składnikach cytosolu.

Redukcja GSSG do GSH jest katalizowana przez reduktazę glutationową (GR), którą wyizolowano z licznych tkanek roślinnych, a cDNA dla GR klonowano z grochu. Sekwencja aminokwasów i struktura GR, rozpoznana z zastosowaniem techniki krystalografii rentgenowskiej, wykazała bardzo duże podobieństwo pomiędzy ludzką i pochodzącą z Escherichia coli, co sugeruje, że jest to enzym bardzo wysoko zachowany na drodze ewolucji [66].

Zwierzęta posiadają tylko jedną postać GR, u roślin zaś występują różnorodne formy tego enzymu. Dla przykładu w liściu grochu GR występuje w postaci izoenzymów o dwóch wymiarach określanych techniką elektroforezy żelowej. Te izoenzymy są w większości powiązane z różnymi składnikami subkomórkowymi; GR jest związana głównie z chloroplastami, lecz znaczącą aktywność stwierdzono również w cytozolu i w mniejszym stopniu w mitochondriach. Różne izoenzymy prawdopodobnie reprezentują produkty pochodzące od różnych genów, które posiadają małe bądź znaczące różnice w sekwencji. Wykazują one zróżnicowanie w regulacji i odpowiedzi na sygnały środowiskowe.

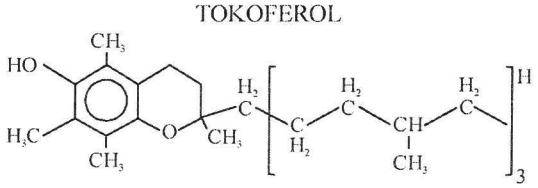
Zwierzęta posiadają nadtlenek glutationu, enzym zawierający selen, który redukuje nadtlenek wodoru tworząc GSSG i dlatego też służy on jako alternatywny detoksyfikator RFT. Początkowo sądzono, że rośliny wyższe są pozbawione tego enzymu jednakże w późniejszych badaniach stwierdzono obecność peroksydazy glutationowej w hodowanych komórkach. Roślinny cDNA izolowany z *Nicotiana sylvestris* okazał się homologiem zwierzęcej peroksydazy glutationowej.

9.3. Związki fenolowe

Proste fenole, taniny, flawonoidy i izoflawonoidy są związkami o charakterze polarnym z powodu obecności wbudowanych w pierścień aromatyczny podstawników, takich jak grupy hydroksylowe, karboksylowe lub metoksylowe, co sprawia, że w środowisku wodnym są łatwo rozpuszczalne. Większość tych związków wywodzi się od fenyloalaniny i tyrozyny, które powstają z fosforanu erytrozy oraz kwasu fosfoenolopirogronowego. Działanie ochronne związków fenolowych przed promieniowaniem nadfioletowym jest rozpoznane w przypadku flawonoidów (antocyjany, flawonole i flawony). W przypadku tanin rola ochronna przed czynnikami patogennymi stanowi ich cechę charakterystyczną [126].

9.4. Tokoferole

α-Tokoferole (witamina E) były przebadane u zwierząt jako stabilizatory membran i antyoksydanty, które zmiatają wolne rodniki tlenkowe, rodniki utleniające lipidy i tlen singletowy. Rola ta zależy od wypełnienia podstawnikami pierścienia benzochinowego i całkowicie zredukowanego łańcucha fitylowego (Rys. 9) [126].



Rys. 9. Struktura tokoferoli obecnych w roślinach
Fig. 9. Structure of tocopherols commonly found in plants

Posiadające charakter hydrofobowy α-tokoferole lokują się wyłącznie w membranach komórkowych i poprzez pierścień benzochinonowy są ściśle związane z grupami karboksylowymi gliceroli, będących komponentami fosfolipidów, zaś łańcuchy fitylowe łączą się z kwasami tłuszczowymi w hydrofobowych częściach dwuwarstwowych membran. Pierścień zawierający tlen pozostaje na powierzchni podwójnej warstwy membrany lecz skierowany jest do komponentów lipidowych.

Znaczenie dietetyczne poziomu tokoferoli udokumentowano szczegółowo w tkankach roślin. Ich stężenie w tkankach roślinnych zmienia się w szerokich

przedziałach od 200 ng g^{-1} (świeżej masy) w bulwach ziemniaka do 5 mg g^{-1} (świeżej masy) w liściu palmy olejowej. Tokoferole odnaleziono we wszystkich roślinach wyższych, zarówno w tkankach fotosyntetyzujących jak i niefotosyntetyzujących. Mimo, że tokoferole są dobrze udokumentowanym składnikiem membran chloroplastów, nie ma oszacowania ich dystrybucji ilościowej w membranach komórkowych roślin.

Tokoferole zaliczane są do rodziny antyoksydantów, zawierających 4 tokoferole posiadające łańcuch fitylowy i analogiczne tokotrienole, które posiadają łańcuch geranylogeranylowy. Właściwości antyoksydacyjne tokoferoli spowodowane są ich zdolnością do tłumienia zarówno tlenu singletowego jak i nadtlenków. Ich wydajność jako wymiataczy tlenu singletowego jest mniejsza niż β-karotenu i dlatego w membranach tylakoidów przerywa on reakcję łańcuchową poprzez wychwytywanie rodników nadtlenkowych. Synteza α-tokoferolu zachodzi w plastydach.

9.5. Karotenoidy

Karotenoidy są C_{40} izoprenoidami i tetraterpenami zlokalizowanymi w plastydach zarówno w fotosyntetyzujących, jak i niefotosyntetyzujących tkankach roślinnych. W chloroplastach, karotenoidy pełnią funkcję pigmentów pochłaniających światło, ale być może bardziej znacząca jest ich zdolność do detoksyfikacji RFT oraz tripletowego chlorofilu, które są produkowane jako wynik pobudzenia kompleksów fotosyntetycznych przez światło. Owoc dojrzałego pomidora jest bogaty w likopen, znajdujący się w chromoplastach, natomiast w korzeniu marchwi występuje β-karoten. Właściwości antyoksydacyjne karotenoidów przyczyniają się do ich działania antykancerogennego i zapobiegawczego w przypadku arteriosklerozy i choroby oczu.

10. CEL PRACY

W świecie roślin wyższych, będących organizmami aerobowymi o ograniczonych zdolnościach przeżycia w warunkach braku tlenu molekularnego, szczególne znaczenie dla rozwoju i plonowania ma jego dostępność w strefie korzeniowej. Korzenie bowiem najczęściej doświadczają stresów, w tym także niedotlenienia.

Szacuje się, że około 12% gleb świata charakteryzuje stałe niedotlenienie spowodowane nadmiarem wody, podczas gdy gleby okresowo niedotlenione z

tego powodu występują w wielu krajach [50]. Według Somorowskiego [134] powierzchnia gleb zajmowanych przez użytki rolne w Polsce i wykazujących problemy niedotlenienia wynosi: dla gleb okresowo za mokrych 2840 tys. ha (15,1%), a dla gleb stale za mokrych – 414 tys. ha (2,2%).

Niedobór tlenu w glebie, może prowadzić do zahamowania wzrostu korzeni w obszarze stresowym lub też do modyfikacji rozwoju i funkcji życiowych części korzeni nie podlegającej stresowi. Zaburzenia funkcjonowania rośliny w okresie trwania stresu i tuż po nim, mogą rzutować na architekturę tj. rozmieszczenie przestrzenne systemu korzeniowego, a w konsekwencji na wykorzystanie przez nią wody i składników pokarmowych [13]. Przedłużający się stres tlenowy może prowadzić do obumierania korzeni.

Wśród wielu czynników środowiskowych decydujących o zdolnościach produkcyjnych biomasy roślin, stan natlenienia gleby, zasługuje na głębszą uwagę. Jest on wypadkowym efektem procesów biologicznych i chemicznych powodujących ciągle zużycie tlenu przy równoczesnym wydzielaniu dwutlenku węgla oraz procesów fizycznych umożliwiających wymianę gazów między atmosferą, glebą a korzeniami roślin [61].

Hipoteza, że zdolność rośliny do przetrwania okresu hipoksji lub anoksji glebowej związana jest z jej cechami fizjologicznymi, była u podstaw niniejszej pracy. Wśród szeregu wskaźników fizjologicznych roślin, związanych z natlenieniem gleb, enzymy będące ważnym elementem systemu obronnego organizmów roślinnych takie jak: dysmutazy ponadtlenkowe EC 1.15.1.1. - (SOD) oraz reduktaza glutationowa EC 1.6.4.2 - (GR) były również przedmiotem szczególnych badań. Duże zainteresowanie budzą zwłaszcza zmiany aktywności SOD w roślinach pod wpływem takich czynników jak susza lub zalanie wodą, zanieczyszczenia atmosferyczne, herbicydy, zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura i inne [25]. Oprócz aktywności tych enzymów, poziom dialdehydu malonowego (MDA) oraz barwników fotosyntetycznych uznano za najbardziej odpowiednie do podkreślenia związków przyczynowych pomiędzy występującym w glebie niedoborem tlenu, tworzącym warunki stresowe (hipoksja i anoksja) a reakcją, w postaci stresu oksydacyjnego, przemieszczającego się łańcuchowo w tkankach roślinnych: korzeniowych i części nadziemnych. Złożoność oddziaływań w układzie powietrze glebowe-gleba-korzeń sprawia, że z zastosowanych wskaźników, odzwierciedlających poszczególne aspekty stanu natlenienia gleby, żaden nie ujmuje tych oddziaływań w sposób całościowy.

Próba korelacji niektórych fizjologicznych i biochemicznych cech roślin: pszenicy ozimej oraz pszenżyta, indukowanych stresem tlenowym, z

niektórymi parametrami natlenienia gleby, charakteryzującymi jej status aeracyjny (uwzględniającym gradację od dobrego natlenienia przez stan hipoksji do warunków anoksji glebowej) była celem podjętego zadania.

Wybór pszenicy jako rośliny testowej podyktowany był jej kluczowym znaczeniem w praktyce rolniczej zarówno Polski (ok. 2600 000 ha zasiewów w roku 2001) jak i świata (ok. 200 mln ha zasiewów). Pszenżyto zaś włączono dla porównania jako roślinę charakteryzującą się znaczną odpornością na niedotlenienie, stwierdzoną w poprzednich badaniach [61].

11. MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano w warunkach kontrolowanych, w fitotronie umożliwiającym regulację temperatury i oświetlenia oraz zaprogramowanie długości dnia i nocy jak również wilgotności powietrza.

Eksperyment przeprowadzano w 30 wazonach plastikowych o pojemności 5,9 dm^3 i średnicy 20 cm. Każdy wazon zawierał 6,2 kg gleby upakowanej ręcznie, do ustalonej gęstości objętościowej 1,35 Mg m^{-3}, co przy gęstości fazy stałej 2,61 Mg m^{-3} dawało porowatość całkowitą (E_0) 48%. Gleba w każdym wazonie zajmowała objętość 5,0 dm^3.

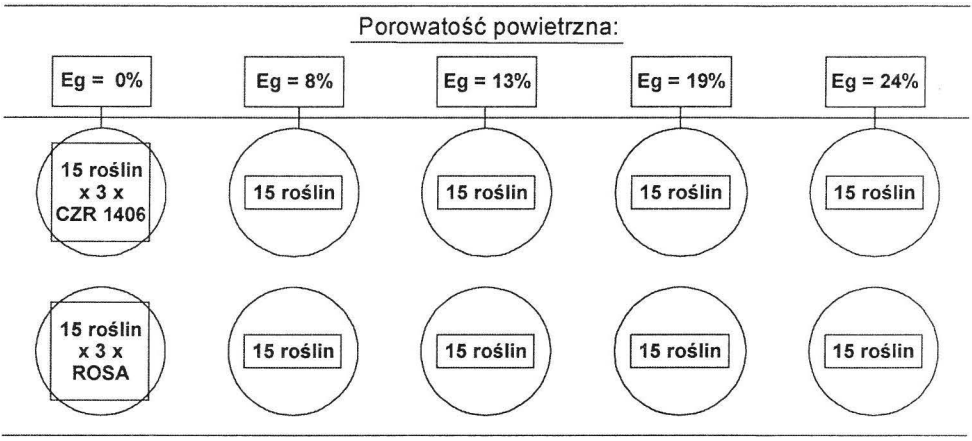
Obiekty doświadczalne (Rys. 10) obejmowały kontrolę (Eg= 24%) oraz cztery niższe porowatości powietrzne aż do Eg= 0%, które uzyskano przez zwiększanie wilgotności gleby co 0,06-0,07 m^3m^{-3} aż do pełnego wysycenia wodą. Do badań użyto jedną odmianę pszenicy ozimej (Rosa) oraz jeden ród pszenżyta (CZR 1406). Każdy eksperyment przeprowadzony został w trzech niezależnych powtórzeniach. W przygotowanych w jednakowy sposób wazonach, zasiano po 20 sztuk nasion pszenicy ozimej oraz pszenżyta (po 15 wazonów dla każdej rośliny).

Po 20 dniach wstępnej fazy kiełkowania i wschodów roślin, pozostawiono w każdym wazonie po 15 siewek o zbliżonym stopniu rozwoju.

Do doświadczeń użyto jednorodnego materiału glebowego pochodzącego z warstwy ornej, poziom Ap gleby brunatnej wytworzonej z lessu (Eutric Cambisol wg klasyfikacji FAO), pobranego z miejscowości Elizówka k. Lublina. Na podstawie wcześniejszych badań ustalono, że gleba ta charakteryzuje się szczególnie małą odpornością oksydoredukcyjną, co w warunkach niedotlenienia prowadzi do szybkich zmian jej stanu oksydoredukcyjnego [137, 142].

Podstawową charakterystykę gleby zamieszczono w Tabeli 6.

Rys. 10. Schemat doświadczenia obejmujący dla każdej z badanych roślin pięć wartości porowatości powietrznej (Eg) w trzech powtórzeniach (po 15 roślin w każdym wazonie).
Fig. 10. Scheme of the experiment including five air-filled porosities in three replications (15 plants in each pot).



Oznaczenia składu granulometrycznego (metodą Cassagrande' a w modyfikacji Prószyńskiego), zawartości substancji organicznej (metodą Tiurina), pH (metodą elektrometryczną, przy stosunku gleby do H_2O lub KCl równym 1:10), oraz powierzchni właściwej (metodą adsorpcji pary wodnej) wykonano w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie.

Po przywiezieniu z pola, glebę przesiano przez sita o średnicy oczek 5 mm, i po oznaczeniu wilgotności metodą suszarkową odważano odpowiednią porcję gleby i napełniano nią wazony. Glebę upakowano ręcznie warstwowo, ustalając jej gęstość na poziomie 1,35 Mg m^{-3}.

Tabela 6. Podstawowa charakterystyka materiału glebowego gleby brunatnej (poziom Ap) wytworzonej z lessu (Elizówka k. Lublina)
Table 6. Carachteristics of soil material (Eutric Cambisol – Ap horizont) from Elizówka near Lublin

Poziom genetyczny	Procentowy udział frakcji mechanicznej				Materia organiczna %	Powierzchnia właściwa [m^2/g]	pH	
	0,1 - 0,05 mm	0,05 - 0,02 mm	0,02 - 0,002 mm	< 0,002 mm			KCl	H_2O
Ap	14	46	27	13	1,51	19	6,5	6,8

Dla zbadania wpływu stresu w warunkach anoksji glebowej, wybrano jedną odmianę pszenicy ozimej *Triticum aestivum* L. - Rosa oraz pszenżyta *Triticale* rodu - CZR 1406, spośród wielu uprzednio testowanych roślin, jako dwie skrajne zróżnicowane pod względem głębokości ukorzenienia w warunkach niedotlenienia systemu korzeniowego [116].

Pszenżyto CZR 1406 pochodziło z rodu "Czesławice" wyhodowanego w stacji doświadczalnej hodowli roślin w Czesławicach k. Lublina przez profesora Tarkowskiego z AR w Lublinie. Powstało ono ze krzyżowania odmiany *Triticum aestivum* L. odmiany Lanca x *Secale cereale* L. - karłowate (Pszenżyto) i z ponownego skrzyżowania z pszenicą odmiany Lanca. Posiada ono w swoim garniturze tylko jeden chromosom pszenno-żytni i ma układ chromosomalny 1B/1R.

Pszenica Rosa pochodzi ze skrzyżowania odmiany Nadieżnaja 45 z odm. Grana i odm. Luna. Wyhodowana została w stacji doświadczalnej Kobierzyce w Pustkowie Żurawskim przez A. i I. Bielawskich.

Wśród pszenic ozimych uznawana jest za odmianę średniomrozoodporną, o średniej zdrowotności, odporną na wyleganie. Posiada plenność lepszą niż Grana i Panda i charakteryzuje się dobrą, chlebową jakością mąki.

Dwie komory fitotronowe produkcji niemieckiej firmy ILKA typ. KTLK 1250/1600 posłużyły dla przeprowadzania eksperymentów. Intensywność radiacji fotosyntetycznej czynnej (PAR) wynosiła 350 μmol m^{-2} s^{-1} na poziomie łanu przy długości dnia 14 godzin. Temperatura dnia wynosiła 22°C zaś temperatura nocy 18°C. Względna wilgotność powietrza wahała się między 50 a 55%.

12. PARAMETRY DOŚWIADCZEŃ

12.1. Porowatość powietrzna gleby (Eg)

Wskaźnik Eg ma charakter fizyczny a jego wartość wyliczano na podstawie aktualnej wilgotności masowej (W), gęstości objętościowej (d) i gęstości fazy stałej gleby (ρ) stosując wzór: $Eg = E_0 - Wd$, gdzie E_0 oznacza porowatość całkowitą.

Utworzono pięć poziomów natlenienia, od wartości porowatości powietrznej odpowiadającej 0% (gleba zalana całkowicie tj. anoksja glebowa), do 24% (wartość kontrolna).

12.2. Natężenie dyfuzji tlenu w glebie (ODR)

ODR mierzono wg metody opracowanej przez Lemona i Ericksona [95] rozwijanej przez McIntyre'a [102] i zmodyfikowanej przez Gawlika, Malickiego i Stępniewskiego [59] oraz Malickiego i Walczaka [100]. Metoda ta wykorzystuje zjawisko elektrochemicznej redukcji tlenu na powierzchni spolaryzowanej elektrody platynowej, umieszczonej w glebie i spolaryzowanej ujemnie względem nasyconej elektrody kalomelowej [16].

Redukcja jednej cząsteczki tlenu przebiega z udziałem 4 elektronów, zarówno w środowisku kwaśnym (A), jak również w środowisku obojętnym lub zasadowym (B) [102]:

$$O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightleftharpoons H_2O_2 \qquad H_2O_2 + 2\,e^- \rightleftharpoons 2\,OH^- \quad (A)$$

$$O_2 + 2H_2O + 2\,e^- \rightleftharpoons H_2O_2 + 2\,OH^- \qquad H_2O_2 + 2\,e^- \rightleftharpoons 2\,OH^- \quad (B)$$

zatem, natężenie prądu (i) stanowi miarę ilości tlenu ulegającego redukcji na elektrodzie platynowej.

W początkowym stadium polaryzacji elektrody platynowej, duża ilość tlenu ulega redukcji, później po 4 minutach, na skutek wyczerpania się tlenu w glebie otaczającej bezpośrednio elektrodę, ilość O_2 redukującego się w jednostce czasu maleje, aż osiągnie stan stacjonarny, tj. gdy prędkość redukcji tlenu zrówna się z dopływem dyfuzyjnym do powierzchni elektrody.

Oznaczenia ODR przeprowadza się umieszczając w ośrodku glebowym trzy rodzaje elektrod:

1) platynową, którą polaryzuje się do wartości potencjału rozkładowego tlenu,
2) kalomelową, stosowaną jako elektrodę odniesienia,
3) miedzianą, która umożliwia zadanie potencjału rozkładowego na elektrodzie platynowej i utrzymywanie go na stałym poziomie.

Po czterech minutach od momentu spolaryzowania elektrody platynowej, dokonuje się odczytu wartości natężenia prądu, związanego z wielkością przekazanego ładunku. Zależność pomiędzy natężeniem prądu płynącego w obwodzie, a ilością redukowanego tlenu przedstawia się następująco:

$$i = n\,F\,A\,f_r$$

gdzie: i = natężenie prądu w amperach,
n = liczba elektronów biorących udział w reakcji (tj. 4),
F = stała Faraday'a (tj. 96 500 C),
A = powierzchnia elektrody w m^2,

f_r = ilość tlenu redukowanego na powierzchni elektrody w jednostce czasu, tj. (mol $m^{-2}s^{-1}$).

Przepływ tlenu (f_r) można obliczyć z równania:

$$f_r = i / n F A.$$

Wyrażając natężenie dyfuzyjnego przepływu tlenu w $\mu g\ O_2\ m^{-2}s^{-1}$ i oznaczając je symbolem ODR otrzymujemy:

$$ODR\ [\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}] = M\ i / n\ F\ A = 8{,}29\ 10^{-5}\ i\ [\ \mu A] / A\ [m^2]$$

Gdzie: M - oznacza masę molową tlenu (32 g mol^{-1}).

Do pomiaru ODR używano aparat umożliwiający automatyczną kontrolę efektywnego napięcia elektrody, który opisany został przez Malickiego i Walczaka [100].

Pomiary wykonano w trzech terminach trwania stresu tlenowego przy użyciu 5 platynowych elektrod (∅ 0.5 i długość 4 mm) umieszczanych na głębokościach 2; 5; 10; 15; 18 cm. Tak więc wartość ODR dla każdego wazonu jest średnią z 15 pojedyńczych pomiarów, zaś średnia wartość dla danego poziomu natlenienia pochodzi z trzech wazonów czyli z 45 pojedyńczych pomiarów.

12.3. Potencjał oksydoredukcyjny gleby (Eh)

Wartość Eh zależy od stosunku formy utlenionej do zredukowanej pojedyńczych par redoks, zgodnie z równaniem Nernsta:

$$Eh = E_0 - \frac{RT}{n F} \ln \frac{[utl]}{[red]}$$

W roztworze glebowym, obecność form w stanie utlenionym bądź zredukowanym, wpływa na wartość Eh. Minimalne stężenie jonu, mającego wpływ na Eh w roztworze glebowym wynosi 10^{-6} M dm^{-3}.

W układzie glebowym występuje równocześnie obok siebie wiele par redoks, a wytworzony przez nie potencjał ma charakter potencjału wypadkowego albo "mieszanego".

W warunkach doświadczenia potencjał redoks mierzono elektrodami platynowymi, wykonanymi z nie czernionego drutu platynowego o średnicy 0,5 mm o długości 4 mm. Kalibrację wszystkich elektrod wykonano w buforze Michaelisa (o stałym potencjale redoks = 406 mV) i dopuszczono do pomiarów te, które charakteryzowały się stałym potencjałem, nie odbiegającym więcej niż +/- 10 mV od wartości kontrolnej.

Uzyskany wynik pomiaru przeliczano na potencjał oksydoredukcyjny wobec elektrody wodorowej normalnej Eh wg wzoru:

$$Eh = E_{NEK} + E_{o(NEK)}$$

gdzie: E_{NEK} - oznacza potencjał elektrody platynowej mierzony wobec nasyconej elektrody kalomelowej, jako elektrody odniesienia wynoszący 247 mV w temperaturze 25°C

$E_{o(NEK)}$ - potencjał nasyconej elektrody kalomelowej wobec elektrody wodorowej normalnej.

Pomiary wykonano w trzech terminach, w każdym z wazonów przy użyciu 5 platynowych elektrod umieszczanych na głębokościach 2; 5; 10; 15 i 18 cm. Potencjał każdego wazonu charakteryzowano więc przy pomocy 15 pojedyńczych pomiarów.

12.4. Opór dyfuzyjny (Rd)

Poprzez aparaty szparkowe zachodzi wymiana gazów pomiędzy atmosferą wewnętrzną liścia a otoczeniem. Regulacja aparatu szparkowego decyduje o transpiracji, bilansie cieplnym i prawdopodobnie o oddychaniu i fotosyntezie [61]. Pomiar oporu dyfuzyjnego liści (Rd) będącym miarą efektywności aparatów szparkowych, wykonano przy użyciu zautomatyzowanego poromierza Mk3 typ AP3 wyprodukowanego przez Eijkelkamp Agriresearch Equipment (Holandia).

Zasada pomiaru polega na przetwarzaniu sygnału, powstającego wewnątrz czujnika umieszczonego na liściu, z odparowującej przez aparaty szparkowe wody. Względna wilgotność w czujniku zależna jest od: stopnia parowania na powierzchni liści, różnicy temperatur między liściem a otoczeniem oraz względnej wilgotności powietrza otaczającego liście. Uzyskany sygnał przetwarzany jest na wartość oporu dyfuzyjnego poprzez sporządzenie krzywej kalibracyjnej na perforowanej płytce wzorcowej.

Pomiary Rd wykonano w komorze fitotronowej przy wilgotności powietrza 50% ± 5% pomiędzy godz. 10.00 a 11.00. Maksymalna różnica temperatur (Δt) pomiędzy liściem a otoczeniem była mniejsza niż 0,9°C. Podczas pierwszego pomiaru (dwa dni po rozpoczęciu stresu tlenowego) mierzono Rd w środkowej części na dolnej stronie blaszki trzeciego liścia, a następnie w 8-ym i 12-ym dniu po rozpoczęciu stresu, odpowiednio na 4 i 5 liściu.

Każdorazowo pomiar powtarzano na liściach wybranych pięciu roślin w każdym z trzech wazonów (będących powtórzeniami tego samego poziomu natlenienia).

12.5. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Oznaczenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej przeprowadzano w homogenacie liści i korzeni. Homogenat liści sporządzono ze środkowej części blaszki liścia trzech różnych roślin tego samego poziomu natlenienia. Homogenat korzeni przygotowywano z trzech systemów korzeniowych roślin danej kombinacji, po uprzednim ich starannym wypłukaniu. Następnie połowę tak spreparowanych korzeni, rozcierano w moździerzu schłodzonym do 2-4 °C i zawierającym 4,5 cm^3 buforu 5mM Tris-HCl (pH 7,4) po czym roztwór filtrowano przez tkaninę kapronową. Do analizy aktywności SOD stosowano 20 krotnie rozcieńczony homogenat w przypadku oznaczeń w liściach a 5 krotny - do oznaczenia SOD w korzeniach.

Oznaczenia aktywności SOD wykonano wg metodyki opisanej przez Paoletti i wsp. [108], stosując metodę spektrofotometryczną opartą na inhibicji utleniania NADH przez rodniki ponadtlenkowe. Spadek szybkości utleniania NADH przy długości fali 340 nm jest funkcją aktywności enzymatycznej. Jako jednostkę aktywności SOD, przyjęto 50% inhibicji utleniania NADH.

Do analiz enzymatycznych SOD wykorzystano spektrofotometr firmy Shimadzu typ UV-1601 PC - Japonia wraz z oprogramowaniem umożliwiającym śledzenie reakcji enzymatycznej w czasie, co było szczególnie cenne w tym przypadku, gdzie dobranie rozcieńczenia substratu wywołującego 50% inhibicję enzymu jest szczególnie trudne.

12.6. Reduktaza glutationowa (GR)

Reduktazę glutationową (GR) (EC 1.6.4.2), oznaczono metodą według Eppinga i wsp.[53]. Homogenat materiału roślinnego uzyskano w ochłodzonej mieszaninie (1:19) zawierającej 50 mM K/Na buforu fosforanowego o pH 7,4; 0,1 mM EDTA oraz 2% poliwinylopirolidonu (PVP).

Zasada oznaczania aktywności tego enzymu polega na reakcji redukcji form utlenionych glutationu GSSG do form zredukowanych GSH za pomocą NADPH w obecności H^+ przy udziale GR.

Po przefiltrowaniu poprzez tkaninę kapronową, homogenat wirowano przez 20 min przy 15 000 g. Supernatant dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej: NADPH, $MgCl_2$ oraz GSSG. Oznaczenia spektrofotometryczne przy 340 nm wykonano po 5 min od wprowadzenia homogenatu w mieszaninę reakcyjną przy użyciu spektrofotometru firmy Shimadzu typ UV-1601 PC - Japonia. Aktywność reduktazy glutationowej wyrażono w □mol $(g\ s.\ m)^{-1}\ min^{-1}$.

12.7. Dialdehyd malonowy (MDA)

Poziom dialdehydu malonowego (MDA), będącego produktem oksydatywnej destrukcji lipidów ścian komórkowych, oznaczano w tym samym homogenacie korzeni oraz liści co stosowany do oznaczeń GR, stosując test z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBA) według metody opisanej przez Dhindsa i Matowe [44] z uwzględnieniem ekstracji butanolowej w celu usunięcia zanieczyszczeń.

Zasada metody polega na tworzeniu barwnego kompleksu kwasu tiobarbiturowego z aldehydem dimalonowym. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) po sporządzeniu krzywej kalibracyjnej, wyrażano w μmol kg^{-1} ś.m.. Oznaczanie absorbancji przy długościach fali 535 i 600 nm przeprowadzano na tym samym spektrofotometrze Shimadzu UV-vis.

Wartości MDA wyliczano wg. wzoru:

$$\text{stężenie } A_{(MDA)} = \Delta E \times 10^6 \times 4 \, (V_{\text{buforu}} + V_{\text{próby}}) / 1{,}56 \times 10^5 \times V_{\text{homogenatu}} \times P$$

gdzie: ΔE = różnica ekstynkcji przy 535 i 600 nm,
V= objętość
P= świeża masa roślin

12.8. Chlorofil *a* + *b*

Zawartość tych pigmentów oznaczano w trzech terminach działania stresu tlenowego, metodą spektrofotometryczną opisaną przez Lichternthalera i Wellburna [97] używając czystego ekstraktu acetonowego (w trzech powtórzeniach).

Do sporządzenia homogenatu używano środkową partię wykształconego liścia. Oznaczenia pigmentów wykonywano na świeżo, równolegle z oznaczeniami enzymatycznymi. Zawartość chlorofilu *a* + *b* wyrażono w mg na g suchej masy.

12.9. Biomasa

Świeżą biomasę części nadziemnych i korzeni testowanych roślin, oznaczono po odważeniu uzyskanego materiału (wszystkie rośliny danego poziomu natlenienia). Następnie wybrane fragmenty liści i korzeni służyły do przygotowania homogenatów wykorzystywanych do dalszych oznaczeń. Pozostały zaś materiał suszono w suszarce (105°C), a następnie wyliczono zawartości suchej masy.

13. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

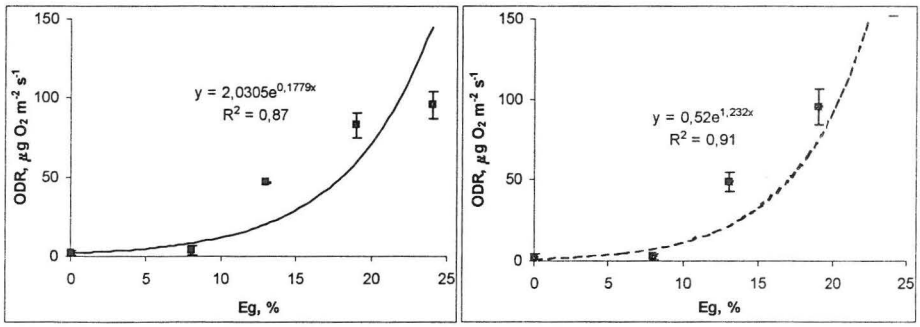
13.1. Zmienność parametrów glebowych w warunkach stresu tlenowego

13.1.1. ODR

Wartości ODR w ośrodku glebowym, w całym zakresie warunków doświadczenia, obejmującym trzyletnie badania każdej z roślin układały się w przedziale od 1 do 180,5 μg O_2 m^{-2} s^{-1}, przyjmując wartości średnie w przypadku testowanych roślin przedstawione w funkcji Eg na Rys.11 i 12.

Pełne wysycenie wodą odpowiadało wartościom ODR poniżej 4,5 μg O_2 m^{-2} s^{-1}, we wszystkich cyklach doświadczalnych i terminach oznaczeń zarówno u pszenicy jak i pszenżyta. Natomiast kolejne wzrastające poziomy porowatości powietrznej powodowały wyraźne zróżnicowanie wskaźnika ODR, który wynosił odpowiednio 6; 23,8; 45,6 i 78,2 μg O_2 m^{-2} s^{-1}.

Wartości średnie ODR z trzech przeprowadzonych cykli badawczych z dwiema roślinami, wyznaczane po upływie 2, 7 i 12 dni trwania eksperymentu były porównywalne i wynosiły odpowiednio: 29, 33, 40 μg O_2 m^{-2} s^{-1} w przypadku pszenżyta oraz 24, 21, 39 μg O_2 m^{-2} s^{-1} dla pszenicy. Należy zatem wnioskować, że dostępność tlenu dla korzeni obu testowanych roślin była zbliżona w odpowiadających sobie kombinacjach.



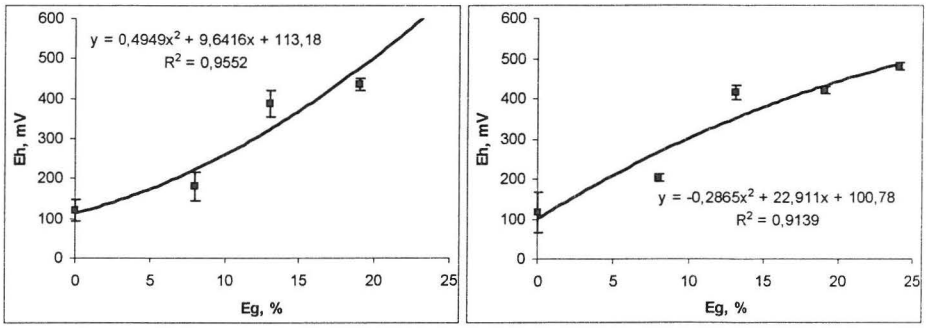
Rys. 11-12. Zależność pomiędzy Eg a ODR w doświadczeniach z *Triticale* i *Triticum aestivum*.
Fig. 11-12. Relationship between Eg and ODR in experiments with *Triticale* and *Triticum aestivum*.

Ilustracja uzyskanych wyników wskazuje, że zakres Eg 0-8% odpowiada wartościom ODR zbliżonym do zera (średnie ODR: 2,3-5 i 1,9-6,3 μg O_2 m^{-2} s^{-1} odpowiednio u CZR i Rosa). Przy większych wartościach porowatości

powietrznej następuje równoczesny wzrost ODR, do wartości maksymalnych dochodzących do 180,5μg O_2 m^{-2} s^{-1} przy 24% Eg, Wartości zaś średnie ODR, wyznaczone w 3 cyklach doświadczalnych z pszenżytem i pszenicą przy maksymalnej porowatości powietrznej wynosiły odpowiednio: 87,1 oraz 68,0μg O_2 m^{-2} s^{-1} , Wykazana zależność funkcyjna pomiędzy analizowanymi parametrami ODR i Eg daje się najlepiej opisać funkcją wykładniczą, przyjmując wartości R^2=0.91 w doświadczeniach z pszenżytem i R^2=0,88 z pszenicą ozimą.

13.1.2. Eh

Badania prowadzone w zmiennych warunkach porowatości powietrznej, obejmujących zakres 0-24%, spowodowały zdecydowane zróżnicowanie Eh, które w formie graficznej przedstawiono na Rys.13-14.



Rys. 13–14. Potencjał oksydoredukcyjny (Eh) w funkcji porowatości powietrznej gleby (Eg) w doświadczeniach z *Triticale* i *Triticum aestivum* L.
Fig. 13–14. Redox potential (Eh) as a function of air porosity (Eg) in experiments with *Triticale* and *Triticum aestivum* L.

Wartości średnie potencjału oksydoredukcyjnego gleby w trakcie trwania doświadczeń układały się w całym zakresie Eg w przedziale od 116 do 481 mV, przy czym w kombinacji odpowiadającej 0%, wartość średnia Eh nie przekraczała 120 mV podczas eksperymentu z obu badanymi gatunkami zbóż. Wartości Eh w czasie 12 dni trwania cyklu doświadczalnego, utrzymywały się niemal na stałym poziomie, ulegając niewielkim wahaniom przy danym poziomie natlenienia. Wyliczone średnie z trzech lat w obrębie poszczególnych kombinacji wynosiły w przypadku pszenicy: 133; 187; 366, 434 i 461 mV a dla pszenżyta: 116, 202, 415, 421, 481 mV odpowiednio przy wartościach Eg= 0, 8, 13, 19 i 24%. Świadczą one o podobnych warunkach oksydoredukcyjnych gleby, które występowały w poszczególnych kombinacjach oddzielnych doświadczeń, przeprowadzonych z

testowanymi roślinami. Wskazują na to również wartości średnie Eh 316 i 332 mV, wyliczone łącznie z uwzględnieniem wszystkich kombinacji i terminów pomiarowych obu roślin.

Wzajemne relacje pomiędzy porowatością powietrzną Eg a potencjałem redoks przedstawione na Rys. 13-14 opisano wielomianem stopnia drugiego i była ona istotna statystycznie w doświadczeniach z obu testowanymi roślinami, a wartości współczynników determinacji (R^2) wynosiły 0,95 i 0,91 odpowiednio dla pszenicy i pszenżyta. Zakres Eg 0-8% odpowiadał najniższym wartościom Eh, których średnie wynosiły od 116 do 202 mV. Wzrost porowatości powietrznej do 13% związany był z równoczesnym wzrostem Eh odpowiednio do 387 i 415 mV, zaś przy Eg=19% wartości Eh osiągnęły 434 i 421 mV. Dalszy wzrost porowatości powietrznej do 24% nie powodował już istotnych zmian Eh, które pozostawały na poziomie 461 i 481 mV. Świadczyło to o pełnym natlenieniu gleby przy tych wartościach Eg i o dominującym udziale "pary tlenu" – O_2/H_2O w tworzeniu wartości potencjału redoks, która w przypadku użytej do doświadczeń gleby (Eutric Cambisol) oscylowała wokół 460-480 mV.

13.2. Zmienność parametrów roślinnych w warunkach stresu tlenowego

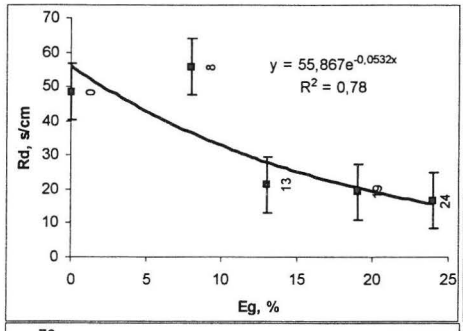
13.2.1. Rd

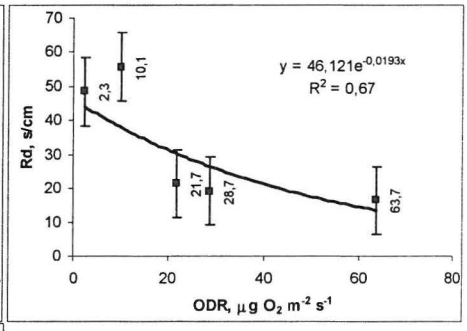
Pomiary oporu dyfuzyjnego aparatów szparkowych umożliwiły prześledzenie zmian spowodowanych stanem niedotlenienia w strefie korzeniowej. Porównanie wartości Rd u roślin rosnących w warunkach kontrolnych z poszczególnymi poziomami natlenienia, wskazuje na zdecydowaną reakcję w częściach nadziemnych roślin, których rizosfera pozostawała w warunkach stresowych.

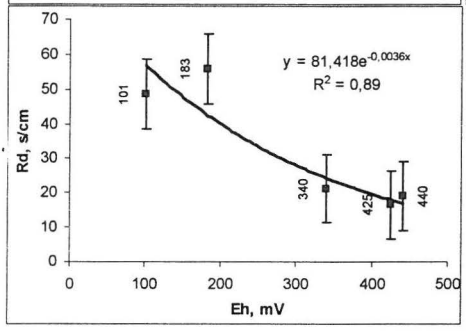
Zakres warunków aeracyjnych w glebie w przypadku pszenicy ozimej, przy których występował ostry wzrost oporu dyfuzyjnego odpowiadał wartości porowatości powietrznej poniżej 13%, wartości ODR niższych niż 25,6 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ oraz wartości potencjału oksydoredukcyjnego poniżej 387 mV. Zależności te, wyznaczone z doświadczeń z pszenicą ozimą przedstawiono na Rys. 15-17.

Doświadczenia z pszenżytem wskazały na wzrost oporu dyfuzyjnego aparatów szparkowych poniżej 19% Eg, które odpowiadały wartościom ODR ok.50$\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ i Eh poniżej 421 mV (Rys.18-20).

Wzrost wartości Rd zatem z poziomu 12,2 s cm^{-1} u pszenżyta i 20 s cm^{-1} u pszenicy obserwowany w warunkach pełnego natlenienia do 25 s cm^{-1} u pszenżyta i niemal 60 s cm^{-1} u pszenicy następował w stosunkowo wąskim zakresie Eg 13 –

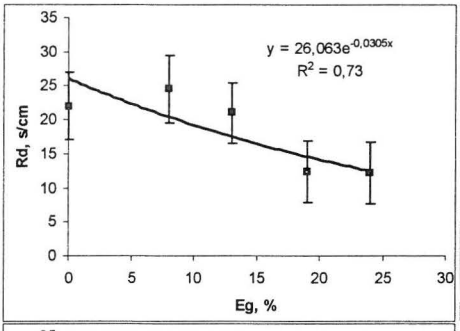


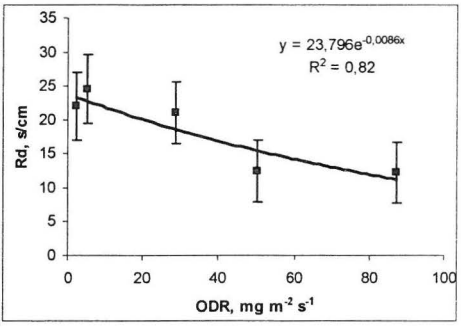


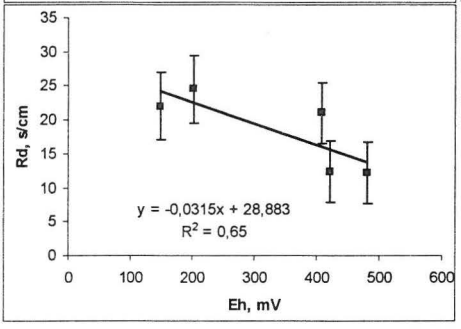


Rys. 15-17. Zmiany oporu dyfuzyjnego liści (Rd) w zależności od Eg, ODR i Eh u *Triticum aestivum* L.. Wartości średnie ± błąd standartowy.

Fig. 15–17. Changes of stomatal diffussive resistance (Rd) in relation to Eg, ODR and Eh (*Triticum aestivum* L.). Mean value ± standard deviation.







Rys. 18-20. Zmiany oporu dyfuzyjnego liści (Rd) w zależności od Eg, ODR i Eh u *Triticale*. Wartości średnie ± błąd standartowy.

Fig. 18–20. Changes of stomatal diffussive resistance (Rd) in relation to Eg, ODR and Eh (*Triticale*). Mean value ± standard deviation.

19% u obu roślin. Wskazuje to na szybką reakcję w częściach nadziemnych rośliny na zaistniałe niekorzystne warunki aeracyjne rizosfery związane z ograniczeniem mikrodyfuzji tlenu w zakresie 22-50 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$. Dalsze pogarszanie się stanu natlenienia systemu korzeniowego nie wywoływało już zmian Rd i świadczyło o wyczerpaniu możliwości adaptacyjnych.

13.2.2. Biomasa

Biomasę korzeni testowanych roślin w czasie trwania eksperymentu, przy różnych wartościach porowatości powietrznej gleby, przedstawiono w Tabeli 7.

Wartości bezwzględne biomasy korzeni pszenżyta po dwóch dniach trwania stresu w zakresie porowatości powietrznej od 8 do 13% wynosiły od 11,6 do 22,1g suchej masy w przeliczeniu na jeden wazon. W stosunku do biomasy korzeni w warunkach kontrolnych (Eg =24%) były to wartości o 27% niższe, natomiast przy Eg=0% stwierdzono aż 45% obniżenie biomasy korzeni. Utrzymywanie zadanych parametrów wywołało wyraźne zróżnicowanie biomasy korzeni w czasie. Po 7 dniach biomasa kontrolna (wartość średnia ze wszystkich doświadczeń) przekroczyła ponad dwukrotnie masę korzeni rosnących w warunkach anoksji, zaś po 12 dniach biomasa korzeni rozwijających się przy Eg=0 stanowiła 63% wartości kontrolnej.

U pszenicy Rosa ubytek masy korzeniowej w pierwszej fazie stresu był mniej wyraźny i stanowił w warunkach anoksji po 2 dniach nie więcej niż 15% wartości kontrolnych, po 7 dniach 38% a po 12 dniach przekroczył 42%.

Rozpatrując procentowe przyrosty korzeni i części nadziemnych w stosunku do kontroli (Rys. 21-22), po 7 i 12 dniach utrzymywanej gradacji stanu natlenienia, stwierdzono wyraźne ich zróżnicowanie. Maksymalna biomasa korzeni pszenżyta wystąpiła przy porowatości powietrznej 19%, co zaznaczyło się już po 7 dniach i wystąpiło szczególnie wyraźnie w 12 dniu. U pszenicy tendencja taka zauważana była dopiero po upływie 12 dni. W zakresie zaś Eg = 13-24% nie stwierdzono znacznych różnic w biomasie zarówno korzeni jak i części nadziemnych (Tabela 8).

Po 12 dniach anoksji glebowej, biomasa korzeni (w przeliczeniu na suchą masę) stanowiła 63% i 58% odpowiednio u pszenżyta i pszenicy, w odniesieniu do warunków maksymalnej aeracji. To zdecydowane obniżenie biomasy korzeni wystąpiło równocześnie z obniżeniem biomasy części nadziemnych zachodzącym już przy natlenieniu odpowiadającym 13% porowatości powietrznej bądź ODR = 27 $\mu g\ m^{-2}\ s^{-1}$, osiągając w warunkach anoksji 45% biomasy kontrolnej u pszenżyta oraz 83% tejże u pszenicy.

Tabela 7. Biomasa* korzeni pszenicy ozimej odmiany Rosa oraz pszenżyta CZR 1406 w czasie trwania trzech różnych okresów doświadczalnych (I, II, III) po upływie 2, 7 i 12 dni oraz wartości średnie ze wszystkich doświadczeń. (Wartości w przeliczeniu na 1 wazon)

Table 7. Root biomass (g/pot) of *Triticum aestivum* L. var. Rosa and *Triticale* var CZR 1406 during three experimental cycles (I, II, III) after 2, 7, and 12 days and their mean values (± standard deviation) for all experimental cycles, treatments and varieties

Porowatość powietrzna (Eg)	Biomasa korzeni (g s. m. /wazon) CZR 1406 Dzień				Biomasa korzeni (g s. m. /wazon) Rosa Dzień			
	2	7	12	Średnia	2	7	12	Średnia
I								
0%	12,0 ± 1,1	12,0 ± 1,2	8,0 ± 0,6	10,67 ± 3,1	14,0 ± 1,1	10,0 ± 0,6	12,0 ± 1,1	12,0 ± 1,1
8%	16,0 ± 1,4	15,0 ± 1,4	15,0 ± 1,2	15,33 ± 2,8	14,0 ± 1,3	17,0 ± 1,5	23,0 ± 2,2	21,33 ± 2,0
13%	16,0 ± 1,3	19,0 ± 2,0	24,0 ± 1,7	19,67 ± 1,7	15,0 ± 2,1	25,0 ± 2,4	32,0 ± 2,8	24,0 ± 2,2
19%	16,0 ± 1,3	29,0 ± 2,2	21,0 ± 1,8	22,0 ± 2,0	13,0 ± 1,7	23,0 ± 2,2	32,0 ± 2,6	22,67 ± 2,0
24%	22,0 ± 2,4	27,0 ± 1,7	39,0 ± 2,4	29,33 ± 2,3	17,0 ± 2,2	30,0 ± 2,6	23,0 ± 2,2	23,33 ± 2,1
II								
0%	14,9 ± 1,3	19,9 ± 2,1	34,3 ± 2,6	23,03 ± 2,1	19,5 ± 1,5	18,7 ± 1,5	32,6 ± 3,1	23,60 ±2,2
8%	17,23 ± 1,8	22,8 ± 1,6	43,9 ± 3,8	27,98 ± 2,6	20,3 ± 1,8	22,1 ± 2,4	36,5 ± 3,4	26,30 ± 2,4
13%	22,1 ± 2,0	30,1 ± 1,8	53,8 ± 4,2	35,33 ± 2,8	20,1 ± 1,7	24,6 ± 2,6	62,1 ± 5,0	35,60 ± 3,2
19%	23,95 ± 2,1	30,6 ± 2,3	60,6 ± 3,3	38,38 ± 3,2	22,1 ± 1,6	26,6 ± 2,3	64,2 ± 5,2	37,63 ± 3,4
24%	20,8 ± 2,4	28,8 ± 2,1	71,7 ± 2,6	40,43 ± 4,2	23,3 ± 2,2	26,7 ±2,4	64,5 ± 5,2	38,17 ± 3,5
III								
0%	11,38 ± 1,8	6,27 ± 3,2	10,49 ± 1,2	9,38 ± 0,8	14,0 ± 0,9	13,92 ± 1,2	13,63 ± 1,4	13,85 ± 1,4
8%	11,66 ± 1,2	10,57 ± 3,3	10,42 ± 1,4	10,88 ± 1,3	14,66 ± 1,2	13,47 ± 1,4	11,63 ± 1,2	13,25 ± 1,1
13%	11,92 ± 1,6	12,65 ± 3,8	10,03 ± 1,1	11,53 ± 1,1	18,25 ± 1,6	13,67 ± 1,8	13,82 ± 1,1	15,25 ± 1,3
19%	11,4 ± 1,8	12,68 ± 4,2	13,80 ± 1,2	12,63 ± 0,8	11,63 ± 1,1	14,55 ± 2,1	13,35 ± 1,2	13,18 ± 1,1
24%	12,77 ± 2,1	15,75 ± 3,7	12,47 ± 1,5	13,66 ± 1,2	13,3 ± 1,2	11,76 ± 1,3	12,14 ± 1,1	12,40 ± 1,0
Średnia	16,01	19,47	28,57	Średnia	16,68	19,40	33,90	

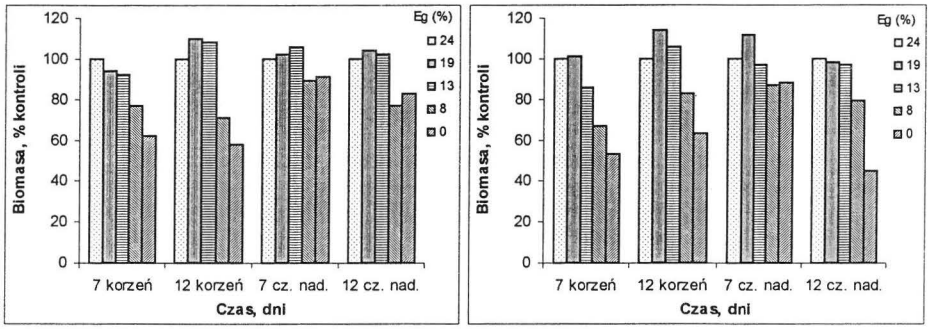
(*Biomasa w poszczególnych terminach danej kombinacji jest średnią z 3 pomiarów, zaś wartości średnie w danym dniu we wszystkich trzech okresach i kombinacjach są średnią z 45 pomiarów).

Tabela 8. Biomasa* części nadziemnych *Triticum aestivum* L. odmiany Rosa oraz *Triticale* ród CZR 1406 w czasie trwania trzech różnych okresów doświadczalnych (I, II, III) po upływie 2, 7 i 12 dni oraz wartości średnie wszystkich doświadczeń. (Wartości w przeliczeniu na 1 wazon)

Table 8. Shoot biomass (g/pot) of *Triticum aestivum* L. var. Rosa and *Triticale* var CZR 1406 during three experimental cycles (I, II, III) after 2, 7, and 12 days and their mean values (± standard deviation) for all experimental cycles, treatments and varieties

Porowatość powietrzna (Eg)	Biomasa części nadziemnych (g.s.m./wazon) CZR 1406 Dzień				Biomasa części nadziemnych (g.s.m./wazon) Rosa Dzień			
	2	7	12	Średnia	2	7	12	Średnia
I								
0%	35,0 ± 7,0	66,0 ± 2,4	15,0 ± 25	38,67 ± 3,5	40,0 ± 3,6	71,0 ± 3,5	76,0 ± 4,2	62,33 ± 3,1
8%	32,0 ± 6,4	64,0 ± 3,2	80,0 ± 3,5	58,67 ± 4,5	40,0 ± 3,4	69,0 ± 4,1	82,0 ± 3,8	63,67 ± 2,8
13%	35,0 ± 7,0	69,0 ± 3,5	76,0 ± 3,2	60,00 ± 2,8	35,0 ± 2,8	84,0 ± 2,8	105,0 ± 4,1	74,67 ± 4,2
19%	39,0 ± 7,6	74,0 ± 3,2	81,0 ± 4,2	64,67 ± 2,3	39,0 ± 3,2	82,0 ± 2,9	97,0 ± 3,6	72,67 ± 4,3
24%	42,0 ± 8,0	67,0 ± 6,4	90,0 ± 4,3	66,33 ± 2,6	45,0 ± 2,1	74,0 ± 4,2	96,0 ± 3,2	71,67 ± 3,4
II								
0%	20,6 ± 4,0	46,4 ± 5,2	94,3 ± 4,5	53,76 ± 3,1	22,9 ± 1,8	55,9 ± 2,6	144,0 ± 5,5	74,26 ± 3,2
8%	22,7 ± 4,5	51,8 ± 8,1	139,3 ± 3,2	71,26 ± 2,0	22,7 ± 1,2	55,0 ± 2,8	121,0 ± 5,3	66,23 ± 6,1
13%	24,8 ± 5,0	52,2 ± 4,5	189,7 ± 2,8	88,9 ± 3,0	19,8 ± 1,4	63,3 ± 2,4	176,0 ± 5,4	86,36 ± 5,8
19%	22,8 ± 4,0	72,0 ± 3,6	189,3 ± 2,4	94,7 ± 2,8	20,9 ± 2,1	58,0 ± 3,2	183,0 ± 6,2	87,3 ± 6,2
24%	22,1 ± 4,2	55,7 ± 8,2	186,0 ± 2,3	87,93 ± 3,1	26,4 ± 2,3	58,6 ± 3,2	175,7 ± 7,1	86,9 ± 3,6
III								
0%	40,5 ± 6,5	41,0 ± 4,3	36,5 ± 3,1	39,3 ± 4,2	68,8 ± 3,2	68,5 ± 3,2	58,7 ± 2,8	65,3 ± 4,5
8%	37,4 ± 6,4	35,3 ± 4,2	34,7 ± 3,3	35,8 ± 3,8	67,4 ± 3,4	67,7 ± 3,2	56,7 ± 3,2	63,9 ± 5,4
13%	41,0 ± 7,5	47,9 ± 5,2	47,6 ± 2,9	45,5 ± 2,1	70,1 ± 2,6	81,3 ± 4,3	64,2 ± 6,4	71,9 ± 6,2
19%	35,7 ± 6,2	48,4 ± 5,1	46,5 ± 3,1	43,5 ± 2,8	65,8 ± 2,8	79,2 ± 3,8	69,0 ± 3,1	71,3 ± 5,8
24%	40,6 ± 6,5	51,1 ± 9,4	46,5 ± 3,3	46,1 ± 3,2	73,0 ± 3,2	82,0 ± 4,2	65,5 ± 3,2	73,5 ± 7,2
Średnia	32,75	56,12	90,16	Średnia	43,65	69,97	104,6	

(*Biomasa dla poszczególnych terminów danej kombinacji jest średnią z 3 pomiarów, zaś wartości średnie w danym dniu dla wszystkich trzech cykli i kombinacji są średnią z 45 pomiarów).

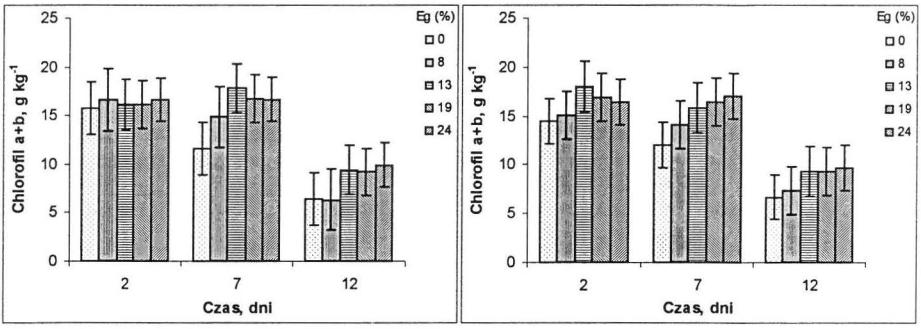


Rys. 21-22. Procentowe przyrosty korzeni i części nadziemnych w 7-ym i 12-ym dniu od rozpoczęcia stresu tlenowego przy 5 poziomach natlenienia gleby (*Triticale* - CZR 1406).
Fig. 21–22. Increase of root and shoot biomass (%) after 7 and 12 days of oxygen stress at 5 levels (*Triticale* - CZR 1406).

Generalnie można stwierdzić, że zahamowanie przyrostu biomasy korzeni jak i części nadziemnych jest dowodem zakłóconej równowagi pomiędzy gromadzeniem produktów fotosyntezy i ich zużytkowaniem w procesie oddychania roślin, wynikającej z dostępności tlenu w strefie korzeniowej.

13.2.3. Chlorofil a+ b

Zawartość chlorofili *a* i *b* w liściach roślin, przebywających w zmiennych warunkach aeracji, różnicowała się wyraźnie w czasie przebiegu eksperymentu (Rys. 23-24).



Rys. 23-24. Zawartość chlorofili a+b w liściach (*Triticale* - CZR 1406 i *Triticum aestivum* var. Rosa) przy 5 poziomach porowatości powietrznej (Eg). Wartości średnie ± błąd standardowy.
Fig. 23–24. Chlorophyl a+b content (*Triticale* - CZR 1406 and *Triticum aestivum* var. Rosa) at 5 values of air porosity (Eg). Mean value ± standard deviation.

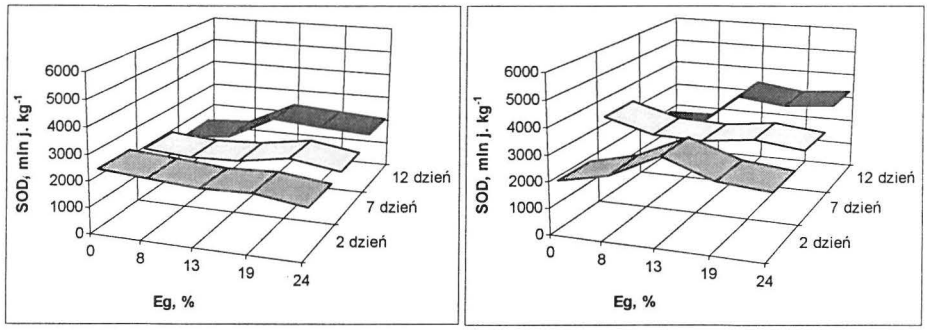
Okres pierwszych dwóch dni działania warunków anoksji nie powodował widocznych zmian w zawartości tych barwników a ich poziom wynosił ok. 15 g kg^{-1} i był podobny we wszystkich kombinacjach natlenienia. W pierwszej fazie doświadczeń różnice pomiędzy badanymi roślinami nie zaznaczyły się wyraźnie, wykazując jedynie nieco większy poziom w zawartości sumy chlorofili u pszenżyta w porównaniu z pszenicą. Po upływie 7 dni działania ograniczonego natlenienia, nastąpiło wyraźne zróżnicowanie zawartości chlorofili pomiędzy kombinacjami. U obu roślin obserwowano zdecydowane obniżenie poziomu sumy chlorofili, gdy porowatość powietrzna gleby osiągała wartość poniżej 13%. Od tego poziomu notowano stałe obniżanie stężenia pigmentów, których stężenie przy Eg= 0%, stanowiło ok.75% wartości kontrolnych u obu testowanych roślin. Podczas następnych dni ograniczonego natlenienia w strefie korzeniowej, obserwuje się powiększenie tego efektu i w końcowej fazie eksperymentu, suma chlorofili w kombinacji odpowiadającej 0% porowatości powietrznej stanowiła ok. 75% tej wartości jaką oznaczono u roślin wzrastających w warunkach pełnej aeracji. Wyznaczone wartości krytyczne parametrów natlenienia, warunkujące obniżenie poziomu chlorofili *a* + *b* wynoszą: porowatość powietrzna Eg= 13% lub mikrodyfuzja tlenu ODR na poziomie 27 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$.

13.2.4. SOD

Poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, oznaczanej w różnych terminach eksperymentu w korzeniach i częściach nadziemnych testowanych roślin, w zakresie od 0 do 24% porowatości powietrznej, przedstawiono na Rys. 25-28. Obie testowane rośliny różniły się poziomem aktywności SOD, a jego zakres w przypadku pszenżyta rodu CZR 1406 był niższy w korzeniach i wynosił 1000-2500 mln jednostki kg^{-1}, podczas gdy u pszenicy odmiany Rosa zawierał się w przedziale 1750-3000 mln jednostki kg^{-1}.

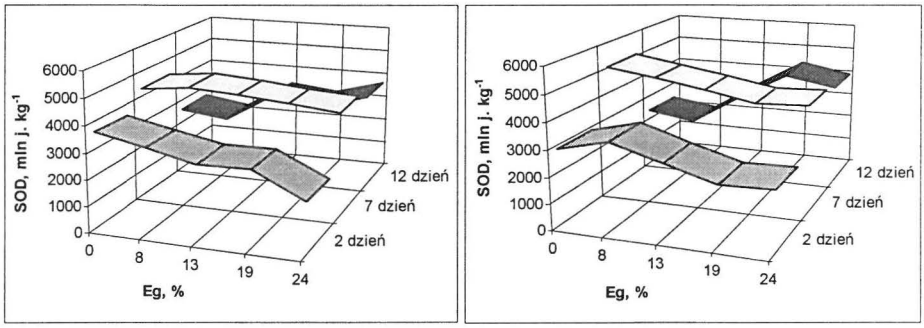
Zmiany aktywności SOD korzeni w czasie były relatywnie podobne, gdyż u obu rośliny notowano wyraźny stały spadek aktywności SOD w warunkach anoksji do wartości 1200 i 2000 mln jednostki kg^{-1} odpowiednio dla pszenżyta i pszenicy. Przy porowatości zaś 8% w korzeniach obu roślin stwierdzano po 7 dniach podwyższenie aktywności SOD a następnie jego spadek u pszenżyta, podczas gdy u pszenicy aktywność ta na podwyższonym poziomie utrzymywała się do końca prowadzonego eksperymentu. Przy uwilgotnieniu gleby, odpowiadającym 13% porowatości powietrznej, stwierdzano u pszenżyta stały spadek aktywności, lecz nieco mniejszy niż w przypadku 0% porowatości. Niski poziom aktywności (1000 mln jednostek kg^{-1}) występował u pszenżyta CZR 1406

przy porowatości 19% do 7 dniach, po czym ponad dwukrotny jego wzrost notowano w ciągu następnych 5 dni. U pszenicy, przy tej porowatości, po upływie 7 dni nastąpił wyraźny spadek aktywności, a po okresie 12 dni powrót do poziomu wyjściowego. Przy wysokich wartościach porowatości powietrznej (24%) następowało w czasie niewielkie obniżenie aktywności SOD w korzeniach obu roślin.



Rys. 25-26. Aktywność SOD w korzeniach *Triticale* - CZR 1406 i *Triticum aestivum* var. Rosa po 2, 7, 12 dniach od rozpoczęcia stresu tlenowego przy 5 poziomach porowatości powietrznej gleby (Eg).

Fig. 25–26. SOD activity in roots *Triticale* - CZR 1406 and *Triticum aestivum* var. Rosa after 2, 7, 12 days of oxygen stress at 5 levels of air porosity (Eg).



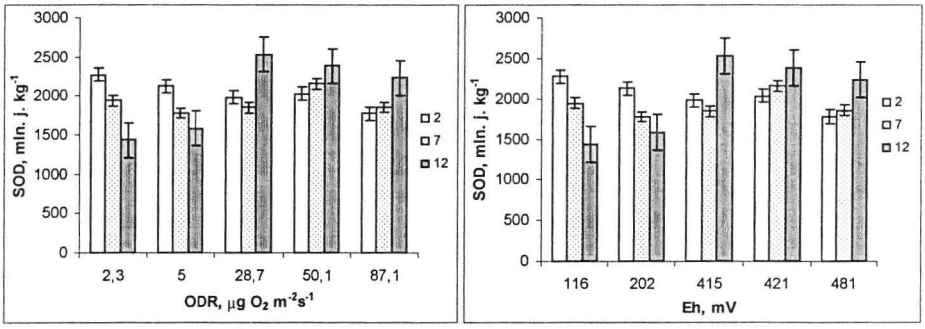
Rys. 27-28. Aktywność SOD w liściach *Triticale* - CZR 1406 i *Triticum aestivum* var. Rosa w funkcji Eg w czasie trwania stresu.

Fig. 27–28. SOD activity in leaves *Triticale* - CZR 1406 and *Triticum aestivum* var. Rosa as a function of Eg during oxygen stress.

Zakres aktywności SOD, określany w środkowej partii, ostatnich, wykształconych liści, zawierał się w szerokim przedziale 1000-4500 mln jednostek kg^{-1} u pszenżyta oraz 1000-5000 mln jednostek kg^{-1} u pszenicy. W całym zakresie

Eg obserwowano wzrost aktywności SOD w liściach obu roślin w czasie trwania eksperymentu.

Efekt podwyższonej aktywności SOD dostrzegany był w korzeniach pszenicy już po upływie 2 dni, przy porowatości 13%, podczas gdy u pszenżyta wystąpił on odpowiednio po 12 dniach. U pszenżyta stwierdzono słabszą reakcję roślin, w postaci zmian aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w korzeniach w zależności od stanu natlenienia gleby, w porównaniu z pszenicą, gdzie reakcja była widoczna już po dwóch dniach. Ponadto stwierdzono, że po siedmiu dniach w korzeniach roślin, utrzymywanych w warunkach anoksji, u pszenicy wystąpiło podwyższenie aktywności SOD. Po upływie zaś 12 dni u obu roślin, spadek aktywności SOD w korzeniach, był notowany przy wartości ODR < 29 μg O_2 m^{-2} s^{-1} (Rys. 29 i 31) oraz Eh< 400 mV (Rys.30 i 32).



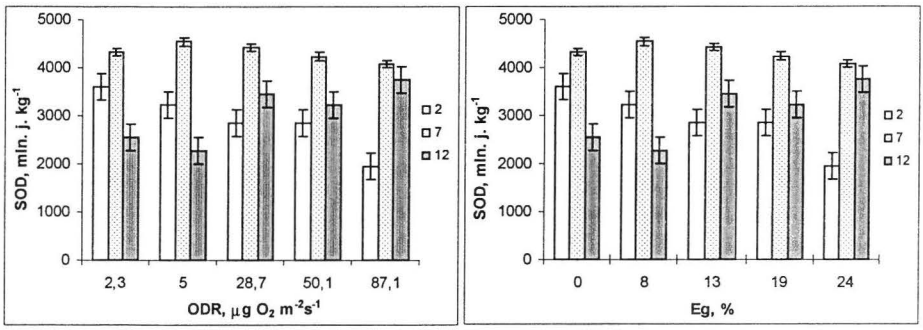
Rys. 29-30. Aktywność SOD w korzeniach *Triticale* - CZR 1406 w funkcji ODR i Eh po 2, 7 i 12 dniach trwania stresu tlenowego.

Fig. 29-30. SOD activity in roots of *Triticale* - CZR 1406 as a function of ODR and Eh after 2, 7 and 12 days of oxygen stress.

W częściach nadziemnych stwierdzono najwyższą aktywność SOD w liściach obu testowanych roślin po siedmiu dniach, przy czym w odmianie Rosa dochodziła ona do 5000 mln jednostki kg^{-1}. W dalszej fazie eksperymentu, aktywność SOD w liściach obniżała się, co zwłaszcza było widoczne w kombinacjach doświadczenia, gdzie wystąpiło ograniczone natlenienie odpowiadające 8% porowatości powietrznej (Eg) oraz ODR < 5,5 μg O_2 m^{-2} s^{-1}. W stanie pełnej anoksji w strefie korzeniowej, poziom SOD w liściach sięgał 4500 i 5000 mln jednostek kg^{-1} po 7 dniach, odpowiednio dla CZR 1406 i Rosa (Rys. 31 i 33).

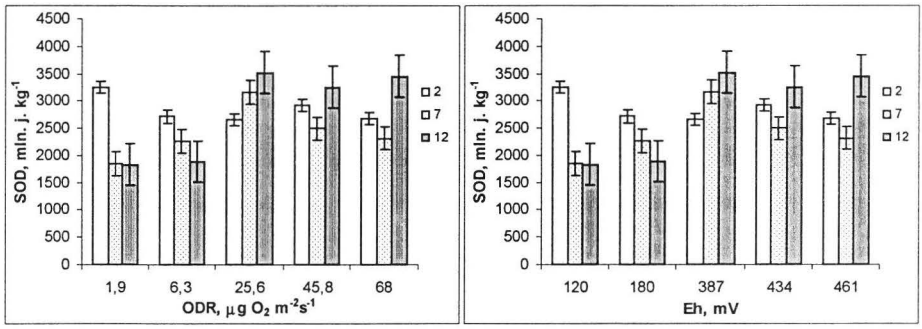
Warunki oksydoredukcyjne, jakie wystąpiły w glebie po upływie 12 dni od zaistnienia stresu tlenowego wywołały w obu testowanych roślinach, spadek

aktywności SOD zarówno w korzeniach jak i w liściach notowany przy wartościach Eh< 400 mV (Rys.30-36), świadczący o zaniku reakcji obronnej.



Rys. 31-32. Aktywność SOD w liściach *Triticale* - CZR 1406 w funkcji ODR i Eh po 2, 7 i 12 dniach trwania stresu tlenowego.

Fig. 31-32. SOD activity in leaves of *Triticale* - CZR 1406 as a function of ODR and Eh after 2, 7 and 12 days of oxygen stress.

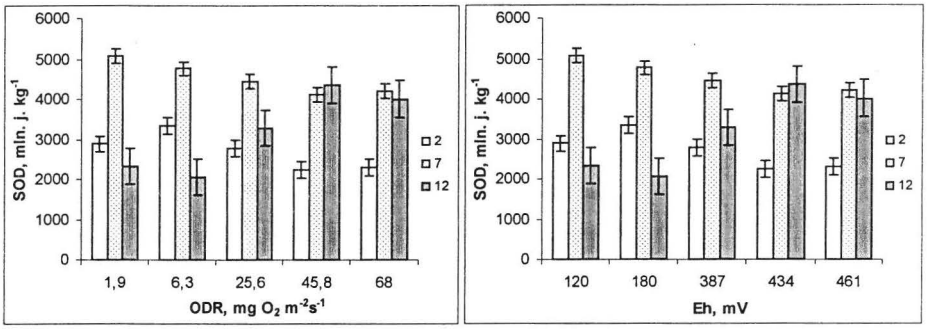


Rys. 33-34. Aktywność SOD w korzeniach (*Triticum aestivum* var. Rosa) w funkcji ODR i Eh po 2, 7 i 12 dniach trwania stresu tlenowego.

Fig. 33-34. SOD activity in roots of (*Triticum aestivum* var. Rosa) as a function of ODR and Eh after 2, 7 and 12 days of oxygen stress.

Wymiernym dowodem zaistnienia sprawnego systemu obronnego roślin był wzrost o 20-30% aktywności SOD w korzeniach odpowiednio pszenicy i pszenżyta, stwierdzony już w drugim dniu stresu tlenowego w glebie. W siódmym dniu stresu, wzrost aktywności utrzymywał się zarówno u pszenżyta jak i u pszenicy przy Eh 421 i 387 mV, podczas gdy w pozostałych kombinacjach ograniczonego natlenienia obserwowano spadek aktywności SOD w korzeniach. Na koniec doświadczenia, przy porowatości powietrznej gleby od 0 do 8%, w

korzeniach obu roślin obserwowano spadek aktywności SOD do połowy poziomu kontrolnego.



Rys. 35-36. Aktywność SOD w liściach *Triticum aestivum* var. Rosa w funkcji ODR i Eh po 2, 7 i 12 dniach trwania stresu tlenowego.
Fig. 35-36. SOD activity in leaves of *Triticum aestivum* var. Rosa as a function of ODR and Eh after 2, 7 and 12 days of oxygen stress.

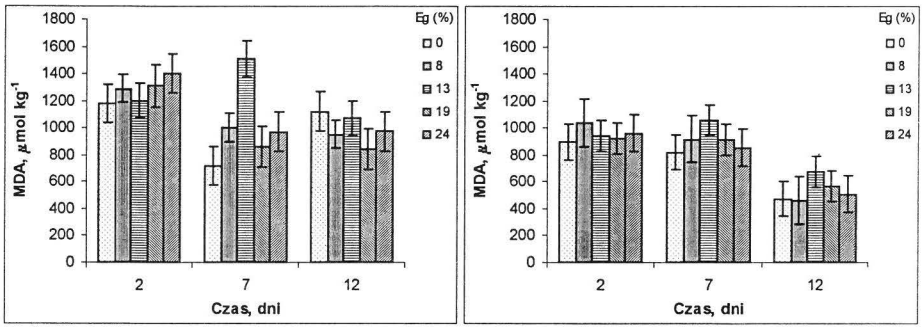
W liściach po siedmiu dniach stresu notowano wzrost aktywności SOD rzędu 10% u CZR 1406 i 30% u Rosa, który został zahamowany w końcowej fazie doświadczenia do poziomu 50% aktywności stwierdzonej u roślin kontrolnych. Zdolność obronna badanych roślin utrzymywała się zatem w czasie pierwszego tygodnia stresu i uległa załamaniu w trakcie drugiego tygodnia silnej anaerobiozy.

13.2.5. MDA

Analizowany poziom dialdehydu malonowego w homogenacie tkanki korzeni i części nadziemnych roślin, poddawanych warunkom ograniczonego natlenienia w strefie korzeniowej, ulegał wyraźnym zmianom w czasie trwania eksperymentu (Rys. 37-40).

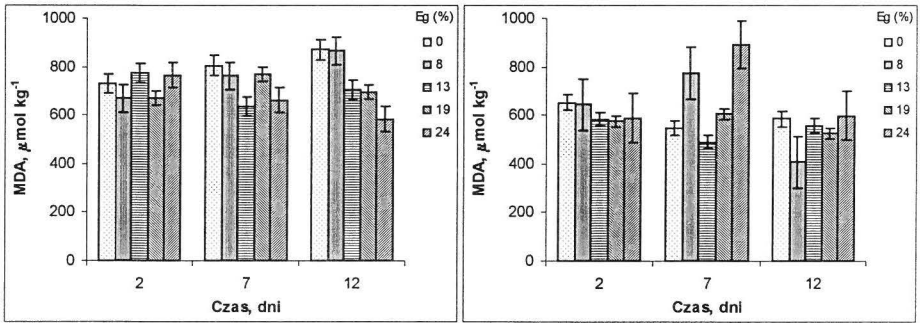
Poziom MDA zarówno w korzeniach jak i w częściach nadziemnych pszenżyta był o 40% wyższy niż u pszenicy. U testowanych roślin po upływie dwóch dni od zróżnicowania warunków aeracyjnych, poziom MDA pozostawał bez zmian w poszczególnych kombinacjach natlenienia. Przedłużanie okresu trwania zadanych parametrów wywołało po 7 dniach reakcję związaną z podwyższonym poziomem MDA. Zarówno u pszenżyta jak i u pszenicy w tym czasie stwierdzany był maksymalny poziom MDA, wyższy od kontrolnych wartości o 50%, który wystąpił przy Eg= 13% i ODR= 27 μg O_2 m^{-2} s^{-1}.

Zawartość MDA w korzeniach badanych roślin pozostawała na poziomie wyższym o 20% niż w liściach i we wszystkich kombinacjach natlenienia wzrastała do 7 dnia stresu. W 12 dniu u pszenżyta obserwowano wzrost poziomu MDA w kombinacjach przy Eg< 13%, podczas gdy u pszenicy była raczej stabilna w całym zakresie porowatości powietrznej.



Rys. 37-38. Poziom MDA w korzeniach *Triticale* - CZR 1406 i *Triticum aestivum* var. Rosa po 2, 7 i 12 dniach stresu tlenowego przy 5 poziomach porowatości powietrznej (Eg). Wartości średnie ± błąd standardowy.

Fig. 37-38. MDA level in roots of *Triticale* - CZR 1406 and *Triticum aestivum* var. Rosa after 2, 7 and 12 days of oxygen stress at 5 levels of air porosity (Eg). Mean value ± standard deviation.



Rys. 39-40. Poziom MDA w liściach *Triticale* - CZR 1406 i *Triticum aestivum* var. Rosa po 2, 7 i 12 dniach stresu tlenowego przy 5 poziomach porowatości powietrznej (Eg). Wartości średnie ± błąd standardowy.

Fig. 39-40. MDA level in leaves of *Triticale* - CZR 1406 and *Triticum aestivum* var. Rosa after 2, 7 and 12 days of oxygen stress at 5 levels of air porosity (Eg). Mean value ± standard deviation.

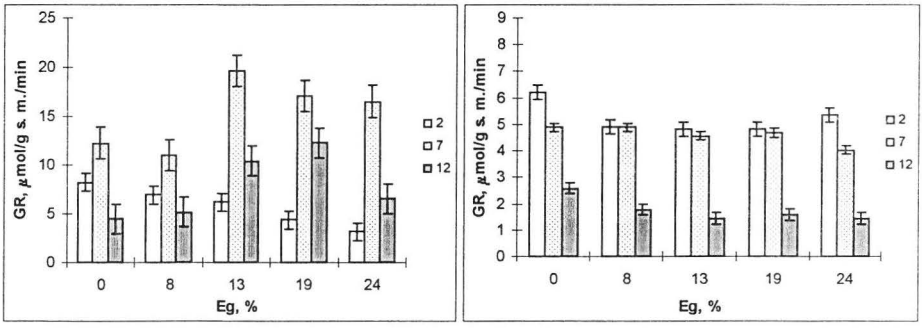
Generalnie dało się zauważyć wyższy poziom MDA w korzeniach (po 7 dniach) i w częściach nadziemnych (po 12 dniach) pszenżyta, rosnącego w warunkach anoksji o ok. 20-30%, w porównianiu z kontrolą. Wyższy poziom MDA zarówno w korzeniach jak i w częściach nadziemnych u pszenżyta może

wskazywać na bardziej intensywną destrukcję błon komórkowych, co szczególnie było widoczne po 12 dniach stresu tlenowego.

13.2.6. GR

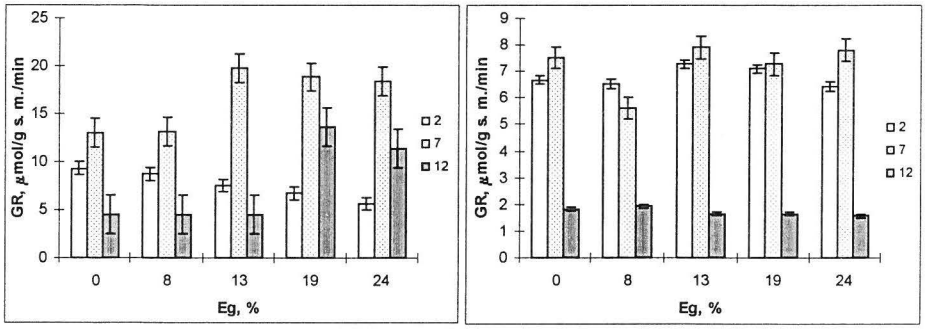
Zmiany aktywności reduktazy glutationowej w korzeniach i liściach testowanych roślin, w trakcie prowadzonego eksperymentu, wykazywały zdecydowane zróżnicowanie w czasie i były uzależnione od dostępności tlenu w rizosferze.

Poziom aktywności GR w korzeniach obu roślin zawierał się w przedziale 2-20 μmol g.s.m.$^{-1}$min^{-1} (Rys. 41-44). W drugim dniu zróżnicowania warunków tlenowych w glebie, wartość aktywności GR w korzeniach roślin kontrolnych była na poziomie 2 μmol g.s.m.$^{-1}$min^{-1} u pszenżyta i 5μmol g.s.m.$^{-1}$ min^{-1} u pszenicy ozimej. Wartość ta wyraźnie wzrastała w miarę zmniejszania się porowatości powietrznej gleby, przewyższając swój poziom ponad trzykrotnie u pszenżyta i dwukrotnie u pszenicy w warunkach anoksji przy Eg = 0%. Największe wartości GR stwierdzano po siedmiu dniach od zróżnicowania warunków tlenowych u obu roślin, z tendencją do maksimum przy porowatości powietrznej Eg = 13%, gdzie oba gatunki roślin wykazywały w korzeniach aktywność GR na poziomie 20 μmol g.s.m.$^{-1}$min^{-1}.



Rys. 41-42. Aktywność GR w korzeniach i liściach *Triticale* - CZR 1406 po 2, 7 i 12 dniach stresu tlenowego przy 5 poziomach porowatości powietrznej (Eg). Wartości średnie ± błąd standardowy.
Fig. 41-42. GR activity in roots and leaves *Triticale* - CZR 1406 after 2, 7 and 12 days of oxygen stress at 5 levels of air porosity (Eg). Mean value ± standard deviation.

Aktywność GR po 12 dniach eksperymentu ulegała wyraźnemu obniżeniu w korzeniach obu gatunków. Aktywność ta była dwukrotnie wyższa u pszenżyta i trzykrotnie u pszenicy przy porowatości powietrznej Eg = 19% w porównaniu z notowaną u roślin przy Eg=0 i 8%.



Rys. 43-44. Aktywność GR w korzeniach i liściach *Triticum aestivum* var. Rosa po 2, 7 i 12 dniach stresu tlenowego przy 5 poziomach porowatości powietrznej (Eg). Wartości średnie ± błąd standardowy.

Fig. 43-44. GR activity in roots and leaves of *Triticum aestivum* var. Rosa after 2, 7 and 12 days of oxygen stress at 5 levels of air porosity (Eg). Mean value ± standard deviation.

Aktywność GR w liściach była kilkakrotnie niższa w porównaniu z aktywnością oznaczaną w korzeniach i osiągała maksymalnie 6 μmol g.s.m.$^{-1}$ min^{-1} u pszenżyta i 8μmol g.s.m.$^{-1}$min^{-1} u pszenicy (Rys.43, 44). Poziom tej aktywności utrzymywał się przez pierwszych siedem dni przy wszystkich wartościach porowatości powietrznej u obu testowanych roślin. Dalsze przedłużanie okresu stresowego powodowało obniżenie aktywności GR trzykrotne u pszenżyta i pięciokrotne u pszenicy przy Eg poniżej 13%. Jednakże w warunkach hipoksji w tym czasie notowano u pszenżyta poziom aktywności GR w korzeniach dwukrotnie wyższy niż w warunkach kontrolnych.

Podsumowując należy stwierdzić, że włączenie się reduktazy glutationowej w system zabezpieczający roślinę przed niekorzystnymi warunkami tlenowymi zaznacza się szczególnie w pierwszym tygodniu trwania stresu i dotyczy zarówno korzeni jak i części nadziemnych badanych roślin. Wyższy poziom GR notowany w liściach pszenicy wskazuje na jej większą odporność na niedotlenienie w porównaniu z pszenżytem.

14. PODSUMOWANIE

Postawiony zasadniczy problem, na ile zróżnicowanie stanu natlenienia w środowisku glebowym znalazło odbicie w wydajności aparatu fotosyntetycznego, charakteryzowanego oporem dyfuzyjnym aparatów szparkowych i poziomem chlorofili, a w konsekwencji - przyrostem biomasy roślin, próbowano rozstrzygnąć w modelowych badaniach jednej odmiany pszenicy (Rosa) oraz

pszenżyta rodu CZR 1406, różniących się głębokością korzenienia w warunkach zalania gleby.

Wykazane zależności pomiędzy stanem aeracyjnym środowiska glebowego, wyrażonym wartością porowatości powietrznej (Eg), bądź też mikrodyfuzją tlenu do korzeni roślin (ODR), jak również wartością potencjału oksydoredukcyjnego (Eh), wskazują na ścisłą zależność pomiędzy warunkami fizykochemicznymi w rizosferze a reakcją fizjologiczną rośliny.

W literaturze wykazano, iż różne stresy środowiskowe jak np: niekorzystna temperatura, okresy suszy, patogeny czy obecność metali ciężkich oraz nadtlenków organicznych [115] powodują jednolity rodzaj reakcji w organizmie polegający na generowaniu aktywnych form tlenu. Z kolei system antyoksydacyjny, dzięki istnieniu "zmiataczy" wolnych rodników, decyduje o odporności organizmu na zaistniały stres [10, 11].

Ze względu na fakt, że generowanie aktywnych form tlenu zachodzi głównie w chloroplastach, tam też zdaniem wielu autorów, powinny pojawiać się duże ilości antyoksydantów np. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) czy też reduktazy glutationowej (GR).

W przedstawionych w niniejszej pracy wynikach badań eksperymentalnych wykazano podwyższenie aktywności SOD oraz poziomu MDA u pszenżyta już po dwóch dniach niedotlenienia co nie znajdowało jeszcze odbicia w obniżeniu biomasy korzeni. Notowany najwyższy poziom MDA, u obu testowanych odmian pszenicy w drugim dniu stanu anoksji, ulegał w okresie późniejszym systematycznemu obniżeniu. Natomiast w korzeniach stwierdzano po 7 dniach przy Eg=13% maksymalny poziom reduktazy glutationowej, odpowiedzialnej za rozkład nagromadzonego GSSG. Równocześnie (po 7 dniach) obserwowano w korzeniach spadek poziomu MDA poczynając już od porowatości powietrznej 19%. W tym samym okresie obserwowano maksymalny poziom reduktazy glutationowej w korzeniach. Dalsze utrzymywanie roślin w warunkach stresowych, związane było (po 12 dniach) ze wzrostem aktywności SOD (przy Eg=0%) i GR do poziomu maksymalnego obserwowanego przy Eg=13%. Wystąpiło to u obu testowanych roślin. Biomasa korzeni w tym czasie uległa wyraźnemu zredukowaniu do 50% u pszenżyta i do 33% u pszenicy pozostających w warunkach anoksji.

Odpowiedź części nadziemnych pszenicy i pszenżyta, pozostawała w ścisłym związku ze stanem aeracji w strefie korzeniowej, znajdując odbicie we wzroście aktywności SOD, lecz znacznie później bo dopiero po 7 dniach. W przypadku korzeni efekt ten wystąpił już po 2 dniach trwania stresu tlenowego. Wówczas to

u obu gatunków roślin stwierdzano maksymalne wartości aktywności SOD. Po upływie 12 dni stresu maksymalne wartości aktywności SOD wystąpiły w liściach przy Eg=13%. Również przy tej samej wartości porowatości powietrznej obserwowano najwyższe wartości MDA w tym czasie u pszenicy, podczas gdy poziom maksymalny poziom MDA u pszenżyta wystąpił przy Eg=19%. Aktywność reduktazy glutationowej w liściach pszenżyta dochodziła do wartości maksymalnych po 12 dniach przy Eg=0%. U pszenicy w tym czasie nie dostrzegano już istotnych różnic w aktywności GR pomiędzy poszczególnymi poziomami natlenienia.

Biomasa części nadziemnych zarówno pszenżyta jak i pszenicy ulegała wyraźnemu obniżeniu przy porowatości powietrznej poniżej 13 % (ODR< 27 μg O_2 m^{-2} s^{-1} i Eh< 400 mV). Szczególnie duże zmniejszenie biomasy części nadziemnych, sięgającemce 50% stwierdzono u pszenżyta, podczas gdy u pszenicy straty te wynosiły zaledwie 13 % w tych warunkach aeracji.

Warunki hipoksji w strefie korzeniowej, powodowały wzrost oporu dyfuzyjnego aparatów szparkowych (Rd) u obu roślin, jednakże u pszenicy obserwowano trzykrotny wzrost Rd w warunkach anoksji w porównaniu ze stanem normoksji, podczas gdy u pszenżyta wzrost ten był tylko dwukrotny. U obu testowanych roślin równolegle obserwowano wzrost poziomu sumy chlorofili *a+b* w czasie eksperymentu, na poszczególnych poziomach natlenienia, z wyraźnym obniżeniem poziomu barwników fotosyntetycznych przy Eg<13%. Po 12 dniach u roślin rosnących w warunkach anoksji, poziom chlorofili *a+b* był niższy o 35 % u pszenżyta i odpowiednio o 31 % u pszenicy.

Optymalnymi zatem warunkami aeracyjnymi dla testowanych roślin w badanej glebie lessowej były: porowatość powietrzna w zakresie 13-19%, ODR powyżej 27μg O_2 m^{-2} s^{-1} i Eh >400 mV.

Stwierdzone różnice w reakcji na zaistniały w rizosferze stres tlenowy, kwalifikują pszenicę odmiany Rosa jako bardziej odporną. Znajduje to potwierdzenie w bardziej wydajnym systemie obronnym roślin tej odmiany wyrażającym się zarówno bardziej zdecydowanym wzrostem Rd, jak również mniejszym ubytkiem chlorofili *a+b*, mniejszym ograniczeniem przyrostu biomasy części nadziemnych i korzeni oraz szybszą i głębszą reakcją enzymów obronnych SOD i GR, a także niższym poziomem MDA, świadczącym o mniej zaawansowanym procesie destrukcji lipidów.

Wykazane zależności potwierdziły postawioną hipotezę, o istniejących związkach przyczynowych pomiędzy stanem aeracji rizosfery a oporem

dyfuzyjnym liści i zakwalifikowały stres tlenowy do czynników bezpośrednio oddziałujących na uruchamianie systemu obronnego rośliny.

15. WNIOSKI

1. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono istnienie w *continuum* atmosfera-gleba-roślina ciągu przyczynowo-skutkowego polegającego na indukcji systemu obronnego u pszenicy ozimej i pszenżyta w warunkach stresu tlenowego zaistniałego w rizosferze.
2. Zmienne uwilgotnienie gleby spowodowało, poprzez zróżnicowanie porowatości powietrznej w zakresie od 24 do 0%, przejście z warunków normoksji przez hipoksję do anoksji. Było to związane ze zmniejszeniem wskaźnika dostępności tlenu ODR od 140 do 3 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ i potencjału oksydoredukcyjnego Eh od 481 do 96 mV.
3. Przejście z normoksji do anoksji wywołało wzrost oporu dyfuzyjnego aparatów szparkowych, zmniejszenie poziomu barwników fotosyntetycznych oraz spadek biomasy zarówno korzeni jak i części nadziemnych.
4. Niedobór tlenu w rizosferze indukował reaktywne formy tlenu na poziomie komórkowym (w korzeniach i częściach nadziemnych). Reakcję obronną u roślin stwierdzono drogą pośrednią, poprzez wzrost aktywności enzymów dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationowej oraz stopnia destrukcji błon komórkowych mierzonego wzrostem poziomu MDA.
5. Większą wrażliwość na stres tlenowy w rizosferze oraz załamanie się systemu obronnego po 12 dniach trwania anoksji stwierdzono u pszenżyta, mniejszą natomiast u pszenicy ozimej.
6. W oparciu o parametry metaboliczne roślin jako wartości graniczne pomiędzy normoksją a hipoksją w badanym ośrodku glebowym, ustalono na poziomie: Eg=13%, ODR $\cong$ 27 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$, Eh $\cong$ 400 mV.
7. Ze względu na strategiczną rolę, którą w Polsce i w świecie odgrywają rośliny zbożowe, w obecnej dobie globalnych zmian klimatyczno-środowiskowych, ważnym jest badanie reakcji roślin na niedobór tlenu w rizosferze, w celu określenia optymalnego uwilgotnienia gleby w warunkach upraw kontrolowanych, przy którym nie zachodziłaby nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu, ograniczająca produkcję biomasy.

16. PIŚMIENNICTWO

1. **Albrecht G. Wiedenroth E.M.:** Protection against activated oxygen following re-areation of hypoxically pretreated wheat roots. The response of the glutathione system. J.Exp. Bot., 45, 273, 449-455, 1994.
2. **Allen R. D.:** Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol., 107, 1049-1054, 1995.
3. **Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L.:** Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. Physiol. Plant., 100, 224-233, 1997.
4. **Aono M., Kubo A., Saji H., Natori T., Tanaka K., Kondo N.:** Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. Plant Cell Physiol., 32, 691-697, 1991.
5. **Armstrong W.:** Aeration in higher plants. Adv. In Bot. Res., 7, 225, 1979.
6. **Armstrong W., Gaynard T.J.:** The critical oxygen pressure for respiration in intact plants. Phisiol. Plant., 37, 200-206, 1976.
7. **Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasbugt G.M.:** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Arch. Biochem. Biophys. 373, 102-109, 2000.
8. **Asada K.:** Ascorbate peroxidase – hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant., 85, 235-241, 1992.
9. **Avsian-Kretchmer O., Eshdat Y., Gueta-Dahan Y., Ben-Hayyim G.:** Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. Planta 209, 469-477, 1999.
10. **Bartosz G.:** Druga Twarz Tlenu. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1995.
11. **Bartosz G.:** Oxidative stress in plants. Acta Physiol. Plant., 19, 1, 47-64, 1997.
12. **Beard J. B., Martin D. P.:** Influence of water temperature on submersion tolerance of four grasses. Agron. J., 62, 257, 1970.
13. **Bennicelli R. P.:** Wpływ zlokalizowanego stresu tlenowego w glebie na rozwój korzeni i części nadziemnych kukurydzy (Modelowe badania rizotronowe). Praca doktorska w Instytucie Agrofizyki PAN, Lublin, Acta Agrophysica, 3, 1994.
14. **Bennicelli R.P.:** Effect of soil aeration on plant biomass production. Polish J. of Soil Sci., XXXIII/2, 3-11, 2000.
15. **Bennicelli R.P.:** Wpływ form azotu na potencjał redoks w roztworze pożywki i biomasę *Azolla filiculoides* Lam. Acta Agrophysica, 38, 7-14, 2000.
16. **Bennicelli R.P.:** Electrochemical methods in environment (in Polish). In: Analitical Environmental Chemistry, Department of Human Ecology, Catholic University of Lublin, EkoKul, Lublin, Poland, 269-305, 2001.
17. **Bennicelli R.P., Stępniewska Z., Balakhnina T.I., Stępniewski W., Żuchowski J.:** Effect of soil re-oxidation on wheat (Triticum aestivum L.) defense system. Int. Agrophysics, 13, 309-314, 1999.
18. **Bennicelli R.P., Stępniewski W.:** Metody pomiaru współczynnika dyfuzji tlenu w glebie. VII Szkoła Wykładowców Przedmiotu Fizyka z elementami agrofizyki "Stan fizyczny gleby a rozwój roślin", Lublin, 21-28, 1995.
19. **Bennicelli R.P., Stępniewski W., Zakrzhevsky D.A., Balakhnina T.I., Stępniewska Z., Lipiec J.:** The effect of soil aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings. Environ. and Exp. Bot., 39, 203-211, 1998.
20. **Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F.:** Mithochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. Eur. J. Biochem. 264, 678-701, 1999.

21. **Bertani A., Brambilla I.:** Effect of decreasing oxygen concentration on wheat roots. Growth and induction of aerobic metabolism. Z. Pflanzenphysiol., 108, 283-288, 1982.
22. **Beyer W., Imlay J., Fridovich I.:** Superoxide dismutases. Prog. Nucl. Acid Res., 40, 221-253, 1991.
23. **Blokhina O.B., Fagerstedt K.V., Chirkova T.V.:** Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reareation Physiol. Plant., 105(4), 625-632, 1999.
24. **Boo Y.C., Jung J.:** Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. J. Plant Physiol., 155, 255-261, 1999.
25. **Bowler C., Montagu M., Inze' D.:** Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 83-116, 1992.
26. **Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montague M., Inze' D.:** Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. EMBO. J., 10, 1723-1732, 1991.
27. **Bowler C., Van Camp W., Van Montague M., Inze' D.:** Superoxide dismutase in plants.Critical. Rev. Plant Sci. 13,199-218, 1994.
28. **Bowler C., Van Montague M., Inze' D.:** Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 83-116, 1992.
29. **Brzezińska M, Stępniewska Z., Stępniewski W., Włodarczyk T., Przywara G., Bennicelli R.P.:** Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity (pot experiment with barley). Int. Agrophysics, 15, 3-7, 2001.
30. **Bueno P., Varela J., Gimenez-Gallego G., Del Rio A.:** Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. Plant Physiol. 108, 1151-1160, 1995.
31. **Chirkova T.V.:** Plant adaptation to hypoxia and anoxia. Leningrad, Leningrad State University Press, 245, 1988.
32. **Chirkova T.V., Novitskaya L.O., Blokhina O.B:** Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. Russian J. Plant Phys. 45(1), 55-62, 1998.
33. **Chirkova T.V., Sinyutina N.F., Blyudzin Y.H., Barsky I.E., Smetannikova S.V.:** Phospholipid fatty acids of root mitochondria and microsomes from rice and wheat exposed to aeration or anaerobiosis. Plant Physiol (in Russian). 36(1), 126-134, 1989.
34. **Chirkova T.V., Voitzekovskaya S.A.:** Plant protein synthesis under hypoxia and anoxia (in Russian). Uspekhi Sovr. Biol. 119, 178-189,1999.
35. **Chirkova T.V., Zhukova T.M., Bugrova M.P.:** Redox reactions of plant cells in response to short-term anaerobiosis (in Russian). Vestnik SPBGU, 3(1), 82-86, 1992.
36. **Chirkova T.V., Zhukova T.M., Goncharova N.N.:** Method of determination of plant resistance to oxygen shortage. Russian J. Plant Phys. 38(2), 359-364, 1991.
37. **Chirkova T.V., Zhukova T.M., Tretiakov A.L.:** Adenine nucleotides in wheat and rice seedlings under aeration and anoxia. Vestnik LGU (in Russian) 15, 74-81, 1984.
38. **Crawford R.M.M.:** Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. Adv. Ecol. Res., 23, 93-185, 1992.
39. **Crawford R.M.M., Braendle R.:** Oxygen deprivation stress in a changing environment. J. Exp. Bot., 47, 145-159, 1996.
40. **Crawford R.M.M., Walton J.C., Wollen-Weber-Ratzer B.:** Similarities between post-ischaemic injury to animal tissues and post anoxic injury in plants. Proc. Royal Soc. Edinb., 102B, 325-332, 1994.
41. **Crawford R.M.M., Zochowski Z.M.:** Tolerance of anoxia and ethanol toxicity in checkpea seedlings (*Cicer arietinum L.*), J. Exp. Bot., 35, 1472-1480, 1984.

42. **Daugherty C.J., Musgrave M.E.:** Characterization of populations of rapid-cycling Brassica rapa L. selected for differential waterlogging tolerance. J. Exp. Bot., 45, 272, 385-392, 1994.
43. **Desikan R., Mackerness S.A.H., Hancock J.T., Neill S.J.:** Regulation of Arabidopsis Transcriptome by oxidative stress. Plant Physiol., 127, 159-172, 2001.
44. **Dhindsa R. A., Matowe W.:** Drought tolerance in two mosses correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. J. Exp. Bot. 32, 79-91, 1981.
45. **Dolferus R., Ellis M., De Bruxelles G., Trevaskis B., Hoeren F., Dennis E.S., Peacock W.J.:** Strategies of gene action in Arabidopsis during hypoxia. Ann. Bot., 79 (suppl. A), 21-31, 1997.
46. **Drew M.C.:** Soil aeration and plant root metabolism. Soil Sci., 154, 4, 259-268, 1992.
47. **Drew M.C.:** Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48, 223-250, 1997.
48. **Drew M.C.:** Sensing soil oxygen. Plant Cell Environment, 13, 681-693, 1990.
49. **Dubinin A.G., Snakin V.V.:** Soil redox potential as a characteristic intensity value of the active processes in biogeocenosis. Bioelectrochem. Bioenergetics, 8, 128, 709-713, 1981.
50. **Dudal R..:** Plant adaptation to mineral stress.In: Problem Soil Spec., Publ. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn, 3, 1976.
51. **Elstner E.F.:** Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plants cells. In: Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. Pell E.J., Steffen K.L. (eds) American Soc. Plant Physiol., Rockville, 13-25, 1991.
52. **Elstner E.F.:** Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev Plant Physiol., 33, 73-96, 1982.
53. **Epping B., Hansen A. P., Martin P.:** Relations between actievities of enzymes for the removal of O_2^- and H_2O_2 and nitrogenase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L., Z. Naturforsch. 50 c, 543-551, 1995.
54. **Foyer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J.:** Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell and Environment, 17, 507-523, 1994.
55. **Foyer C.H., Halliwell B.:** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133, 21-25, 1976.
56. **Foyer C.H., Mullineaux P.M.:** Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
57. **Fridovich I.:** Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 41, 35-97, 1974.
58. **Gambrell R.P., DeLaune R.D., Patryck Jr. W.H.:** Redox processes in soils following oxygen depletion. In: Plant Life under Oxygen Deprivation – Ecology, Physiology and Biochemistry, SPB Academic Publishing, 1991.
59. **Gawlik J., Malicki M., Stępniewski W.:** The problem of effective voltage control in measurement of ODR in soil. Pol. J. Soil Sci., 10, 9, 1977.
60. **Gliński J., Stępniewska Z.:** The influence of the matrix potential and the oxygen concentration on the redox potential of soils. Zesz. Prob. Post. Nauk Roln., 220, 438-445, 1983.
61. **Gliński J., Stępniewski W.:** Soil Aeration and Its Role for Plants. CRC, Boca Raton, 1985.
62. **Goodman B.A..:** The involvment of oxygen derived free radicals in plant-pathogen interactions. Proc. Royal Soc. Sci. Edinb., 102B, 479-493, 1994.
63. **Gressel J., Galun E.:** Genetic controls of photooxidant tolerance. In: Foyer C. H., Mullineaux P.M., (eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA,, 237-273, 1994.
64. **Grichko V.P., Glick B.R.:** Ethylene and flooding stress in plants. Plant Physiol. Biochem., 39, 1-9, 2001.

65. **Hanhijarvi A.M., Fagerstedt K.V.:** Comparison of carbohydrate utilization and energy charge in the yellow flag iris (*Iris pseudacorus*) and garden iris (*Iris germanica*) under anoxia. Physiol. Plant., 93, 493-497, 1995.
66. **Hausladen A., Alscher G.R.:** Glutathione In: Atioxidants in Higher Plants. CRC Press, 1-30, 1993.
67. **He C.J., Drew M.C., Morgan P.W.:** Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of Zea mays during hypoxia and nitrogen starvation. Plant Physiol., 105, 861-865, 1994.
68. **Heinrichs D. H.:** Flooding tolerance of legumes. Can. J. Plant Sci., 52, 985, 1970.
69. **Hernandez J.A., Ferrer M.A., Jmenez A., Barcelo A.R., Sevilla F.:** Antioxidant systems and $O_2^{\cdot}/H_2O_2$ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol., 127, 817-831, 2001.
70. **Hetherington A.M., Hunter M.I., Crawford R.M.M.:** Contrasting effects of anoxia on rhizome lipids of Iris species. Phytochem., 21(6), 1275-1278, 1982.
71. **Hodges D.M., Forney C.F.:** The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. J. of Exp. Bot., 51, 344, 645-655, 2000.
72. **Huang B., Liu X., Fry J.D.:** Shoot physiological responses of two bentgrass cultivars to high temperatures and poor soil aeration. Crop Science, 38, 1219-1224, 1998.
73. **Huq E., Hodges T.K.:** An anaerobically inducible early (aie) gene family from rice. Plant Mol. Biol. 40, 591-601, 1999.
74. **Imlay J.A., Linn S.:** DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240, 1302-1309, 1986.
75. **Jackson M.B., Hall K.C.:** Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of leaf water deficits. Plant Cell Environ., 10, 121-130, 1987.
76. **Jackson W.T.:** Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. Annu. Rev. Plant Physiol. 36, 145-174, 1985.
77. **Kacperska A..:** Czy można mówić o wspólnym podłożu odpowiedzi roślin na działanie stresowych czynników środowiska? W: Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. PAN, Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, Kraków, 1996.
78. **Kalashnikov Ju.E., Balakhnina T.I., Zakrzevsky D.A.:** Effect of soil hypoxia on activation of oxygen and the system of protection from oxidative destruction in roots and leaves of *Hordeum vulgare*. Rus. J. Plant Physiol., 41, 583-588, 1994.
79. **Karpińska B., Karlsson M., Schinkel H., Streller S., Suss K.H., Melzer M., Wingsle G.:** A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. Plant Physiol., 126, 1668-1677, 2001.
80. **Knox J.P., Dodge A.D.:** Singlet oxygen and plants. Phytochemistry 24 889-896, 1985.
81. **Konings H., Lambers H.:** Respiratory metabolism, oxygen transport and the induction of aerenchyma in roots. In: Plant Life Under Oxygen Deprivation: Ecology, Physiology and Biochemistry, (Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H., Ed), The Hague, SPB Academic Publishing, 247-266, 1991.
82. **Kowalik P., Stępniewski W.:** The significance of soil aeration for plants. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., 220, 61, 1979.
83. **Kozłowski T.T.:** Extent, causes, and impacts of flooding. In: Kozlowski T.T. (Ed.), Flooding and Plant Growth, Academic Press, New York, NY, 1-5, 1984.
84. **Kubo A., Aono M., Nakajima N., Saji H., Tanaka K., Kondo N.:** Differential responses in activity of antioxidants enzymes to different environmental stresses in Arabidopsis thaliana. J. Plant Res., 112, 279-290, 1999.

85. **Kurganova L.N., Veselov A.P., Sinistina Y.V., Elikova E.A.:** Lipid peroxidation products as possible mediators of heat stress response in plants. Rus. J. Plant Physiol., 46, 181-185, 1999.
86. **Kurtz Jr. D.M., Coulter E.D.:** Bacterial nonheme iron proteins and oxidative stress. Chemtracts-Inorganic Chemistry, 14, 407-435, 2001.
87. **Kuźniak E.:** Transgenic plants: an insight into oxidative stress tolerance mechanisms. Acta Physiol. Plant., 24, 1, 97-109, 2002.
88. **Kuźniak E., Lukasiewicz H.:** The involvment of hydrogen peroxide in plant response to stresses. Acta Physiol. Plant., 22, 2, 195-203, 2000.
89. **Kuźniak E., Urbanek H.:** Rola nadtlenku wodoru w roślinie w odpowiedzi na czynniki stresowe. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 469, 43-48, 1999.
90. **Kwast K.E., Hand S.C.:** Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia. J. Biol. Chemistry, 271, 13, 7313-7319, 1996.
91. **Laan P., Tosserams M., Blom C.W.P.M., Veen B.W.:** Internal oxygen transport in Rumex species and its significance for respiration under hypoxic conditions. Plant and Soil, 122, 39-46, 1992.
92. **Lai F.M., Seranatna T., McKersie B.D.:** Anaerobic stress in *Medicago sativa* L. cell suspensions. J. Plant Physiol., 139, 331-338, 1990.
93. **Lamb C., Dixon R.A.:** The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 251-275, 1997.
94. **Lander H.M.:** An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J., 11, 118-124, 1997.
95. **Lemon E.R., Erickson A.E.:** The measurement of oxygen diffusion in the soil with platinum microelectrode. Soil Sci. Am. Proc., 16, 1952.
96. **Levitt J.:** Response of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, New York, 1980.
97. **Lichternthaler H. K., Wellburn A. R.:** Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 11, 591-592, 1983.
98. **Łata. B.:** Mechanizmy chroniące roślinę przed stresem oksydacyjnym, wywołanym niekorzystnymi warunkami środowiska. Post. Nauk Roln., 6, 115-132, 1998.
99. **Malan T., Greyling M.M., Gressel J.:** Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. Plant Sci., 69, 157-166, 1990.
100. **Malicki M., Walczak R.:** A gauge of the redox potential and the oxygen diffusion rate in the soil with an automatic regulation of cathode potential. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 220, II, 457, 1983.
101. **May M.J., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu N., Inze D.:** Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. J. Exp. Bot., 49(321), 649-667, 1998.
102. **McIntyre D.S.:** The platinum microelectrode method for soil aeration measurement. Adv. Agron., 22, 235, 1970.
103. **McKersie B.D., Leshem Y.Y.:** Stress and stress coping in cultivated plants, Kluwer Academic Publisher, 1994.
104. **Monk L.S., Fagerstedt K.V., Crawford R.M.M.:** Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor in recovery from oxygen deprivation in Iris pseudocorus? Plant Physiol., 85, 1016-1020, 1987.
105. **Moran J.F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R.V., Aparicio-Tejo P.:** Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta, 194, 346-352, 1994.
106. **Nalborczyk E.:** Alternative plants in the agriculture of 21-st century and perspectives of their utilization. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 468, 17-30, 1999.

107. **Noctor G., Foyer C. H.:** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279, 1998.
108. **Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A.:** A sensitive spectrometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 54, 536-541, 1986.
109. **Parolin P.:** Morphological and physiological adjustments to waterlogging and drought in seedlings of Amazonian floodplains trees. Oecologia, 128, 326-335, 2001.
110. **Perata P., Pozueta J., Akazava T., Yamaguchi J.:** Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. Planta, 188, 611-618, 1992.
111. **Pezeshki S.R., Matthews S.W., Delaune R.D.:** Root cortex structure and metabolic responses of *Spartina patens* to soil redox conditions. Environ. Exp. Bot., 31, 1, 91-97, 1991.
112. **Pezeshki S.R., Pardue J.H., Delaune R.D.:** The influence of soil oxygen deficiency on alcohol dehydrogenase activity, root porosity, ethylene production and photosynthesis in *Spartina patens*. Environ. Exp. Bot., 33, 4, 565-573, 1993.
113. **Pfannschmidt T., Allen J.F., Oelmuller R.:** Principle of redox control in photosynthesis gene expression. Physiologia Plantarum, 112, 1-9, 2001.
114. **Picek T., Simek M., Santruringckova H.:** Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. Biol. Fert. Soils, 31, 3-4, 315-322, 2000.
115. **Polle A., Rennemberg H.:** Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: Plant adaptation to environmental stress. (Ed.): Fowden L., Mansfield T., Stoddart J., Chapman & Hall, 263-273, 1993.
116. **Przywara G., Stępniewski W.:** Influence of flooding temperature on the root penetration depth and porosity of two varieties of winter wheat. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 27, (3-4), 623-634, 1996.
117. **Przywara G., Stępniewski W.:** The influence of waterlogging at different temperatures on penetration depth and porosity of roots and on stomatal diffusive resistance of pea and maize seedlings. Acta Physiol. Plant., 21, 4, 405-411, 1999.
118. **Quinn J.M., Eriksson M., Moseley J.L., Merchant S.:** Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. Plant Physiol., 128, 463-471, 2002.
119. **Ratcliffe R.G.:** Metabolic aspects of anoxic response in plant tissue. In: N. Smirnoff (ed.) Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation, Bios Sci., Oxford, 111-127, 1995.
120. **Rawyler A., Pavelic D., Gianinazzi C., Oberson J., Braendle R.:** Membrane lipid integrity relies on a threshold of ATP production rate in potato cell cultures submitted to anoxia. Plant Physiol., 120, 293-300, 1999.
121. **Reddy K.R., Patrick Jr. W.H.:** Effects of aeration on reactivity and mobility of soil constituents. In: Chemical Mobility and Reactivity in Soil Systems, ASA, SSSA, Madison, WI, USA, 11-33, **1983.**
122. **Revsbech N.P., Pedersen O., Reichardt W., Briones A.:** Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. Biol. Fert. Soils, 29, 4, 379-385, 1999.
123. **Sachs M.M., Subbaiah C.C., Saab I.N.:** Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. J. Exp. Bot., 47(294), 1-15, 1996.
124. **Sakurai H., Kusumoto N., Kitayama K., Tosakagi R. K.:** Isoenzymes of superoxide dismutase in *Chlamydomonas* and purification of one of the major isoenzymes containing Fe. Physiol. Plant., 72, 681-689, 1993.
125. **Salin M.L.:** Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. Physiol. Plant., 72, 681-689, 1987.
126. **Salysbury F.B., Ross C.W.:** Fisiologia Vegetale, Zanichelli, 645-673, 1995.

127. **Scandalios J.G.:** Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol., 101, 7-12, 1993.
128. **Scandalios J.G.:** Response of plants antioxidant defense genes to environmental stress. Adv. Genet., 28, 1-41, 1990.
129. **Selye H.:** Od marzenia do odkrycia naukowego. PZWL, Warszawa, 1967.
130. **Semenza G.L.**: Perspective on oxygen sensing. Cell, 98, 281-284, 1999.
131. **Shewfelt R.L., Purvis A.C.:** Toward a cohomprensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. Hort. Sci., 30(2), 213-218, 1995.
132. **Sies H.:** Oxidative Stress. Academic Press, New York, 1-8,1985.
133. **Sojka R.:** Stomatal closure in oxygen-stressed plants. Soil Sci., 154, 269-280, 1992.
134. **Somorowski C.:** The influence of climatic changes on demand for irrigation water in Poland. Geographia Polonica, 71, 121-126, 1998.
135. **Starck Z., Chołuj D., Niemyska B.:** Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska, SGGW, Warszawa, 1995.
136. **Stępniewska Z.:** The relationship between soil redox processes and pH. Zesz. Probl. Nauk Roln., 344, 137-146, 1987.
137. **Stępniewska Z.:** Estimation of resistance to reduction (t300) of mineral soils. Problemy agrofizyki, 64, 31-34, 1991.
138. **Stępniewska Z.:** Soil redox resistance as a factor of nitrate stability in the soil. In: Migration and fate of polluttants in Soils and Subsoils. Theory and practice. Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, Quaderni 96, 91-97, 1994.
139. **Stępniewska Z., Bennicelli R.P.:** Dynamika potencjału redoks w pożywce i sedymencie podczas wzrostu *Azolla caroliniana* Willd.. Acta Agrophysica, 53, 159-164, 2001.
140. **Stępniewska Z., Bennicelli R.P., Weiss U., Włodarczyk T., Stahr K.:** Denitrification in soils as affect by their redox conditions. J. of Water and Land Development, 4, 163-173, 2000.
141. **Stępniewska Z., Gliński J., Schlichting E.:** Influence of management on a soil aeration index based on plant analyses. Polish J. of Soil Sci., XVIII/1-2, 35-41, 1986.
142. **Stępniewska Z., Stępniewski W., Gliński J., Ostrowski J.:** Atlas właściwości oksydoredukcyjnych gleb mineralnych Polski. Morpol, Lublin, 1996.
143. **Stępniewski W.:** Measurement of diffusion coefficient and diffusion constant for oxygen in soil. Problemy agrofizyki, 64, 68-74, 1991.
144. **Stępniewski W.:** The effect of irrigation and increase mineral fertilization on the aeration status of a cultivated soil. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 197, 203-220, 1997.
145. **Stępniewski W., Gliński J.:** Metody pomiaru aeracji gleb. Problemy agrofizyki, 46, 5-6, 1985.
146. **Sutherland M. W.:** The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. Physiol. Plant Pathol. 39, 79-93, 1991.
147. **Tadano T., Kirimoto K., Aoyama J., Tanaka A.:** Comparison of tolerance to high moisture conditions in the soil among crop plants. Studies on the comparative plant nutrition. J. Sci. Soc. Manure, 50, 261, 1979.
148. **Taiz L., Zeiger E.:** Fisiologia Vegetale, 412-415, Piccin, Padova, 1996.
149. **TaylorE.R., Nie X.Z., MacGregor A.W., Hill R.D.:** A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. Plant Mol. Biol., 24, 853-862, 1994.
150. **Tiwari B.S., Belenghi B., Levine A.:** Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mithocondrial permeability transition, and programmed cell death. Plant Physiol., 128, 1271-1281, 2002.
151. **Thomson C.J., Armstrong W., Waters I., Greenway H.:** Aerenchyma formation and associated oxygen movement in seminal and nodal roots of wheat. Plant, Cell Environment, 13, 395-403, 1990.
152. **Tretyn A.:** Odbiór i przekazywanie sygnałów w komórkach roślinnych. W: J. Kopcewicz, S. Lewak (praca zbiorowa), Podstawy Fizjologii Roślin, 91-105, PWN, Warszawa, 1998.

153. **Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F., Inze' D.:** The role of active species in plant signal transduction. Plant Science, 161, 405-414, 2001.
154. **Van Camp W., Van Montague M., Inze' D.:** Superoxide dismutases. In: Foyer C. H., Mullineaux P.M., (eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA, 317-341, 1994.
155. **Van Noordwijk M., Brouwer G.:** Gas-filled root porosity in response to temporary low oxygen supply in different stages. Plant and Soil, 152, 187-199, 1993.
156. **Vartapetian B.B.:** Flood-sensitive plants under primary and secondary anoxia: ultrastructural and metabolic responses. In: Plant Life under Oxygen Deprivation: Ecology, Physiology and Biochemistry, The Hague, SPB Academic Publishing, 201-216, 1991.
157. **Vianello A., Macri F.:** Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at surface of plant cells. J. Bioenerg. Biomeb., 23, 409-423, 1991.
158. **Voesenek L.A.C.J., Van Der Veen R.:** The role of phytohormones in plant stress: too much or to little water. Acta Bot. Neerl. 43, 91-127, 1994.
159. **Whalley W.R., Lipiec J., Stępniewski W., Tardieu F.:** Control and measurement of the physical environment in root growth experiments. In: Smit et al. (Eds.) "Handbook of Methods in Root Research". Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 75-112, 2000.
160. **Wingsle G., Karpiński S.:** Different redox regulation by glutathione of glutathione reductase and Cu,Zn-superoxide deismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L.Planta, 198, 151-157, 1996.
161. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Stępniewska Z., Brzezińska M., Bennicelli R.P., Przywara G.:** Effect of oxygen deficiency on the macroelement content of the soil (pot experiment with barley cv. Aramir vegetation). Int. Agrophysics, 15, 4, 293-299, 2001.
162. **World Wide Web:** @Biotic Stress, Universita' di Parma, Italy, 2000.
163. **Yan B., Dai Q., Liu X., Huang S., S., Wang Z.:** Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. Plant and Soil, 179, 261-268, 1996.
164. **Yu Q., Rengel Z.:** Drought and salinity differentially influence activity of superoxide dismutase in narrow-leafed lupins. Plant Science, 142, 1-11, 1999.
165. **Yu T. R.:** Physicochemical equilibria of redox systems in paddy soils. Soil Sci., 135 (1), 26-30, 1983.
166. **Zakrzhevsky D.A., Balakhnina T.I., Stępniewski W., Stępniewska Z., Bennicelli R.P., Lipiec J.:** Oxidation and growth processes in roots and leaves of higher plants at different oxygen availability in soil (in Russian). Russian J. of Plant Physiol., 41,956-963, 1995.
167. **Zhang Q., Greenway H.:** Anoxia tolerance and anaerobic catabolism of aged beetroot storage tissues. J. Exp. Bot., 45, 274, 567-575, 1994.
168. **Zausig J., Stępniewski W., Horn R.:** Oxygen concentration and redox potential gradients in unsaturated model soil aggregates. Soil Sci. Soc. Am. J., 57, 908-916, 1993.
169. **Żuchowski J.:** Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. Kosmos, 48, 1, 87-93, 1999.

17. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było zbadanie, na ile zdolność do przetrwania anoksji jest związana z indukcją systemu obronnego u dwu gatunków roślin uprawnych to jest u pszenicy ozimej odm. Rosa oraz pszenżyta ozimego CZR 1407. Badania prowadzono na 20 dniowych siewkach znajdujących się w fazie 4-6 liścia. Warunki stresowe stosowano przez okres 12 dni. Stan natlenienia gleby opisywano przy pomocy takich parametrów jak porowatość powietrzna (Eg), natężenie dyfuzji tlenu (ODR) oraz potencjał oksydoredukcyjny (Eh). Stan fizjologiczny rośliny charakteryzowano przy pomocy przyrostu biomasy korzeni i części nadziemnych, oporu dyfuzyjnego liści, aktywności enzymów będących elementami systemu obronnego takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i reduktaza glutationowa (GR) a także poziomu chlorofilu a i b oraz stężenia dialdehydu malonowego, będącego produktem peroksydacji lipidów.

W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono istnienie w *continuum* atmosfera-gleba-roślina ciągu przyczynowo-skutkowego polegającego na indukcji systemu obronnego w warunkach stresu tlenowego zaistniałego w korzeniach. Zróżnicowane uwilgotnienie gleby spowodowało przejście z warunków normoksji przez hipoksję do anoksji związane z obniżeniem porowatości powietrznej od 24 do 0%, wskaźnika ODR od 80 do 2 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ i potencjału redoks od 470 do 115 mV. Przejście to wywołało wzrost oporu dyfuzyjnego aparatów szparkowych, zmniejszenie poziomu barwników fotosyntetycznych oraz spadek biomasy zarówno korzeni jak i części nadziemnych.

Stres tlenowy w korzeniach indukował reaktywne formy tlenu na poziomie komórkowym (w korzeniach i częściach nadziemnych) a reakcję obronną u roślin stwierdzono drogą pośrednią, poprzez wzrost aktywności enzymów SOD i GR oraz poprzez określenie stopnia destrukcji błon komórkowych mierzonego wzrostem poziomu MDA.

Większą wrażliwość na stres tlenowy w korzeniach oraz załamanie się systemu obronnego po 12 dniach trwania anoksji stwierdzono u pszenżyta. W oparciu o parametry metaboliczne roślin jako wartości graniczne pomiędzy normoksją a hipoksją należy przyjąć: Eg=13%, ODR $\cong$ 27 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$, Eh $\cong$ 400 mV.

Słowa kluczowe: stres tlenowy, roślina, gleba, dysmutaza ponadtlenkowa, reduktaza glutationowa, aldehyd malonowy, mikrodyfuzja tlenu, potencjał oksydoredukcyjny

18. SUMMARY

INDUCTION OF PLANT DEFENCE SYSTEM IN *Triticum aestivum* L. AND *Triticale* UNDER SOIL OXYGEN STRESS CONDITION.

The aim of the paper was to investigate to what extent the capability of plants to survive anoxic conditions is connected with the induction of the defence system of two species of cereals such as winter wheat (*Triticum aestivum* L, var. Rosa) and *Triticale* (CZR 1406). The experiment was performed under laboratory conditions with the 20 days old seedlings in the phase of 4-6 leaves. The stress conditons were applied to roots during 12 days. Soil oxygenation status was characterised by air-filled porosity (Eg), oxygen diffusion rate (ODR) and redox potential (Eh). The physiological status of the plants was characterised by biomass production in leaves and shoots, by stomatal diffusive resistance of leaves (Rd), by activity of enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutation reductase (GR) being components of the defence system, as well as by the chlorophyll a + b level and the concentration of malondialdehyde (MDA) being the product of lipid peroxidation.

As a result of the investigations performed the induction of plant defence system in the continuum atmosphere - soil – plant was stated under the conditions of oxygen stress imposed to the roots.

Decrease of air-filled porosity (Eg) from 24 to 0% connected with the differentiation of the soil moisture content caused a change from normoxic through hypoxic to anoxic conditions characterised by a decrease of ODR from 80 to 2 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ and of redox potential from 470 do 115 mV. This was accompanied by the increase of stomatal diffusive resistance, lowering the level of photosynthetic pigments and lowering the biomass of roots and shoots. Anoxic conditions in the rhizosphere induced reactive oxygen forms on cellular level (in roots and shoots) and the defence response of the plants was confirmed indirectly, through the increase of the activity of such enzymes as SOD and GR as well as by elevation of the degree of peroxidation of membrane lipids measured by the increase of MDA concentration.

Higher sensitivity to oxygen stress and break down of the defence system after 12 days of the anoxia duration was found for *Triticale*. On the basis of metabolic plant parameters the limiting values between normoxic and anoxic conditions such as Eg=13%, ODR $\cong$ 27 $\mu g\ O_2\ m^{-2}\ s^{-1}$, and Eh $\cong$ 400 mV were found.

Key words: SOD, GR, MDA, ODR, redox potential, wheat, *Triticale*

Adres autora:

Riccardo Paolo Bennicelli
1. Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski,
Al. Kraśnicka 102, 20-712 Lublin (Poland).
2. Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN,
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27 (Poland).
e-mail: benniric@kul.lublin.pl