

AGNIESZKA BARANOWSKA-MOREK

Zakład Morfogenezy Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin

Uniwersytet Warszawski

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: abmorek@biol.uw.edu.pl

ROŚLINNE MECHANIZMY TOLERANCJI NA TOKSYCZNE DZIAŁANIE METALI CIĘŻKICH

WSTĘP

W licznych badaniach poświęconych działaniu metali ciężkich na rośliny wykazano ich toksyczny wpływ na szereg podstawowych procesów metabolicznych i fizjologicznych (BARCELO i POSCHENRIEDER 1999, HAGEMEYER 1999, POSCHENRIEDER i BARCELO 1999, SEREGIN i IVANOV 2001, SIEDLECKA i współaut. 2001). Do grupy pierwiastków będących potencjalnymi czynnikami toksycznymi dla roślin należą metale ciężkie (o gęstości wyższej niż 5 g cm^{-3}): chrom (Cr), kobalt (Co), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), molibden (Mo), kadm (Cd), rtęć (Hg) i ołów (Pb), a także metale lekkie: glin (Al) i półmetale: arsen (As) (PRASAD i HAGEMEYER 1999). Rośliny pobierają metale ciężkie, wraz z innymi pierwiastkami, w postaci jonowej. Z uwagi na specyficzną budowę komórek roślinnych – to jest posiadanie ściany komórkowej, metale ciężkie stają się prawdziwie szkodliwe dla rośliny nie od razu po wnikięciu, lecz w momencie przekroczenia bariery plazmalemmy. Toksyczne działanie metali ciężkich na procesy życiowe roślin wynika, przede wszystkim, z ich interakcji z funkcyjnymi grupami cząsteczek wchodzących w skład komórek, a w szczególności białek (grupy SH) i polinukleotydów (BOROVİK 1990). Efektem tych zjawisk może być słabszy wzrost i rozwój rośliny, a nawet jej obumarcie. Szkodliwy wpływ metali ciężkich ujawnia się przy ich określonych stężeniach w środowisku rośliny,

to jest w roztworze glebowym lub też w pożywce mineralnej. Istotna jest tu również dostępność metalu dla rośliny, zależna od wielu czynników, między innymi od: pH roztworu, zawartości materii organicznej w glebie, aktywności flory bakteryjnej, potencjału red-ox i napowietrzenia gleby (SIEDLECKA i współaut. 2001).

Od czasu rozwoju przemysłu i motoryzacji zawartość metali ciężkich w biosferze znacznie wzrosła. Stały się one czynnikiem stresowym dla organizmów, nie tylko w miejscach naturalnie obfitujących w metale, np. w glebach rudonośnych ale i także poza nimi. Badania laboratoryjne oraz te prowadzone w środowisku naturalnym pokazały, że w trakcie procesów ewolucji rośliny wytworzyły kompleksową sieć mechanizmów obronnych, umożliwiających wzrost i rozwój w ekosystemach skażonych, także metalami ciężkimi (Ryc. 1, 2).

Duże zainteresowanie budzą obecnie rośliny, które przystosowały się do życia na terenach silnie skażonych metalami ciężkimi, np. terenach pokopalnianych lub glebach rudonośnych. Szczególną grupę wśród nich stanowią tzw. hyperakumulatory. W ten sposób określane są rośliny, które gromadzą w tkankach swoich części nadziemnych wyjątkowo duże ilości metali ciężkich, tj. ponad 10 000 mg Zn lub Mn, ponad 1000 mg Ni, Cu, Co, Cr, Pb, ponad 100 mg Cd i ponad 1 mg Au na 1 kg suchej masy



Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



Ryc. 4

Ryc. 1. Początek sukcesji ekologicznej na świeżej hałdzie (zwałowisku) odpadów przemysłowych Górniczo-Hutniczego Kombinatu Metali Nieżelaznych „Orzeł Biały” w Piekarach Śląskich i Bytomiu. Toksyczny skład hałdy (metale ciężkie) hamuje jej zasiedlanie przez rośliny. Wiek hałdy około 30 lat (fot. M. Wierzbicka).

Ryc. 2. Stara hałda cynkowo-ołowiana (galmanowa) w Bolesławiu koło Olkusza. Bogata flora galmanowa porastająca hałdę jest wynikiem naturalnej sukcesji. Wiek hałdy: ponad 100 lat (fot. M. Wierzbicka).

Ryc. 3. *Biscutella laevigata* (pleszczotka górską). Jeden z gatunków dominujących na hałdzie w Bolesławiu (fot. M. Pieliowska).

Ryc. 4. Charakterystyczne owoce – łuszczynki *Biscutella laevigata*. Rośliny tego gatunku mają zdolność do hyperakumulacji ołowiu, kadmu i talu (fot. M. Pieliowska).

pędu. Znanych jest obecnie ponad 400 gatunków hyperakumulatorów; najwięcej z przebadanych roślin hyperakumuluje nikiel, zaś najmniej najbardziej toksyczne pierwiastki balastowe, takie jak kadm i ołów (SIEDLECKA i współaut. 2001). Do hyperakumulatorów zaliczono między innymi: *Minuartia verna* (gromadzi ołów), *Biscutella laevigata* (hyperakumulator ołowiu, kadmu i talu; Ryc. 3, 4), *Thlaspi rotundifolium ssp. capeifolium* (gromadzi ołów i kadm), *Thlaspi goesingense* (gromadzi nikiel) (ANDERSON i współaut. 1999, WENZEL i JOCKWER 1999), *Cardaminopsis halleri* (gromadzi cynk) (DAHMAN-MULLER i współaut. 2000). Ostatnio opisano również zjawisko szczególnej, bo przekraczającej 90 razy normalną zawartość, akumulacji równie toksycznego, choć mało badanego pierwiastka jakim jest tal (Tl). Tak wysokie przekroczenie normy stwierdzono w tkankach korzenia *Plantago lanceolata* porastającej hałdę galmanową w Bolesławiu koło Olkusza (WIERZBICKA 2001).

Rośliny różnią się znacznie poziomem tolerancji na działanie metali ciężkich: np. w stosunku do ołowiu *Biscutella laevigata*, *Silene vulgaris* oraz *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* i *Zea mays* odznaczają się dużą tolerancją, podczas gdy *Brassica napus*, *Phaseolus vulgaris* i *Soia hispida* wykazują dużą wrażliwość (WIERZBICKA 1999). Różnice w poziomie tolerancji na określony metal mają charakter nie tylko międzygatunkowy, ale i też międzypopulacyjny. Taką zależność wykazują rośliny porastające hałdy np. *Biscutella laevigata*, *Silene vulgaris* i *Dianthus carthusianorum*, oraz ich populacje występujące na terenach nieskażonych metalami ciężkimi (WIERZBICKA i PANUFNIK 1988, WIERZBICKA 2002, ZAŁĘCKA i WIERZBICKA 2002). Różnice w poziomie tolerancji na cynk i miedź stwierdzono nawet u klonów otrzymanych z nasion tego samego drzewa rodzicielskiego, w przypadku *Betula pendula* (UTRIAINEN i współaut. 1997)

Dla wyjaśnienia przyczyn istnienia zróżnicowanych poziomów tolerancji na określony metal ciężki konieczna jest znajomość mechanizmów dopowiadających za jej wytworzenie.

Mimo licznych badań poświęconych temu zagadnieniu (patrz KÖHL i LÖSCH 1999, SEREGIN i IVANOV 2001) podłoże mechanizmów obronnych przed toksycznym działaniem metali ciężkich i wiążącej się z nimi tolerancji na metale ciężkie nie zostało dokładanie wyjaśnione. Z danych literaturowych wynika, że w zjawiska te zaangażowane są następujące czynniki:

- ograniczanie przez roślinę pobierania metalu ze środowiska, głównie przez korzeń, oraz usuwanie nadmiaru metali przez organy roślin,
- transport metali w systemie apoplastycznym (ściany komórkowe i przestrzenie międzykomórkowe),
- transport metali na drodze: powierzchnia korzenia – walec osiowy,
- transport metali na drodze: korzeń – organy nadziemne,
- transport metali przez plazmalemmę do cytoplazmy,
- system detoksykacji metali w komórce,
- usuwanie metali z wnętrza komórki,
- specyficzna gospodarka mineralna: wapniem, fosforem i potasem,
- gospodarka wodna,
- mikoryza,
- obrona przed stresem oksydacyjnym i synteza enzymów odpornych na obecność metalu w komórce,
- inne, niespecyficzne czynniki zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres.

Kolejność wymienienia tych czynników nie odzwierciedla ich ważności, ale w pewnym stopniu włączanie się ich do działania w miarę przedostawania się toksycznej dawki metalu do rośliny.

MECHANIZMY TOLERANCJI

OGRANICZANIE PRZEZ ROŚLINĘ POBIERANIA METALU ZE ŚRODOWISKA ORAZ USUWANIE NADMIARU METALI PRZEZ ORGANY ROŚLIN

Powyższe czynniki są związane z tzw. strategią unikania czynnika stresowego (SIEDLECKA i współaut. 2001) – co oznacza, że im mniej metalu ciężkiego w tkankach rośliny tym mniej jest ona narażona na ich toksyczne oddziaływanie i tym większy może wykazywać poziom to-

lerancji. Związek zawartości metalu w roślinie z poziomem tolerancji stwierdzono między innymi:

- u *Silene paradoxa* L., gdzie niska koncentracja miedzi w korzeniu i pędzie zdawała się być cechą charakterystyczną roślin populacji tolerancyjnej na miedź (GONELLI i współaut. 2001);

– u otrzymanych z nasion klonów *Betula pendula*: klon 142 A traktowany 4000 M Zn był bardziej tolerancyjny na ten metal niż klon KL-2-M traktowany 800 M Zn i zawierał w swoich tkankach taką samą ilość cynku mimo pięciokrotnie wyższej dawki, w której był inkubowany (UTRIAINEN i współaut. 1997);

– w badaniach porównawczych roślin *Allium cepa* L. rozwijających się z nasion i z organów spichrzowych – siewki były bardziej wrażliwe na działanie Pb, Zn, Cd i konsekwentnie gromadziły większe ilości tych metali w swoich tkankach (MICHALAK i WIERZBICKA 1998a, b);

– w badaniach porównawczych trzech gatunków roślin motylkowych: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, rośliną najbardziej wrażliwą na działanie ołowiu była fasola, która jednocześnie nagromadziła najwięcej tego metalu w swoich tkankach (PIECHALAK i współaut. 2002).

Najważniejszą rolę w ograniczeniu pobierania metali ciężkich odgrywa korzeń. Bariere zmniejszającą pobieranie tych metali jest już sama powierzchnia korzenia i pokrywający ją śluz zawierający kwasy uronowe, których grupy karboksylowe wiążą metale, zatrzymując pewną ich ilość na powierzchni korzenia. W ten sposób najsilniej wiązane są jony ołowiu (MOREL i współaut. 1986). W plazmalemmie komórek korzenia istnieje ponad to potencjał red-ox, który redukuje pobieranie metali ciężkich (SIEDLECKA i współaut. 2001). Stwierdzono również wydzielanie przez komórki korzenia związków podnoszących pH otaczającego roztworu glebowego, dzięki czemu jony metali ciężkich stają się dla rośliny słabiej dostępne (SEREGIN i IVANOV 2001). Tę samą rolę odgrywa wydzielanie przez korzeń na zewnątrz substancji chelatujących jony metali, np. cytrynianów i jabłczanów u *Helianthus annuus* L. w odpowiedzi na działanie cynku, kwasów jabłkowego i cytrynowego u *Helianthus annuus* L. i *Triticum aestivum* L. oraz polipeptydów u *Triticum aestivum* L. w warunkach skażenia glinem (SIEDLECKA i współaut. 2001)

Dla wielu roślin w fazie kiełkowania bardzo skuteczną barierę przed wnikaniem metali ciężkich stanowi okrywa nasienna. Szczelność tej bariery w przypadku przenikania jonów ołowiu zależy od gatunku – np. wśród roślin należących do rodziny Papilionaceae, Cruciferae i Gramineae są gatunki, których okrywa nasienna nie stanowi dostatecznej ochrony przed wnikaniem jonów ołowiu, co może mieć

hamujący wpływ na proces kiełkowania (WIERZBICKA i OBIDZIŃSKA 1998).

U roślin, które mają już rozwinięte liście, ograniczenie transpiracji w warunkach skażenia metalem ciężkim może ograniczać stopień jego pobierania. Jony metali wnikają do apoplastu korzenia wraz ze strumieniem transpiracyjnym. Stwierdzono, że w warunkach wysokiej wilgotności względnej powietrza (czynnik zmniejszający transpirację) rośliny *Allium cepa* L. gromadziły w swoich tkankach mniej ołowiu, który wywierał słabsze toksyczne działanie, niż rośliny inkubowane w warunkach niskiej wilgotności (WIERZBICKA i BARANOWSKA 1996).

Jeśli w roślinie nie następuje ograniczenie pobierania metalu ciężkiego, to jego nadmiar może być usuwany przez, np.: gruczoły solne – usuwanie miedzi, a w mniejszym stopniu także cynku, niklu, żelaza i manganu w postaci kryształów u *Armeria maritima* ssp. *halleri* (NUEMANN i współaut. 1995, HEUMANN 2002 – autor wskazuje na istotną rolę wielokomórkowych gruczołów solnych u roślin z rodziny Plumbaginaceae w tolerancji na metale ciężkie). W usuwanie metali mogą być także zaangażowane: hydrotody, np. u *Minuartia verna* i ektodesmy, np. u *Silene vulgaris*. Metale mogą być również transportowane do starzejących się liści i innych części roślin, a następnie sezonowo zrzućane wraz z nimi, co stwierdzono np. u *Anthyllis vulneraria* L. i *Biscutella laevigata* L. odnośnie cynku. Metale ciężkie mogą być także kumulowane w idioblastach, włoskach i podobnych strukturach (SIEDLECKA i współaut. 2001).

Wielokrotnie jednak wykazano, że ograniczenie absorpcji metalu przez roślinę nie jest uniwersalną regułą decydującą o zwiększeniu jej poziomu tolerancji na dany metal. W badaniach wykazano, że u tolerancyjnej na ołów populacji hałdowej *Silene vulgaris* kumulacja metalu w tkankach jest na tym samym poziomie co u roślin z populacji wrażliwej (WIERZBICKA i PANUFNIK 1998). Także w badaniach porównawczych gatunków roślin dotyczących różnic w poziomie tolerancji na ołów, stopień zawartości tego pierwiastka w tkankach zdawał się nie mieć znaczenia dla poziomu tolerancji (WIERZBICKA 1999, WIERZBICKA i POTOCKA 2002). Również w doświadczeniach z wykorzystaniem klonów brzozy (*Betula pendula*) stwierdzono, że rośliny z klonu oznaczony jako 142 A były bardziej tolerancyjne na miedź niż klon KLM-2 –M, a równocześnie pobrały wię-

cej tego pierwiastka z roztworu (UTRIAINEN i współaut. 1997).

Wydaje się, że bardzo istotne dla odpowiedzi rośliny na działanie metalu ciężkiego jest nie tyle zdolność w ograniczeniu jego pobierania, lecz możliwość ochrony metabolizmu komórkowego przed toksycznym wpływem metalu poprzez jego detoksyfikację i gromadzenie w miejscach, w których nie jest on dla rośliny szkodliwy: w ścianach komórkowych i wakuolach.

TRANSPORT METALI W SYSTEMIE APOPLASTYCZNYM (ŚCIANY KOMÓRKOWE I PRZESTRZENIE MIĘDZYKOMÓRKOWE)

Jony metalu, które wraz z wodą wnikają do systemu przestworów międzykomórkowych i porów w ścianach komórkowych, mogą być tu w znacznej mierze unieruchamiane. Pory w ścianach komórkowych są zbudowane z pektyn i hemiceluloz zawierających kwasy galakturonowy i glukuronowy. Działają one jako wymiennicze kationowe – w wyniku ich dysocjacji pojawiają się ujemnie naładowane grupy, które zazwyczaj są wysycane przez wapń. W obecności metali ciężkich jony wapnia na zasadzie kompetycji mogą być zastępowane przez kationy ołowiu.

U roślin *Allium cepa* traktowanych ołowiem stwierdzono wzmożoną syntezę polisacharydów ścian komórkowych, które ulegały pogrubieniu – stwarzały więcej miejsca do nietoksycznej dla rośliny kumulacji ołowiu, co miało znaczenia dla osiągnięcia stosunkowo wysokiego poziomu tolerancji na ten metal (WIERZBICKA 1998).

Ściany komórkowe mogą zatrzymywać nawet do 90% pobranego metalu. W wiązaniu metali w ścianach komórkowych oprócz polisacharydów uczestniczą także białka. Metale ciężkie mogą być unieruchamiane w ścianach w postaci fosforanów, węglanów, krzemianów (ANTOSIEWICZ i WIERZBICKA 1999, SIEDLECKA i współaut. 2001).

Obserwowano także unieruchamianie ołowiu w postaci agregatów na zewnętrznej powierzchni plazmalemmy (SEREGIN i współaut. 2002).

Znaczenie ścian komórkowych dla poziomu tolerancji rośliny na Pb wykazano u klonów i w kulturach tkankowych *Anthoxanthum odoratum*. W klonach tej trawy tolerancyjnych na działanie ołowiu stwierdzono gromadzenie wspomnianego metalu w ścianach

komórkowych, a brak w cytoplazmie. W klonach wrażliwych ołów był obecny w zdeorganizowanej cytoplazmie. Podobne efekty uzyskano, kiedy przeprowadzono doświadczenie z kulturami tkankowymi, wykorzystujące protoplasty klonów tolerancyjnych pozbawionych ścian. Nie wykazywały one znaczącej tolerancji.

U wielu gatunków roślin stwierdzono relatywnie wysokie stężenia kadmu i ołowiu właśnie na terenie ścian komórkowych (SEREGIN i IVANOV 2001 i cytowana tu literatura). Ostatnio opisano także gromadzenie cynku w ścianach komórkowych ryzodermis, zewnętrznej warstwy kory oraz liści u *Armeria maritima* ssp. *halleri* (HEUMANN 2002).

Dla poziomu tolerancji na metal znaczenie ma nie tylko zdolność zatrzymywania metali w ścianach komórkowych, ale i także ich zatrzymywanie w określonych tkankach i organach.

TRANSPORT METALI NA DRODZE POWIERZCHNI KORZENIA – WALEC OSIOWY

Większość roślin należy do grupy tzw. eliminatorów (roślin wykluczających metale), u których w warunkach skażenia środowiska metalami ciężkimi utrzymywany jest niski poziom toksycznego metalu w pędzie, poprzez akumulację go w organach podziemnych, głównie w korzeniu (ANTOSIEWICZ 1992). W ten sposób chronione są liście (a przez to proces fotosyntezy) oraz kwiaty (a przez to organy generatywne roślin).

Zawartość metali ciężkich w różnych organach roślin zmniejsza się zazwyczaj w następującej kolejności: korzeń > liście > łodyga > kwiaty > nasiona.

W korzeniach metale takie jak cynk, ołów i kadm lokalizują się głównie w ryzodermis i w komórkach kory pierwotnej (SEREGIN i IVANOV 2001, HEUMANN 2002).

Duże znaczenie w ograniczeniu transportu ołowiu oraz cynku do nadziemnych części roślin odgrywa endoderma. Zlokalizowane w tej warstwie pasemka Caspary'ego blokują przepływ wody, a wraz z nią toksycznych jonów, drogą apoplastyczną i do pewnego stopnia zabezpieczają walec osiowy i wiązki przewodzące przed dostaniem się do nich metalu (WIERZBICKA 1987, HEUMANN 2002).

W sytuacji, gdy korzeń jest głównym organem zatrzymującym metal ciężki, pewne jego obszary mogą ulegać specyficznej ochronie. W korzeniach *Allium cepa* traktowanych

ołowiem stwierdzono, że metal ten był prawie nieobecny w tzw. strefie cichego centrum (QC). Wskazuje to na istnienie specjalnego mechanizmu zabezpieczającego przed uszkodzeniem komórki inicjalne wierzchołka wzrostu korzenia, odgrywające ważną rolę w procesach regeneracyjnych (WIERZBICKA 1987).

Stwierdzono również, że obszarem szczególnie chronionym przed wnikaniem związków ołowiu są generatywne części kwiatu. Zalążki i rozwijające się w nich woreczki zalążkowe nie zawierały ołowiu nawet, kiedy części wegetatywne badanych roślin były silnie skażone tym metalem. Z tego powodu rozwijające się z tych zalążków nasiona z reguły nie zawierały ołowiu w swoich tkankach (ERNST i współaut. 1990).

Gromadzenie metalu w korzeniu nie jest jednak uniwersalnym mechanizmem decydującym o poziomie tolerancji na metale ciężkie. Opisano wiele gatunków roślin występujących na terenach silnie zanieczyszczonych metalami, które doskonale radzą sobie w tym środowisku, a ponadto kumulują większe ilości metali właśnie w organach nadziemnych czego najjaskrawszym przykładem są wspomniane wcześniej hyperakumulatory.

TRANSPORT METALI NA DRODZE: KORZEŃ – ORGANY NADZIEMNE

Transport metali do części nadziemnych roślin odbywa się poprzez naczynia ksylemu, w soku ksylemowym. Forma transportu metalu ciężkiego tą drogą – poprzez jego związanie, może mieć znacznie dla poziomu tolerancji. Stwierdzono na przykład, że Ni może być transportowany w postaci kompleksu z histydyną. Zdolność do syntezy histydyny, jako odpowiedź na działanie niklu oraz przemieszczanie go w formie kompleksu do części nadziemnych, była skorelowana ze zwiększoną tolerancją na Ni u *Alyssum lesbiacum* (CLEMENS 2001).

W przypadku transportu dużej ilości metali ciężkich do pędu istotne znaczenie ma jego budowa i zdolność do wykształcenia, np. organu spichrzowego w postaci cebuli. U *Allium cepa* rośliny rozwijające się z organów spichrzowych – cebul, były bardziej tolerancyjne na działanie metali, takich jak Pb, Cd i Zn, od roślin tych samych odmian wyhodowanych z siewek. Było to związane z kumulacją dużej części tych metali w cebulach: Pb 46%, Cd 51%, Zn

42% (MICHALAK i WIERZBICKA 1989a, b; WIERZBICKA 1999).

TRANSPORT METALI PRZEZ PLAZMALEMME DO CYTOPLAZMY

Dopóki jony metali przemieszczające się w roślinie nie zetkną się plazmalemą są dla komórek nieszkodliwe. Istotną rolę dla poziomu tolerancji na metal będzie więc miała kontrola transportu tych jonów przez błonę komórkową w kierunku cytozolu.

Ostatnio zidentyfikowano białka o charakterze przenośników zlokalizowane w plazmalemmie i odpowiedzialne za pobieranie takich jonów jak: Zn^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} . Ponieważ ołów i kadm są pierwiastkami balastowymi (zbędnymi) nie wydaje się prawdopodobne, aby istniały przenośniki błonowe ze specyficzną wyłączeniem dla tych metali. Najprawdopodobniej dostają się one do komórek przez przenośniki kationów o szerokiej specyficzności substratowej. Pierwszy przykład roślinnego transportera prawdopodobnie uczestniczącego w przemieszczaniu jonów ołowiu został odkryty w plazmalemmie tytoniu, jest to tzw. kanał NtCBP₄ (ARAZI i współaut. 2000). Zasadniczo wyróżnia się trzy grupy białek będących transporterami metali ciężkich. Są to: ATP-azy metali ciężkich (ang. heavy metal ATPases), rodzina białek Nramp (ang. natural resistance macrophage proteins) oraz rodzina CDF (ang. cation diffusion facilitators). Do pierwszej z tych grup należą ATP-azy typu P. Są to pompy, które przy udziale ATP transportują przez błony cząstki obdarzone ładunkiem. Uważa się, że te białka mogą być potencjalnymi transporterami takich toksycznych metali jak: kadm, miedź, cynk lub ołów. Nramp jest silnie konserwatywną rodziną białek zaangażowanych w transport kationów dwuwartościowych. Obecność białek tego typu stwierdzono u wielu organizmów, w tym także u roślin. Przypuszcza się, że białka te mogłyby uczestniczyć w transporcie jonów do cząsteczek zaangażowanych w konkretne procesy fizjologiczne w różnych roślinnych tkankach i organach. CDF to rodzina białek zaangażowana w transport cynku, kobaltu i kadmu. Białka te mogą brać udział w pobieraniu bądź też usuwaniu, metali z komórek (FOULKES 2000, WILLIAMS i współaut. 2000, CLEMENS 2001, CLEMENS i współaut. 2002, KRUPA i współaut. 2002).

SYSTEM DETOKSYKACJI METALI W KOMÓRCIE

Jeśli jony metalu zdołają przeniknąć przez plazmalemę to na poziom tolerancji rośliny w stosunku do metalu będą miały wpływ czynniki odpowiedzialne za skuteczną i szybką detoksykację metalu w komórce. Należą do nich: wiązanie metali w kompleksy z różnymi ligandami (chelatacja), oraz transport tych kompleksów i gromadzenie metalu w wakuolach.

Procesy te odbywają się przy udziale: białek towarzyszących (chaperons), które uczestniczą w transporcie jonów metali do organelli oraz do metaloprotein a także innych czynników chelatujących, których zadaniem jest buforowanie nadmiaru jonów w cytoplazmie; są to głównie: fitochelatyny, metalotioneiny oraz kwasy organiczne i aminokwasy (CLEMENS 2001).

W procesach tych mogą uczestniczyć także związki fenolowe, co stwierdzono w przypadku chelatacji miedzi u *Armeria maritima ssp. halleri* (NUEMANN i współaut. 1995) oraz fityna i jej pochodne wiążące cynk (VAN STEVENNICK i współaut. 1990).

Metalotioneiny

Są to bogate w cysteinę białka o niskiej masie cząsteczkowej, które wiążą metale w kompleksy metalo-tiolowe. U ssaków są one związane głównie z buforowaniem poziomu cynku. Pierwsza roślina metalotioneina, również wiążąca cynk, została zidentyfikowana i wyizolowana z dojrzałych zarodków pszenicy (MT-II-likewheat E_c). Do dziś znaleziono ponad 50 metalotioneinopodobnych genów w roślinach i wiadomo, że ich synteza jest indukowana nie tylko przez metale, ale przez inne czynniki stresowe.

Przypuszcza się, że białka te uczestniczą w: buforowaniu cytozolowego poziomu cynku, transporcie metali do starzejących się liści (SIEDLECKA i współaut. 2001).

Metalotioneiny odgrywają także istotną rolę w procesach detoksyfikacji metali – szczególnie miedzi – opisano np. związek wysokiej tolerancji na miedź u populacji *Silene vulgaris* z podwyższonym poziomem transkrypcji metalotioninowego genu typu 2b (VAN HOOFF i współaut. 2001)

Fitochelatyny

Szczególne zainteresowanie w badaniach nad poziomem tolerancji u roślin poświęcono

fitochelatynom. Uważa się, że synteza tych związków jest jednym z podstawowych elementów odpowiedzi rośliny w warunkach skażenia metalami (COBBET 2000). Fitochelatyny są metalotiolowymi polipeptydami, które zaklasyfikowano do grupy III metalotionein. Związki te utworzone na bazie charakterystycznego, powtarzającego się 2–11-krotne dipeptydu –Glu–Cys, są powszechnie spotykane w komórkach roślinnych. Spośród nich najbardziej rozpowszechnione są fitochelatyny należące do rodziny o strukturze (–Glu–Cys)_n będące pochodnymi glutationu. Uważa się, że to właśnie te fitochelatyny odgrywają najważniejszą rolę w procesach detoksyfikacyjnych. Synteza fitochelatyn odbywa się na drodze enzymatycznej przy udziale enzymu –Glu–Cys dipeptydyltranspeptydazy (syntazy fitochelatynowej), która jest aktywowana przez jony: Cd (II), Ag (I), Bi (III), Pb (II), Zn (II), Cu (II), Hg (I) oraz Au (I).

Rola fitochelatyn w detoksyfikacji metali polega na ich wiązaniu w kompleksy, dzięki czemu grupy tiolowe (SH) oraz histydyłowe białek komórkowych są chronione przed oddziaływaniem z metalami. Kompleksy PCS-metal są następnie transportowane do wakuoli, gdzie metal ulega oddzieleniu od pozostałych organelli komórkowych i poprzez to unieszkodliwieniu. Mechanizm ten jest istotny w procesach detoksyfikacji miedzi i kadmu. Kompleksy tworzone przez fitochelatyny z cynkiem i ołowiem nie są stabilne (SIEDLECKA i współaut. 2001).

Stwierdzono, że niedobór fitochelatyn u roślin jest sprzężony z hiperwrażliwością na kadm, miedź i arsen (CLEMENS i współaut. 2002), jednakże wielokrotnie wykazano, iż sama zdolność rośliny do syntezy fitochelatyn oraz ich zwiększona ilość nie determinują poziomu tolerancji na metale. I tak np. spośród trzech badanych ostatnio gatunków roślin motylkowych: *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, największą wrażliwością na działanie ołowiu stwierdzono u fasoli, jednocześnie poziom homofitochelatyn syntetyzowanych u tej rośliny nie był wcale najniższy (PIECHALAK i współaut. 2002). Wynik ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów. W przypadku tolerancji na kadm, zawartość fitochelatyn u roślin *Silene vulgaris* z populacji tolerancyjnej na ten metal była niższa, w porównaniu z zawartością u roślin z populacji wrażliwej (KNECHT i współaut. 1995).

Podobnie zwiększona tolerancja na cynk u tego samego gatunku nie była skorelowana ze zwiększoną produkcją fitochalatyn (HERMENS i współaut. 1993).

Uważa się, że na poziom tolerancji rośliny na dany metal, w odniesieniu do fitochelatyn, mają wpływ: szybkość formowania kompleksów z jonami metali, zdolność do formowania kompleksów przez istniejący system fitochelatyn z danym metalem, zdolność do syntezy różnych rodzajów fitochelatyn o różnej długości łańcucha (gatunki wrażliwe syntetyzują mało fitochelatyn i o małej różnorodności w budowie łańcucha), wydłużanie łańcucha fitochelatynowego, oraz szybkość transportu kompleksów PCS-metal do wakuoli (HERMENS i współaut. 1993, KNECHT i współaut. 1995)

Kwasy organiczne i aminokwasy

Ze względu na swoją budowę kwasy organiczne: cytrynowy, jabłkowy, szczawiowy mogą być potencjalnymi ligandami jonów metali. Kwasy te uczestniczą prawdopodobnie w transporcie metali do wakuoli oraz w transporcie ksylemowym (zabezpieczają metal przed adsorpcją na ścianach komórkowych). Kwas cytrynowy jest związany prawdopodobnie z tolerancją na kadm, nikiel i cynk zaś jabłkowy z tolerancją na cynk (SIEDLECKA i współaut. 2001). Wydzielanie jabłczanów, cytrynianów oraz szczawianów przez korzeń jest częstą reakcją wielu roślin na skażenie glinem. Wspomniane wyżej aniony tworzą stabilne kompleksy z kationami glinu i chronią korzeń przed toksycznym działaniem tego metalu. W ten sposób szczególnie zabezpieczany jest wierzchołek korzenia (MA i współaut. 2001).

Rola aminokwasów w procesach związanych z tolerancją na metale polega na chelataowaniu przez nie metali na terenie cytozolu, np. głównymi ligandami miedzi są asparaginy i histydyna, niklu-histydyna oraz glutaminian i prolina (SIEDLECKA i współaut. 2001).

USUWANIE METALI Z CYTOZOLU

Jak już wcześniej wspomniano, istotnym mechanizmem tolerancji na metale ciężkie jest zdolność ich wiązania na terenie cytoplazmy, a następnie oddzielenie od pozostałych organeli komórkowych poprzez gromadzenie w wakuolach. Duże elektronowo gęste złogi metalu na terenie wakuol, to typowy obraz ultrastruktury komórek roślinnych traktowanych

ołowiem i kadmem. W wakuolach i ścianach komórkowych stwierdzono akumulację nawet do 96 % pobranych metali (SEREGIN i IVANOV 2001). Gromadzenie miedzi w wakuolach idoblastów stwierdzono u *Armeria maritima ssp. halleri* (NUEMANN i współaut. 1995), ostatnio zaś przy zastosowaniu autometalografii gromadzenie cynku w wakuolach tkanek korzenia oraz liści u tego samego gatunku (HEUMANN 2002).

Ze względu na wspomniane zjawiska wydaje się, że duże znaczenie dla poziomu tolerancji na metale może odgrywać w roślinie sprawny system transportu nadmiaru jonów metali z cytozolu do wakuoli, którego sprawność będzie zależała w dużej mierze od efektywnej regulacji transportu jonów przez tonoplast. Aktualnie prowadzone są badania nad identyfikacją transporterów jonowych obecnych w tonoplastcie – zidentyfikowano takie transportery potencjalnie pośredniczące w przemieszczaniu się jonów kadmu u drożdży oraz cynku u roślin (CLEMENS 2001).

Stwierdzono obecność jonów Cd i Pb w strukturach Golgiego i ER, co wskazuje, że transport tych metali może odbywać się za pośrednictwem systemu błon komórkowych (SEREGIN i IVANOV 2001).

Okazuje się, że nadmiar metalu może być usuwany z cytozolu nie tylko do wakuoli, ale także poza obręb komórki do apoplastu korzenia, poprzez uwypuklenia plazmalemy tzw. plazmatubule, co było obserwowane w korzeniach *Allium cepa* traktowanych ołowiem (WIERZBICKA 1998).

SPECYFICZNA GOSPODARKA MINERALNA: WAPNIEM, FOSFOREM I POTASEM

Jednym z najważniejszych czynników, poprzez które metale ciężkie wywierają wpływ na procesy metaboliczne i fizjologiczne roślin, jest ich oddziaływanie z pierwiastkami pobieranymi przez rośliny jako składniki pokarmowe. Obecność metali ciężkich może prowadzić do niedoborów pierwiastków niezbędnych do prawidłowego przebiegu fotosyntezy, takich jak żelazo, fosfor i wapń. Z drugiej jednak strony, pobieranie metali ciężkich może być ograniczane lub hamowane przez niektóre mikro- i makroelementy. W stosunku do kadmu takie działania wykazują zwykle wapń, fosfor, cynk, miedź, mangan i żelazo. Z kolei cynk obniża pobieranie ołowiu (KRUPA i współaut. 2002)

Populacje roślin o wysokim poziomie tolerancji na metale ciężkie są także, w porównaniu z populacjami wrażliwymi, bardziej tolerancyjne na deficyt składników mineralnych, mają mniejsze wymagania żywieniowe, a także specyficzną gospodarkę mineralną dostosowaną do obecności metali ciężkich (ANTOSIEWICZ 1995). Z danych literaturowych wynika, że ważną rolę odgrywa tu gospodarka wapniem, fosforem i potasem.

Wapń

Ten makroelement zajmuje kluczową pozycję w transdukcji sygnału w komórkach roślinnych. Informacja przekazywana poprzez jony wapnia dotyczy działania różnorodnych bodźców mających charakter mechaniczny, termiczny i chemiczny (stres oksydacyjny, osmotyczny i mineralny). Wapń jest również niezbędny do prawidłowego działania aparatu fotosyntetycznego. Podwyższona zawartość miedzi i kadmu w środowisku prowadzi do obniżenia zawartości wapnia w organach roślin (KRUPA i współaut. 2002).

Rola wapnia w tolerancji roślin na metale ciężkie jest nie do końca wyjaśniona. Po pierwsze polega ona na ograniczaniu pobierania metali ciężkich ze środowiska co wynika z fizjologicznego antagonizmu wapnia i jonów metali ciężkich (SIEDLECKA i współaut. 2001). Zależność tę opisano już we wcześniejszych badaniach. Wapń powodował ograniczenie pobierania ołowiu u *Festuca ovina* oraz *Hordeum vulgare*, a także stymulację wydłużeniowego wzrostu korzeni roślin traktowanych ołowiem (GARLAD i WILKINS 1981). Autorzy zwrócili uwagę, że to ostatnie zjawisko nie było jedynie rezultatem zmniejszonej zawartości ołowiu w tkankach roślin, lecz wynikało z działania wapnia na poziomie komórkowym.

Stwierdzono również, że podwyższona zawartość wapnia w pożywce zawierającej toksyczny poziom glinu osłabiała hamujące działanie tego pierwiastka na wzrost wydłużeniowy korzeni *Triticum aestivum* L. na skutek redukcji negatywnego elektropotencjału powierzchni komórek (KINRAIDE 1998).

U roślin odznaczających się wysoką tolerancją na ołów takich jak *Silene vulgaris* oraz *Lyopersicon esculentum*, stwierdzono specyficzną gospodarkę wapniem, tj. wysoki status wapnia w tkankach oraz wysoki poziom tolerancji na deficyt wapnia. Pierwiastek ten w komórkach roślinnych, podobnie jak metale ciężkie, lokalizuje się głównie na terenie ścian komórkowych i wakuolach w formie soli organicznych lub związków z fosforem. Poziom wapnia w cytoplazmie jest bardzo niski (submikromolarny), stąd zmiany w zawartości wapnia są prawdopodobnie związane ze zmianami w jego puli apoplastycznej. Wydaje się, że rola wapnia w procesach detoksyfikacyjnych może być związana właśnie z udziałem tego pierwiastka w deponowaniu np. ołowiu i kadmu w postaci agregatów z fosforanami w apoplazmie komórek. Przy wysokim tkankowym poziomie wapnia u roślin tolerancyjnych w stosunku do ołowiu, związanie pewnej jego części w celu detoksyfikacji metalu ciężkiego może nie wpływać znacząco na gospodarkę rośliny, co pozwala na jej wzrost w warunkach skażenia metalem ciężkim (ANTOSIEWICZ 1995).

Kolejne wytłumaczenie roli wapnia w procesach związanych z uzyskiwaniem tolerancji na metale ciężkie jest związane z funkcją sygnałową tego pierwiastka w układzie Ca^{+2} /kalmodulina. Reakcje zależne od kalmoduliny mogłyby być zakłócane poprzez chroniczne aktywowanie tego białka poprzez metale ciężkie, oddziałujące na zasadzie kompetycji. Tego typu zależność opisano po raz pierwszy dla komórek zwierzęcych (HABERMANN i współaut. 1983, CHEUNG 1984). Stwierdzono ponadto, że inhibitory kalmoduliny mogą modyfikować toksyczne działanie kadmu u gryzoni. Jest to związane z zależną od wapnia ścieżką indukcji metalotionein (SHIRASHI i WAALKES 1994).

W przypadku komórek roślinnych istnieją hipotezy, że kalmodulina jest kluczowym czynnikiem w toksyczności glinu, jednakże wiązanie tego pierwiastka do kalmoduliny zostało pokazane jedynie *in vitro* (RENGEL 1992). Zastępowanie Ca^{+2} przez jony Cd^{+2} w kalmodulinie stwierdzono natomiast u *Raphanus sativus*, co prowadziło do inhibicji aktywności kalmodulino-zależnej fosfodiesterazy (RIVETTA i współaut. 1997).

Wiadomo już także, iż w transporcie metali ciężkich przez błony uczestniczą kanały białkowe, których działanie jest regulowane przez układ Ca^{+2} /kalmodulina (ARAZI i współaut. 2000).

Fosfor

Metale ciężkie mogą powodować obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu fosforu, pierwiastka niezbędnego w fotosyntezie, powodując zakłócenie fotosyntetycznego transportu elektronów oraz obniżenie aktywności enzy-

mów fotosyntetycznych (KRUPA i współaut. 2002).

W badaniach tolerancyjnej na ołów hałdowej populacji *Silene vulgaris* stwierdzono związek pomiędzy zdolnością do gromadzenia fosforu a osiąganiem wysokiego poziomu tolerancji na ten metal. U roślin traktowanych ołowiem zaobserwowano znaczny wzrost poziomu fosforu w tkankach w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Zjawisko to może być tłumaczone faktem, że dostępność fosforu sprzyja prawdopodobnie procesom związanym z odkładaniem i detoksykacją ołowiu w ścianach komórkowych w postaci związków fosforowych (ANTOSIEWICZ 1995).

Potas

Rośliny charakteryzujące się wysoką zawartością potasu kumulują mniej kadmu i ołowiu niż rośliny o niskim statusie tego pierwiastka (SIEDLECKA 1995).

Jony potasowe mogą być związane z kompartmentacją metali u hyperakumulatorów - stwierdzono obniżony transport tego pierwiastka z korzeni do pędu u alpejskich hyperakumulatorów ołowiu, cynku i niklu. Mechanizm ten nie został jeszcze poznany (WENZEL i JOCKWER 1999).

GOSPODARKA WODNA ROŚLIN

Dostępność wody i stopień zawartości wody w komórkach roślin może być uważany za główny czynnik w regulacji wzrostu roślin. Jony metali ciężkich oraz glinu wykazują toksyczne działanie na rośliny już przy bardzo niskich, bo mikromolarnych stężeniach. Szkodliwe działanie metali ciężkich nie wynika z obniżenia przez ich obecność potencjału osmotycznego roztworu, w którym znajduje się roślina, gdyż zjawisko to ma miejsce przy stężeniach jonów co najmniej 0,1 molarnych, a więc wielokrotnie wyższych. Obserwowane zaburzenia w gospodarce wodnej pod wpływem metali ciężkich nie są zatem efektem bezpośredniego, osmotycznego działania roztworów soli metali na komórki roślinne, ale skutkiem zmian wywoływanych już przez bardzo niskie stężenia jonów metali we właściwości błon plazmatycznych, w aktywności enzymów oraz we wzroście korzenia (POSCHENRIEDER i BARCELO 1999).

Wydaje się, że prowadzenie specyficznej gospodarki wodnej w warunkach skażenia me-

talami ciężkimi ma znaczenie dla zjawiska tolerancji w stosunku do tych metali.

W badaniach trzech gatunków roślin: *Silene vulgaris*, *Dianthus carthusianorum*, *Biscutella laevigata*, występujących na hałdzie galmanowej w Bolesławiu koło Olkusza (siedlisko odznaczające się wysoką zawartością metali ciężkich, a ponadto warunkami niedoboru wody i wysokiego nasłonecznienia), stwierdzono współwystępowanie przystosowań kseromorficznych i wysokiej tolerancji na metale ciężkie (cynk i ołów). Populacje trzech wymienionych gatunków rosnące na hałdzie różniły się od populacji roślin pochodzących ze stanowisk nieskażonych metalami ciężkimi obecnością przystosowań do oszczędnej gospodarki wodnej, a jednocześnie wykazywały wyższy poziom tolerancji na metale ciężkie (WIERZBICKA 2002).

W świetle powyższych wyników należałoby oczekiwać, że na wspomnianej hałdzie galmanowej powinny dominować gatunki sucholubne. Tymczasem ekotypami mającymi największy udział w tworzeniu flory galmanowej są mezofity (55%). Ponadto w badaniach porównawczych tolerancji na ołów pomiędzy roślinami o różnych wymaganiach w stosunku do wilgotności gleby okazało się, że największą tolerancję wykazuje *Rumex aquaticus* (IT= 60 %), zaś najniższą rośliny gleb suchych – *Helichrysum sp.* (IT=15%) i *Berteroa incana* (IT=10%) (WIERZBICKA i POTOCKA 2002).

Określenie, czy prowadzenie oszczędnej gospodarki wodnej ma bezpośredni związek z uzyskaniem wyższej tolerancji na metale ciężkie wymaga dalszych badań.

MIKORYZA

Ostatnio podkreśla się istotną rolę mikoryzy we wzroście i rozwoju roślin w warunkach skażenia metalami. Spośród mikroorganizmów glebowych grzyby mikoryzowe są bezpośrednim ogniwem pomiędzy glebą a korzeniami i dlatego mogą mieć wielkie znaczenie dla dostępności i toksyczności metali ciężkich dla roślin.

Obecność grzybów mikoryzowych może stanowić barierę mechaniczną i chemiczną dla wnikania metali, co wynika z udziału tych organizmów w procesach unieruchamiania i wiązania metali poprzez wytrącanie siarczków, uwodnionych tlenków żelaza, wiązanie przez polisacharydy oraz węglany i szczawiany.

Mikoryza powoduje stymulację wzrostu drzew w warunkach skażenia metalami ciężki-

mi poprzez ich ochronę przed infekcją patogenów oraz przez obniżanie toksyczności podłoża. Ważnym mechanizmem ochronnym jest zahamowanie przemieszczania się metali ciężkich do tkanek roślinnych. Występowanie tego zjawiska jest tłumaczone faktem wiązania wspomnianych metali przez pigmenty depozytowane na powierzchni grzybni przerastającej glebę oraz w obrębie grzybni w bogatych w fosfor ziarnistościach wakuolarnych (LEYVAL i współaut. 1997, TURNAU i współaut. 2002).

Grzyby mikoryzowe mają wpływ na pobieranie cynku i ołowiu, co stwierdzono np. u *Lygeum spartum* i *Anthyllis cystidoides* inokulowanych grzybami mikoryzowymi *Glomus macrocarpum* i *Glomus mosseae* (DIAZ i współaut. 1996), oraz na ograniczanie ich przemieszczanie się do części nadziemnych (TURNAU i współaut. 2002). Kolonizacja korzenia trawy *Holcus lanatus* odpornej na arsen, porastającej skażone tereny pokopalniane, przez grzyby mikoryzowe (*Glomus mosseae* i *Glomus caledonium*) powodowała redukcję pobierania arsenu z zanieczyszczonej tym pierwiastkiem gleby. Prawdopodobnie to właśnie grzyby mikoryzowe jako pierwsze wytworzyły odporność na arsen i spowodowały podwyższenie odporności na ten pierwiastek u zasiedlonej rośliny (GONZALES-CAVEZ i współaut. 2002). Obecność mikoryzy arbuskularnej u *Vitis vinifera* L. ograniczała transport manganu, cynku, żelaza, miedzi, ołowiu i kadmu do liści tej rośliny taktowanej metalami. Zawartość ołowiu i kadmu w owocach wspomnianej rośliny była mniejsza u roślin z mikoryzą, w porównaniu z roślinami bez mikoryzy (KARAGIANIDIS i NIKOLAU 2000).

Podejrzewa się wpływ grzybów na uwalnianie substancji chelatujących metal do gleby przez korzeń oraz na gospodarkę mineralną i hormonalną rośliny poddanych działaniu metali ciężkich (JENTSCHKE i GOLDBOLD 2000, LIU i współaut. 2000).

Okazuje się też, iż rośliny w niektórych związkach mikoryzowych są mniej wrażliwe na toksyczne działanie kadmu, w porównaniu z roślinami nie będącymi w takich związkach. Mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze wyjaśniony. Ochronna rola mikoryzy może tu wynikać z ograniczania przez grzyby dostępu kadmu do miejsc wrażliwych w tkankach korzenia lub też może być związana z wydzielaniem związków chelatujących metal. Możliwe jest także wspomaganie systemu obronnego rośliny

poprzez syntezę i dostarczanie glutationu (SCHÜTZENDÜBEL i POLLE 2002).

OBRONA PRZED STRESEM OKSYDACYJNYM - ROLA GLUTATIONU I SYNTEZA ENZYMÓW ODPORNYCH NA OBECNOŚĆ METALU CIĘŻKIEGO W KOMÓRCIE

Metale ciężkie, podobnie jak inne czynniki stresotwórcze, powodują wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych w komórkach roślin. Proces ten prowadzi do poważnych uszkodzeń komórek poprzez niespecyficzne utlenienie białek i lipidów a także zmiany w materiale genetycznym (SCHÜTZENDÜBEL i POLLE 2002, GEEBELEN i współaut. 2002). Obecność metali ciężkich w środowisku indukuje aktywność enzymów uczestniczących w reakcjach red-ox (peroxydaz) (GEEBELEN i współaut. 2002, CUYPERS i współaut. 2002).

Wydaje się jednak, że zdolność roślin do aktywacji systemu antyoksydacyjnego w warunkach skażenia metalami ciężkimi jest ograniczona. W wielu badaniach pokazano, że traktowanie roślin podwyższonymi dawkami metali, takich jak miedź lub żelazo (aktywnych w reakcjach red-ox), powodowała spadek, nie zaś wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Cechą charakterystyczną odpowiedzi na działanie metali ciężkich w komórkach roślin był ubytek w puli glutationu. Ten tiolowy związek jest ważnym elementem systemu antyoksydacyjnego komórek a jednocześnie prekursorem w syntezie fitochelatyn. Możliwe jest, że krótkotrwały brak glutationu na skutek zużycia do syntezy fitochelatyn osłabia system przeciwutleniający komórki, sprzyja akumulacji reaktywnego tlenu i zakłóca procesy rozwoju. Zwiększona zdolność do syntezy glutationu wydaje się być kluczowa w przypadku tolerancji na działanie kadmu. Wydaje się również, że dodatkowym źródłem glutationu dla komórek roślinnych są grzyby mikoryzowe (SCHÜTZENDÜBEL i POLLE 2002).

W warunkach skażenia metalami ciężkimi bardzo istotną dla uzyskania tolerancji byłaby zdolność rośliny do syntezy enzymów antyoksydacyjnych niewrażliwych na toksyczne dawki metalu.

U populacji *Silene paradoxa*, odznaczającej się wysokim poziomem tolerancji w stosunku do niklu, stwierdzono zjawisko ograniczenia inhibicyjnego działania tego metalu na wymiatające enzymy peroxysomalne. Hamowanie aktywności tych enzymów induko-

wane przez obecność metalu powodowało stres oksydacyjny u roślin wrażliwych na nikiel (GONELLI i współaut. 2001).

INNE, NIESPECYFICZNE CZYNNIKI ZAANGAŻOWANE W ODPOWIEDŹ ROŚLIN NA STRES

Zmiany wywołane w metabolizmie rośliny przez działanie metali ciężkich powodują aktywację mechanizmów ochronnych, których celem jest przywrócenie homeostazy w roślinie w warunkach oddziaływania czynnika stresotwórczego. Część z tych mechanizmów jest

niespecyficzna dla metali ciężkich i ulega aktywacji także pod wpływem innych bodźców stresowych, np. wysokiej i niskiej temperatury, zasolenia, niedoboru tlenu. Oprócz wyżej wspomnianych mechanizmów związanych z obroną przed stresem oksydacyjnym metale ciężkie powodują również: nadprodukcję osmolitów, np. proliny oraz poliamin, zmiany we właściwościach fizyko-chemicznych ścian komórkowych (odkładanie kalozy i suberyny), zmiany w równowadze hormonalnej (w syntezie etylenu i ABA), syntezę białek stresu np. HSPS (białka szoku cieplnego) (SEREGIN i IVANOV 2001)

GENETYCZNE I FIZJOLOGICZNE PODŁOŻE TOLERANCJI NA METALE CIĘŻKIE

Przedstawione powyżej mechanizmy decydują o poziomie konstytucjonalnej i indukowanej tolerancji na metale. Tolerancja konstytucjonalna występuje u roślin, które w środowisku naturalnym nie zetknęły się z takim stężeniem metali, które mogłoby wywierać presję selekcyjną. Tolerancja indukowana pojawia się u roślin, w czasie stosunkowo krótkim jak na zjawisko ewolucyjne, na skutek kontaktu z wysokimi stężeniami metali w glebie (np. w sąsiedztwie kopalń). Wysoki poziom metali ogranicza wzrost roślin nietolerancyjnych i prowadzi do rozwoju populacji tolerancyjnej z tolerancyjnych mutantów, które stanowią 1% populacji wyjściowej. Uważa się, że tolerancja indukowana ma podłoże genetyczne. W przypadku tolerancji konstytucjonalnej duże znaczenie może odgrywać tzw. fizjotyp rośliny lub grupy roślin, na który składa się zdolność do większego lub mniejszego pobierania jonów ze środowiska, zdolność do gromadzenia jonów oraz inne cechy które mogą determinować zdolność roślin do adaptacji do warunków podniesionego poziomu metalu w środowisku (ANTOSIEWICZ 1993, 1995).

TOLERANCJA NA OŁÓW

W badaniach pochodzących z lat 70. XX w. wykazano dziedziczne podłoże tolerancji na ten metal (URQUHART 1971, WU i ANTONOVICS 1976). Tymczasem w późniejszych badaniach nad populacją *Silene vulgaris*, charakteryzującą się wysokim poziomem indukowanej tolerancji na ołów (rośliny pochodziły z hałdy galmanowej), stwierdzono stopniowy spadek poziomu tolerancji u roślin hodowanych w

okresie 4 lat w nieskażonej metalami ziemi ogrodniczej. Zjawisko to było tłumaczone faktem, iż tolerancja na ołów jest prawdopodobnie reprezentowana przez gen dominujący, którego ekspresja może być kontrolowana przez małą liczbę innych genów. Podczas hodowli w ziemi ogrodniczej (bez wysokiego stężenia ołowiu jako czynnika selekcyjnego) dochodziło do krzyżowego zapylenia roślin. W obrębie całej populacji mogły być osobniki o niższej tolerancji, nie eliminowane na skutek braku presji selekcyjnej, a ich udział w puli genetycznej populacji doprowadził do stopniowego obniżenia poziomu tolerancji (ANTOSIEWICZ 1995).

TOLERANCJA NA KADM

Genetyczne uwarunkowanie tolerancji na kadm stwierdzono np. u *Chlamydomonas reinhardtii* (COLLARD i MATAGNE 1990). Natomiast u klonów traw: *Agrostis capillaris*, *Deschampsia caespitosa*, *Festuca ovina* i *Holcus lanatus*, opisano podobne do wspomnianego powyżej, zjawisko utraty tolerancji w stosunku do tego metalu. Otrzymane z nasion klony tych traw hodowano przez trzy lata w glebie macierzystej — pochodzącej z siedlisk skażonych, bądź nieskażonej kadmem. Porównanie tych roślin z genetycznie identycznym materiałem hodowanym w glebie nieskażonej metalem pokazało generalny spadek tolerancji na kadm. Zanotowano ogólnie 13% spadek indeksu tolerancji. Stwierdzono też możliwości częściowego indukowania tolerancji na kadm *de novo* u roślin *Holcus lanatus* pochodzących z nieskażonych siedlisk (BAKER i współaut. 1986).

Genetyczne uwarunkowanie tolerancji na metale ciężkie stwierdzono i opisano:

- w stosunku do cynku, np. u pochodzącej z hałdy galmanowej populacji *Silene vulgaris* (WIERZBICKA i ZYSKA 1999);

- w stosunku do miedzi, np. *Silene vulgaris*;

- w stosunku do glinu, np. u *Hordeum vulgare*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*;

- w stosunku do arsenu, np. u *Holcus lanatus* (WO NY 1995 i cytowana tu literatura).

Genetyczna kontrola tolerancji na metale nie została jednakże jeszcze dokładnie wyjaśniona. Znane są trzy modele proponujące wytłumaczenie mechanizmu kontroli genetycznej tolerancji na dany metal:

(1) model jednego, głównego genu z możliwym udziałem innych genów, o mniejszej sile, modyfikujących ekspresję genu głównego;

(2) model wielogenowy – gdzie wyróżnia się niewielką liczbę genów, z których każdy ma relatywnie duży wpływ na zmienność środowiskową;

(3) model poligeniczny – gdzie tolerancja na metale jest związana z mniejszą lub większą liczbą genów, lecz wpływa każdego z nich jest stosunkowo niewielki w odniesieniu do określonego elementu zmienności środowiskowej (WO NY 1995).

W ostatnich badaniach często opisywane jest zjawisko współwystępowania tolerancji na różne metale. Na przykład w badaniach ko-segregacji tolerancji na miedź, cynk, nikiel, kobalt i kadm, w krzyżówkach pomiędzy wyraźnie różniącymi się poziomem tolerancji eko-typami *Silene vulgaris*, wykazano nieplejotropową genetyczną kontrolę tolerancji na miedź, cynk i kadm. Natomiast tolerancja na nikiel i kobalt wydawała się plejotropowym produktem ubocznym allelu tolerancji jednego szczególnego locus odpowiedzialnego za tolerancję na cynk (SCHAT i VOOIJS 1997). U *Silene paradoxa* stwierdzono zaś występowanie kotolerancji na miedź i nikiel (GONELLI i współaut. 2001).

PODSUMOWANIE

W obronę rośliny przed toksycznym działaniem metalu ciężkiego i uzyskanie tolerancji na dany metal zaangażowanych jest zwykle wiele czynników. Rośliny tolerancyjne w stosunku do danego metalu mogą wykazywać różnice w sposobie akumulacji i translokacji tego metalu, nawet jeśli odznaczają się podobną tolerancją i traktowane są podobnymi stężeniami toksycznego pierwiastka. Możliwe jest istnienie różnych mechanizmów tolerancji w stosunku do jednego metalu (WO NY 1995).

Generalnie, niezależnie od podłoża danego zjawiska, dominujący mechanizm tolerancji będzie zależał od: gatunku, fazy wzrostu rośliny, tkanki lub organu, rodzaju metalu, czasu działania oraz zastosowanej dawki (SIEDLECKA i współaut. 2001).

Z dotychczasowych badań wynika też, że np. w tolerancję na cynk zaangażowane są głównie procesy związane z jego detoksykacją przez kwasy organiczne i magazynowanie w wakuoli, na ołów – to głównie unieruchamianie go w ścianach komórkowych, natomiast na kadm – to detoksykacja przy udziale fitochelatyn lub też akumulacja w ścianach komórkowych.

Niewiele jest danych opisujących pełną odpowiedź rośliny na działanie określonego meta-

lu ciężkiego – czyli jednoczesne uwzględnienie wszystkich potencjalnych mechanizmów mogących decydować o poziomie tolerancji danej rośliny w stosunku do określonego metalu, składających się na występowanie tzw. syndromu tolerancji (BAKER i WALKER 1990). Duży postęp w tej dziedzinie przyniosą z pewnością badania nad genetycznym podłożem tolerancji u hyperakumulatorów (CLEMENS i współaut. 2002). Celem tych badań jest, między innymi, uzyskanie transgenicznych roślin do procesów związanych z fitoremediacją. Fitoremediacja to zabiegi polegające na użyciu roślin do degradowania, ekstrakcji lub stabilizacji zanieczyszczeń – także i metali ciężkich (WÓJCIK 2000). Wykorzystanie roślin w tego typu zabiegach jest trudne ze względu na brak naturalnych gatunków posiadających wszystkie cechy niezbędne do efektywnej fitoremediacji. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem roślin będących w symbiozie mikoryzowej (KHAN 2001, KHAN i współaut. 2000). Cechy jakimi powinny odznaczać się rośliny przeznaczone do fitoremediacji to: szybki wzrost, duża biomasa, głęboki system korzeniowy, powinny być łatwe w zbiorze oraz tolerować i akumulować duże ilości metali w swoich częściach nadziemnych (CLEMENS i

współaut. 2002). Wyodrębnienie poszczególnych genów decydujących np. o zdolności rośliny do wysokiej akumulacji metalu, a następnie przeniesienie ich do innego gatunku, pozwoli na uzyskanie idealnego dla potrzeb fitoremediacji obiektu.

Istniejąca w roślinach sieć mechanizmów chroniących przed toksycznym działaniem metali ciężkich w przyszłości umożliwi wykorzystanie roślin w celu przywrócenie równowagi biocenotycznej w ekosystemach zniszczonych przez przemysłową działalność człowieka.

MECHANISMS OF PLANT TOLERANCE TO HEAVY METALS

S u m m a r y

Plants have evolved complex of protective mechanisms that allow them to grow and develop in heavy metal-contaminated environments. They show different degrees of tolerance to heavy metals, depending on the species, population or even developmental stage of the plant. This is a review of literature data on the anatomical, physiological and biochemical mechanisms responsible for the formation of "the heavy metal tolerance syndrome" in plants. Numerous factors have been involved in development of heavy metal tolerance. The main ones encompass processes occurring on the root surface of the plants that lead to restriction of heavy metal absorption, mycorrhizae, transport of heavy metals through the apoplastic path-

way, transport from the epidermis to the vascular cylinder, transport from the root to the shoot, and transport across the plasma membrane to the cytoplasm. Plants are able to detoxify heavy metal ions inside the cell with phytochelatins, metallothioneins or organic acids. Other factors involved in, and contributing to heavy metal tolerance include excretion of heavy metals from the cytoplasm to the apoplast and from plant organs, specific mineral-handling pathways and water regimes of plants, as well as the ability to synthesize heavy metal-resistant enzymes. Knowledge of the fundamentals of heavy metal tolerance will aid in the effective use of plants in phytoremediation.

LITERATURA

- ANDERSON C. W. N., BROOKS R. R., CHIARUCCI A., LACOSTE C. J., LEBLANC M., ROBINSON B. H., SIMCOCK R., STEWART R. B., 1999 *Phytomining for nickel, thallium and gold*. J. Geochem. Explor. 67, 407-415.
- ANTOSIEWICZ D. M., 1992 *Adaptation of plants to environment polluted with heavy metals*. Acta Soc. Bot. Pol. 61, 281-289.
- ANTOSIEWICZ D. M., 1993. *Mineral status of dicotyledonous plants crop plants in relation to their constitutional tolerance to lead*. Environ. Exp. Bot. 33, 575-589.
- ANTOSIEWICZ D. M., 1995. *The relationship between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in Biscutella laevigata and Silene inflata*. Environ. Exp. Bot. 35, 55-69.
- ANTOSIEWICZ D. M., WIERZBICKA M., 1999. *Localisation of lead in Allium cepa L. cells by electron microscopy*. J. Microscop. 194, 195, 139-146.
- ARAZI T., KAPLAN B., SUNKAR R., FROMM H., 2000. *Cyclic-nucleotide- and Ca^{+2} /calmodulin-regulated channels in plants: targets for manipulating heavy-metal tolerance, and possible physiological roles*. Biochem. Soc. Trans. 28, 471-475.
- BAKER A. J. M., WALKER P. L., 1990. *Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants*. [W:] *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. SHAW J. (red.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 155-177.
- BAKER A. J. M., GRANT C. J., MARTIN M. H., SHAW S. C., WHITEBROOK J., 1986. *Induction and loss of cadmium tolerance in Holcus lanatus L. and other grasses*. New Phytol. 102, 575-587.
- BARCELO J., POSCHENRIEDER Ch., 1999. *Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants*. [W:] *Heavy metal stress in plants (from molecules to ecosystems)*. PRASAD M. N. V., HAGEMEYER J. (red.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 183-205.
- BOROVIK A. S., 1990. *Characterisation of metal ions in biological systems*. [W:] *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. SHAW A. J. (red.). CRP Press Inc, Boca Raton, Florida, 3-5.
- CHEUNG W.Y., 1984. *Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity*. Fed. Proceed. 43, 2995-2999.
- CLEMENS S., 2001. *Molecular mechanism of plant metal homeostasis and tolerance*. Planta 212, 475-486.
- CLEMENS S., PALMGREN M. G., KRÄMER U., 2002. *A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation*. Trends Plant Sci. 7, 309-315.
- COBBET C. S., 2000. *Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification*. Plant Physiol. 123, 825-833.
- COLLARD J. M., MATAGNE R. F., 1990. *Isolation and genetic analysis of Chlamydomonas reinhardtii strain resistant to cadmium*. Appli. Environ. Microbiol. 56, 2051-2055.
- CUYPERS A., VANGRONSVELD J., CLIJSTERS H., 2002. *Peroxi-dases in roots and primary leaves of Phaseolus vulgaris. Copper and zinc phytotoxicity: a comparison*. J. Plant Physiol. 159, 869-876.
- DAHMANI-MULLER H., VAN OORT F., GÉLIE, BALABANE M., 2000. *Strategies of heavy metal uptake by three*

- plant species growing near a metal smelter. *Environment. Pollut.* 109, 231–238.
- DIAZ G., AZCON AGUILAR C., HONRUBIA M., 1996. *Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of Lygeum spartum and Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil* 180, 241–249.
- ERNST W. H. O., SCHAT H., VERKLEIJ J. A., 1990. *Evolutionary biology of metal resistance in Silene vulgaris*. *Evol. Trends Plants* 4, 45–51.
- FOULKES E. C., 2000. *Transport of toxic metals across cell membranes*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 234–240.
- GARALD C. J., WILKINS D. A., 1981. *Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in Hordeum vulgare L. and Festuca ovina L.* *New Phytol.* 87, 581–593.
- GEEBELEN W., VANGROSSELD J., ADRIANO D. C., VAN POUCKE L. C., CLIJSTERS H., 2002. *Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 115, 377–384.
- GONELLI C., GALARDI F., GABBRIELLI R., 2001. *Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan population of Silene paradoxa*. *Physiol. Plant.* 113, 507–514.
- GONZALES-CHAVES C., HARRIS P. J., DODD J., MEHARG A. A., 2002. *Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on Holcus lanatus*. *New Phytol.* 155, 163–171.
- HABERMANN E., CROWELL K., JANICKI P., 1983. *Lead and other metals can substitute for Ca^{+2} in calmodulin*. *Toxicology* 54, 61–70.
- HAGEMEYER J., 1999. *Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress* [W:] *Heavy metal stress in plants (from molecules to ecosystems)*. PRASAD M. N. V., HAGEMEYER J. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 157–181.
- HERMENS H., HARTOG P. R., BOOKUM W. M., VERKLEIJ J. A. C., 1993. *Increased zinc tolerance in Silene vulgaris (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins*. *Plant Physiol.* 103, 1305–1309.
- HEUMANN H. G., 2002. *Ultrastructural localization of zinc in zin-tolerant Armeria maritima ssp. halleri by autometallography*. *J. Plant Physiol.* 159, 191–203.
- JENTSCHKE G., GOLDBOLD D. L., 2000. *Metal toxicity and ectomycorrhizas*. *Physiol. Plant.* 109, 107–116.
- KARAGIANNIDIS N., NIKOLAU N., 2000. *Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of Vitis vinifera L. (cv. Razaki)*. *Am. J. Enol. Viticul.* 51, 269–275.
- KHAN A. G., 2001. *The relationship between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil*. *Environ. Int.* 26, 417–423.
- KHAN A. G., KUEK C., CHAUDHRY T. M., KHOO C. S., HAYES W. J., 2000. *Role of plants mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation*. *Chemosphere* 41, 197–207.
- KINRAIDE T. B., 1998. *Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities*. *Plant Physiol.* 118, 513–520.
- KNECHT J. A., BAREN N., TEN BOOKUM W. M., WONG FONG SANG H. W., KOEVOEST P. L. M., SCHAT H., VERKLEIJ J. A. C., 1995. *Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium –tolerant Silene vulgaris*. *Plant Sci.* 106, 9–18.
- KÖHLK. I., LÖSCH, 1999. *Experimental characterisation of heavy metal tolerance in plants*. [W:] *Heavy metal stress in plants (from molecules to ecosystems)*. PRASAD M. N. V., PRASAD, HAGEMEYER J. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 371–389.
- KRUPA Z., SIEDLECKA A., SKÓRZYŃSKA-POLIT E., MAKSYMIEC W., 2002. *Heavy metal interactions with plant nutrients*. [W:] *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*. PRASAD M. N. V., STRZAŁKA K. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 287–301.
- LEYVAL C., TURNAU K., HASELWANDTER K., 1997. *Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonisation and function: physiological, ecological and applied aspects*. *Mycorrhiza* 7, 139–153.
- LIU A., HAMEL C., HAMILTON R. I., MA B. L., SMITH D. L., 2000. *Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (Zea mays L.) grown in soil at different P and micronutrients levels*. *Mycorrhiza* 9, 331–336.
- MA J. F., RYAN P. R., DELHAIZE E., 2001. *Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids*. *Trends Plant. Sci.* 6, 273–278.
- MICHALAK E., WIERZBICKA M., 1998a. *Differences in lead tolerance between Allium cepa plants developing from seeds and bulbs*. *Plant and Soil* 199, 251–260.
- MICHALAK E., WIERZBICKA M., 1998b. *Gromadzenie metali ciężkich w organie spichrzowym (cebuli) u Allium cepa*. [W:] *Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych*. GRZESIAK S., SKOCZKOWSKI A., MISZAŁSKI Z. (red.). PAN, Kraków, 261–266.
- MOREL J. L., MENCH M., GUECKERT A., 1986. *Measurement of Pb, Cu, and Cd binding with mucilage exudates from maize (Zea mays L.) roots*. *Biol. Fertil. Soils* 2, 29–34.
- NUEMANN D., ZUR NIEDEN U., LICHTENBERGER O., LEOPOLD I., 1995. *How does Armeria maritima tolerate high heavy metal concentrations?* *J. Plant Physiol.* 146, 704–717.
- PIECHALAK A., TOMASZEWSKA B., BARALKIEWICZ D., MARLECKA A., 2002. *Accumulation and detoxification of lead in legumes*. *Phytochemistry* 60, 153–162.
- POSCHENRIEDER CH., BARCELO J., 1999. *Water relations in heavy metal stressed plants* [W:] *Heavy metal stress in plants (from molecules to ecosystems)*. PRASAD M. N. V., HAGEMEYER J. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 207–229.
- PRASAD M. N. V., HAGEMEYER J. (red.). 1999. *Preface*. [W:] *Heavy metal stress in plants (from molecules to ecosystems)*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1.
- RENGEL Z., 1992. *Role of calcium in aluminium toxicity*. *New Phytol.* 121, 499–513.
- RIVETTA A., NEGRINI N., COCUCI M., 1997. *Involvement of Ca^{+2} calmodulin in Cd^{+2} toxicity during the early phases of radish (Raphanus sativus L.) seed germination*. *Plant Cell Environ.* 20, 600–608.

- SCHAT H., VOOIJS R., 1997. *Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in Silene vulgaris: a cosegregation analysis*. New Phytol. 136, 489–496.
- SCHÜTZENDÜBEL A., POLLE A., 2002. *Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization*. J. Exp. Bot. 53, 1351–1365.
- SEREGIN I. V., PEKNOW V. M., IVANOV V. B., 2002. *Plasmolysis as a tool to reveal lead localization in the apoplast of root cells*. Russ. J. Plant Physiol. 49, 283–285.
- SEREGIN I. V., IVANOV V. B., 2001. *Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants*. Russ. J. Plant Physiol. 48, 523–544.
- SIEDLECKA A., 1995. *Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients*. Acta Soc. Bot. Pol. 64, 365–272.
- SIEDLECKA A., TUKENDORF A., SKÓRZYŃSKA-POLIT E., MAKSYMIEC W., WÓJCIK M., BASZYŃSKI T., KRUPA Z., 2001. *Angiosperms . [W:] Metals in the environment. Analysis by biodiversity*. PRASAD M. N. V. (red.). Marcel Dekker, Inc. New York, Hyderabad, India, 171–217.
- SHIRAIISHI N., WAALKES M. P., 1994. *Enhancement of metallothionein gene expression in male Wistar (WF/NCr) rats by treatment with calmodulin inhibitors: potential role of calcium regulatory pathways in metallothionein induction*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 125, 97–103.
- TURNAU K., JURKIEWICZ A., GRZYBOWSKA B., 2002. *Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych*. Kosmos 51, 185–194.
- URQUHART C., 1971. *Genetics of lead tolerance in Festuca ovina*. Heredity 26, 19–33.
- UTRIAINEN M.A., KÄRENlampi S. O., SCHAT H., 1997. *Differential tolerance to copper and zinc of micropropagated birches tested in hydroponics*. New Phytol. 137, 543–549.
- VAN HOOF N. A. L. M., HASSINEN V., HAKVOORT H., BALLINTJN K., SCHAT H., VERKLEIJ J., ERNST W., KÄRENlampi S., TERVAHauta A., 2001. *Enhanced copper tolerance in Silene vulgaris (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene*. Plant Physiol. 126, 1519–1526.
- VAN STEVENNIK R. M. F., VAN STEVENNICK M. E., FERNANDO D. R., 1990. *Zinc tolerance and the binding of zinc as zinc phytate in Lemna minor, X-ray microanalytical evidence*. J. Plant Physiol. 137, 140–146.
- VÖGELLI-LANGE R., WAGNER G. J., 1990. *Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves*. Plant Physiol. 92, 1086–1093.
- WENZEL W., JOCKWER F., 1999. *Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps*. Environ. Pollut. 104, 145–155.
- WIERZBICKA M., 1987. *Lead accumulation and its translocation barriers in roots of Allium cepa L. autoradiographic and ultrastructural studies*. Plant. Cell Environ. 10, 17–26.
- WIERZBICKA M., 1998. *Lead in apoplast of Allium cepa L. root tips – ultrastructural studies*. Plant Sci. 133, 105–119.
- WIERZBICKA M., 1999. *Comparison of lead tolerance in Allium cepa with other plant species*. Environ. Pollut. 104, 41–52.
- WIERZBICKA M., 2001. *Skażenie talem w południowej Polsce. [W:] Obieg pierwiastków w przyrodzie. Monografia. Tom I. GWOREK B. MOCKA A. (red.). Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa, 123–129.*
- WIERZBICKA M., 2002. *Przystosowania roślin do wzrostu na hałdach cynkowo-ołowianych okolic Olkusa*. Kosmos 51, 139–150.
- WIERZBICKA M., BARANOWSKA A., 1996. *Under low relative air humidity Allium cepa L. plants are stronger contaminated with lead*. Biol. Bull. Poznań 33, 66–67.
- WIERZBICKA M., OBIDZIŃSKA J., 1998. *The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species*. Plant Sci. 137, 155–174.
- WIERZBICKA M., PANUFNIK D., 1998. *The adaptation of Silene vulgaris to growth on a calamine waste heap (S. Poland)*. Environ. Pollut. 101, 415–426.
- WIERZBICKA M., POTOCKA A., 2002. *Tolerance to lead of plants growing on dry or moist soils*. Acta Biol. Crac. Ser. Bot., 44, 21–28.
- WIERZBICKA M., ZYSKA A., 1999. *Zinc tolerance of Silene vulgaris populations from a calamine waste heap near Olkusz, Poland. [W:] Trace elements – effects on organisms and environment*. Uniwersytet Śląski, Katowice, 215–219.
- WILLIAMS L. E., PITTMAN J. K., HALL J. K., 2000. *Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants*. Biochem. Biophys. Acta 1465, 104–126.
- WO NY A. (red.), 1995. *Ołów w komórkach roślinnych – pobieranie, reakcje, odporność*. Wydawnictwo Sorus, Poznań.
- WÓJCIK M., 2000. *Fitoremediacja – sposób oczyszczania środowiska*. Kosmos 49, 135–147.
- WU L., ANTONOVICS J., 1976. *Experimental ecological genetics in Plantago II. Lead tolerance in Plantago lanceolata and Cynodon dactylon from roadside*. Ecology 57, 205–208.
- ZAŁĘCKA R., WIERZBICKA M., 2002. *The adaptation of Dianthus carthusianorum L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in Southern Poland*. Plant Soil 246, 249–257.