

AGNIESZKA ABRATOWSKA

*Zakład Ekotoksykologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: agnieszkaslysz@biol.uw.edu.pl*

ARMERIA MARITIMA – GATUNEK ROŚLIN PRZYSTOSOWANY DO WZROSTU NA GLEBACH SKAŻONYCH METALAMI CIĘŻKIMI

W obliczu problemu zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi poszukujemy skutecznych metod oczyszczania gleb i zapobiegania rozprzestrzenianiu się zanieczyszczeń w ekosystemach. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem badaczy cieszą się rośliny szczególnie odporne na wysokie stężenia metali ciężkich w glebie. Rośliny takie mogą być użyteczne w procesie oczyszczania gleb metodą biologiczną (tzw. fitoremediacji) (WÓJCIK 2000). Część badań stanowią prace z zakresu inżynierii genetycznej, prowadzące do skonstruowania roślin o jak najlepszych cechach do celów fitoremediacji, natomiast

wiele prac opiera się na wykorzystaniu naturalnych metalofitów (roślin metalolubnych), które na drodze spontanicznej sukcesji zasiedlają tereny zanieczyszczone. Jednym z najciekawszych gatunków metalolubnych, występujących we florze terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi, jest *Armeria maritima*. Sposoby obrony przed toksycznym wpływem metali ciężkich w roślinach *Armeria maritima* – na różnych poziomach organizacji – są na tyle skuteczne, że rośliny te mogą żyć w środowiskach bardzo silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

CHARAKTERYSTYKA GATUNKU *ARMERIA MARITIMA*

Armeria maritima (Mill.) Willd., czyli zawciąg pospolity lub zawciąg nadmorski, jest wieloletnią rośliną zielną z rodziny *Plumbaginaceae* L. (TUTIN i współaut. 1972). Rośliny tego gatunku charakteryzują się wąskimi liśćmi ułożonymi w rozetę oraz wydłużonymi pędami kwiatostanowymi, na których pojedynczo wyrastają główkowate kwiatostany, złożone z pięciokrotnych kwiatów różowej barwy (Ryc. 1, 2) (PAWŁOWSKI 1963, RUTKOWSKI 1998). Gatunek *Armeria maritima* jest rozpowszechniony w Europie Zachodniej i Centralnej, na obszarze prawie całego Niżu

Europejskiego (TUTIN i współaut. 1972). Gatunek ten zajmuje terytorium prawie całej Polski, z wyjątkiem części południowej (ZAJĄC i ZAJĄC 2001). *Armeria maritima* jest gatunkiem bardzo zmiennym; w zależności od warunków siedliskowych rośliny tego gatunku mogą różnić się znacznie cechami morfologicznymi (SZAFER 1946, PAWŁOWSKI 1963, LEFEBVRE 1974). Przedstawiciele gatunku *Armeria maritima* występują w zbiorowiskach roślinnych zajmujących specyficzne podłoża, takie jak gleby o podwyższonej zawartości metali ciężkich lub NaCl (TUTIN i współaut. 1972).



Fig. 1. Pokrój ogólny rośliny gatunku *Armeria maritima* (roślina wyhodowana w szklarni) (Fot. A. Abratowska).

Fig. 2. Kwiatostan *Armeria maritima* (Fot. A. Abratowska).

Fig. 3. Widok hałd cynkowo-olowiowych w Bolesławiu koło Olkusza (Fot. M. Wierzbicka).

Fig. 4. Bogate zbiorowisko roślinne na 130-letniej hałdzie w Bolesławiu, z dominacją roślin *Armeria maritima* (Fot. A. Abratowska).

Fig. 5. Rośliny *Armeria maritima* na hałdzie w Bolesławiu (Fot. A. Abratowska).

Fig. 6. Huta metali nieżelaznych w Bukownie koło Olkusza. W najbliższym otoczeniu huty dominują rośliny *Armeria maritima* (Fot. M. Wierzbicka).

Fig. 7. Roślina *Armeria maritima* w pobliżu huty metali nieżelaznych w Bukownie koło Olkusza (Fot. A. Baranowska-Morek).

W Polsce wyróżniono trzy podgatunki, różniące się pewnymi cechami morfologicznymi oraz zajmujące różne siedliska (MIREK i współaut. 2002). Podgatunek *A. maritima* subsp. *elongata* jest najbardziej pospolity i rozpowszechniony na terytorium prawie całej Polski. Zajmuje siedliska suche, piaszczyste i ubogie w materię organiczną, najczęściej jest spotykany na łąkach, murawach, w terenie otwartym lub na obrzeżach lasów (PAWŁOWSKI 1963, TUTIN i współaut. 1972). Podgatunek *A. maritima* subsp. *halleri* jest zaliczany do metalofitów i występuje on na podłożach o podwyższonej zawartości metali ciężkich (PAWŁOWSKI 1963, TUTIN i współaut. 1972, SZAFER i współaut. 1986). Podgatunek *Armeria maritima* subsp. *halleri* występuje endemicznie na glebach o podwyższonym poziomie metali ciężkich (DOBRZAŃSKA 1955, SZAFER i ZARZYCKI 1972, RUTKOWSKI 1998). W Polsce jedynym rejonem występowania tego podgatunku są hałdy cynkowo-ołowiowe w okolicach Olkusza. Trzecim podgatunkiem wyróżnionym w Polsce jest *Armeria maritima* subsp. *maritima*, który występuje wyłącznie na podłożach zasolonych NaCl i może być spotykany na wybrzeżu Bałtyku (RUTKOWSKI 1998). Rośliny tego podgatunku są zaliczane do halofitów (roślin słonolubnych).

Duże zróżnicowanie w obrębie gatunku i występowanie form edaficznych (tzn. o cechach uwarunkowanych wpływem siedliska) powoduje często trudności w oznaczaniu podgatunków gatunku *Armeria maritima* (WIERZBICKA i SŁYSZ 2005). LEFEBVRE (1974) opisał szczegółowo występowanie poszczególnych podgatunków na terenie Europy i wyjaśniał stopień pokrewieństwa pomiędzy nimi. Podgatunek *A. maritima* subsp. *halleri* jest prawdopodobnie ewolucyjnie młodszy od pozostałych podgatunków, zaś analiza wykazała, że jego pochodzenie jest polifiletyczne (LEFEBVRE 1974). W zależności od położenia geograficznego populacje na różnych hałdach wykazują dość duże zróżnicowanie i pokrewieństwo bliższe bądź z podgatunkiem *maritima*, bądź – jak w Polsce – z podgatunkiem *elongata* (LEFEBVRE 1974).

W niniejszej pracy szczególną uwagę poświęcono roślinom *Armeria maritima* występującym na hałdach cynkowo-ołowiowych w Polsce. Hałdy w okolicach Olkusza zostały dosyć dawno zbadane pod kątem warunków siedliskowych, zawartości metali ciężkich i składu gatunkowego tamtejszej flory (DOBRZAŃSKA 1955). Warunki panujące na hałdach są skrajnie niekorzystne dla wegeta-

cji roślin. Są to siedliska charakteryzujące się niestabilnym, silnie przepuszczalnym podłożem o charakterze szkieletowym, składającym się głównie z odłamków skał płonnych pozostałych po eksploatacji rud metali oraz z odpadów z przetwórstwa tych rud. Nie ma wykształconego profilu glebowego, może zaś występować cienka warstwa darni składającej się ze słabo rozłożonych szczątków organicznych. Są to głównie tereny otwarte, niekiedy o dużym nachyleniu i ekspozycji zboczy. W związku z tym panuje silne nasłonecznienie, spływ powierzchniowy i przez większą część roku wieją silne wiatry (DOBRZAŃSKA 1955, GRODZIŃSKA i SZAREK-ŁUKASZEWSKA 2002). Te czynniki powodują suszę i niedobór składników mineralnych. Stężenia metali są bardzo wysokie: 50 000 mg/kg Fe, 40000–80000 mg/kg Zn, 1650–3000 mg/kg Pb, 170–200 mg/kg Cd, 36 mg/kg Ni i 43 mg/kg Tl gleby (GODZIK 1984, SZAREK-ŁUKASZEWSKA i NIKLIŃSKA 2002, WIERZBICKA i współaut. 2004), zaś odczyn podłoża jest lekko alkaliczny (pH = 7,3). Formy metali ciężkich dostępne dla roślin stanowią od kilku do dwudziestu kilku procent całkowitych zawartości metali (GODZIK 1984, GRODZIŃSKA i SZAREK-ŁUKASZEWSKA 2002). Widok ogólny hałd w Bolesławiu koło Olkusza przedstawia Ryc. 3. Wyrobisko widoczne za zdjęciem jest wypełniane toksycznymi odpadami poflotacyjnymi (z przeróbki rud metali) pochodzącymi z huty metali oddalonej o kilkanaście kilometrów. Hałdy otaczające wyrobisko są różnowiekowe (GRODZIŃSKA i SZAREK-ŁUKASZEWSKA 2002). Część z nich jest poddawana rekultywacji, natomiast najstarsze hałdy były pozostawione bez żadnych zabiegów i stały się areną naturalnej spontanicznej sukcesji. W wyniku procesów sukcesyjnych na tego typu podłożach wykształcają się tzw. zbiorowiska galmanowe, w których znajdują się liczne gatunki metalo-tolerancyjne i metalolubne (GRODZIŃSKA i SZAREK-ŁUKASZEWSKA 2002, WIERZBICKA i ROSTAŃSKI 2002). Na hałdzie w Bolesławiu koło Olkusza, liczącej około 130 lat, występują gatunki roślin o cechach odmiennych w porównaniu z cechami roślin tego samego gatunku, występujących na terenach nieskażonych metalami ciężkimi (WIERZBICKA i PANUFNIK 1998, WIERZBICKA 2002, WIERZBICKA i PIELICHOWSKA 2004). *Armeria maritima* jest jednym z dominujących gatunków na hałdzie w Bolesławiu (Ryc. 4, 5), a także w zbiorowisku na terenie otaczającym hutę „Bolesław” w Bukownie (Ryc. 6, 7). Jest oczywistym, że aby rośliny te mogły w terenie skażonym rosnąć i rozmnażać się,

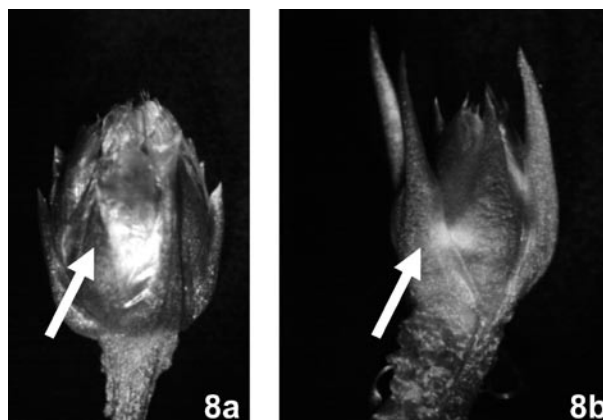
muszą u nich istnieć sprawne mechanizmy chroniące przed szkodliwym wpływem metali ciężkich.

RANGA TAKSONOMICZNA ROŚLIN *ARMERIA MARITIMA* WYSTĘPUJĄCYCH NA HAŁDACH CYNKOWO-OŁOWIOWYCH W REJONIE OLKUSZA

Na hałdach galmanowych (cynkowo-ołowiowych) w okolicach Olkusza występuje specyficzna roślinność przywiązana do tego typu gleb. Wśród gatunków charakterystycznych flory galmanowej wymienia się metalolubny podgatunek *Armeria maritima* subsp. *halleri* (DOBZANSKA 1955, SZAFER i ZARZYCKI 1972, RUTKOWSKI 1998). Jednak pojawiło się pytanie o przynależność taksonomiczną populacji roślin *Armeria maritima* porastających hałdy w okolicach Olkusza. Wątpliwości były spowodowane znacznymi różnicami w wyglądzie rosnących tam roślin, ponieważ część populacji *Armeria maritima* charakteryzowała się cechami morfologicznymi zbliżonymi bardziej do pospolitego podgatunku *elongata*, niż do podgatunku *halleri*.

Z obu grup różniących się cechami morfologicznymi na hałdzie zebraliśmy nasiona, porównaliśmy wygląd roślin potomnych wyhodowanych w identycznych warunkach szklarniowych i stwierdziliśmy brak różnic morfologicznych pomiędzy obiema grupami. Na tej podstawie stwierdziliśmy, że hałdę cynkowo-ołowiową w Bolesławiu porasta jednorodna pod względem cech morfologicznych populacja, natomiast lokalne różnice warunków siedliskowych na hałdzie powodują, że część populacji stanowią rośliny karłowate (WIERZBICKA i SŁYSZ 2005).

Natomiast rośliny pochodzące z hałdy i z terenu niezanieczyszczonego metalami ciężkimi różniły się cechami morfologicznymi. Rośliny z hałdy były mniejsze, ich pędy kwiatostanowe były krótsze, zaś okrywy pąków kwiatostanowych krótsze, w porównaniu z roślinami z terenu niezanieczyszczonego (Ryc. 8) (WIERZBICKA i SŁYSZ 2005). Cechy te były genetycznie utrwalone, jednak były one dużo mniejsze, niż sugerowały to dane litera-



Ryc. 8. Jedną z cech pomocnych w odróżnieniu roślin *A. maritima* z terenów skażonych metalami ciężkimi od roślin pochodzących z terenów nie skażonych jest długość okryw pąka kwiatostanu (zaznaczone strzałką). W populacji pochodzącej z hałd (8a) przeważają pąki o okrywach nie dłuższych niż pąk, zaś w populacjach z terenów nie skażonych (8b) obserwujemy głównie okrywy znacznie dłuższe od pąka.

turów (klucze do oznaczania roślin). Biorąc pod uwagę dużą zmienność siedliskową gatunku *Armeria maritima* oraz różnice między danymi literaturowymi i wynikami pomiarów przeprowadzonych podczas hodowli roślin, stwierdziliśmy, że ranga podgatunku może być zbyt wysoka dla roślin porastających hałdę galmanową (WIERZBICKA i SŁYSZ 2005). Na podstawie powyższych rozważań, wydaje się odpowiednie określenie populacji występującej na hałdach w Polsce mianem galmanowego ekotypu gatunku *Armeria maritima*. Natomiast dla rozróżnienia populacji w terenie użyteczna jest obserwacja głównie takich cech, jak wysokość pędów kwiatostanowych (niższe w populacji hałdowej) i stosunek długości zewnętrznych okryw kwiatostanowych w pąku do długości pąka (okrywy krótsze niż pąk w populacji hałdowej). Problem ten będzie w przyszłości jeszcze dokładniej przebadany i rozstrzygnięty na podstawie badań molekularnych, które obecnie są prowadzone w naszym laboratorium.

ODPORNOŚĆ ROŚLIN NA METALE CIĘŻKIE

W tym rozdziale zostaną omówione mechanizmy odporności roślin na metale ciężkie. Należy zaznaczyć, że pewien poziom odporności występuje u wszystkich gatunków roślin. Jest to tzw. odporność konstytucjonal-

na, występująca u roślin, u których podczas wzrostu nie nastąpił kontakt z metalami ciężkimi (ANTOSIEWICZ 1992). Natomiast pewne gatunki mają bardzo dobrze rozwinięte mechanizmy odporności, co może być efektem

selekcji odpornych ekotypów, zachodzącej w środowisku zanieczyszczonym. W tym przypadku mówi się o odporności indukowanej. Taki proces selekcji może przez wiele lat przebiegać w środowisku skażonym metalami ciężkimi, np. na terenie górnictwa rud metali ciężkich. W rezultacie na terenach o podwyższonym poziomie metali ciężkich spotyka się charakterystyczne zbiorowiska roślinne, do których należą zarówno odporne gatunki roślin, jak i podgatunki lub ekotypy gatunków roślin występujących powszechnie w środowiskach nieskażonych, jednak wykazujące wyższą tolerancję na metale ciężkie (BAKER 1987, WIERZBICKA i ROSTAŃSKI 2002). Przegląd informacji dotyczących mechanizmów tolerancji można znaleźć w licznych opracowaniach z tego zakresu, m. in.: BAKER 1987, ANTOSIEWICZ 1992, ERNST 1998, CLEMENS i współaut. 2002, BARANOWSKA-MOREK 2003. Na potrzeby niniejszej pracy zaproponowano umowny i modelowy podział mechanizmów tolerancji. W rzeczywistości procesy te są ze sobą powiązane i nie można wytyczyć między nimi wyraźnych granic. Procesy te wpływają na siebie wzajemnie i są ściśle powiązane z całym metabolizmem komórek roślinnych.

Mechanizmy odporności roślin na metale ciężkie można podzielić na dwie główne grupy. Pierwszą z nich są mechanizmy unikania metali ciężkich, drugą są mechanizmy tolerancji metali ciężkich (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). Główna różnica między tymi dwoma typami procesów odporności jest taka, że celem wszystkich mechanizmów unikania jest zapobieganie wnিকnięciu metali do wnętrza komórki, natomiast mechanizmy tolerancji stanowią odpowiedź na obecność metalu we wnętrzu komórki.

Wśród mechanizmów unikania metali ciężkich wyszczególniono wykluczanie, eliminację, redystrybucję i kompartmentację. Jest to podział podobny do tego, jaki opisuje mechanizmy odporności na zasolenie gleby (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). Na strategię wykluczania składają się wszystkie procesy, których celem jest zapobieganie pobieraniu metali ciężkich przez roślinę. Zalicza się tu wydzielanie do ryzosfery związków chelatujących jony metali, co czyni je niedostępnymi dla rośliny (CLEMENS i współaut. 2002, BARANOWSKA-MOREK 2003) oraz zapobieganie rozprzestrzenianiu się metali w roślinie, dzięki barierom istniejącym na drogach transportu metali w korzeniach i pędach (WIERZBICKA 1995, BARANOWSKA-MOREK 2003, BARANOWSKA-MOREK i WIERZBICKA

2004). Eliminacja obejmuje procesy, które działają wówczas, gdy metale ciężkie dostały się do tkanek rośliny, a prowadzą do wyrzucenia metali z rośliny do środowiska zewnętrznego. Do tych mechanizmów należy wydalanie metali w organizmie przez jego powierzchnię, wydzielanie metali przez gruczoły i włoski wydzielnicze, oraz zrzucanie całych organów zawierających metale ciężkie (ERNST 1998, CLEMENS i współaut. 2002). Procesy redystrybucji mają zaś na celu ograniczenie obecności metali ciężkich i ich przetransportowanie do miejsc, w których toksyczny wpływ na organizm jest mniej ryzykowny, np. w starzejących się liściach (ERNST 1998). Ostatnią grupą mechanizmów unikania są procesy rozpatrywane na poziomie komórkowym. Jest to kompartmentacja metali ciężkich, czyli ich gromadzenie w miejscach, gdzie nie stanowią zagrożenia dla komórek roślinnych: w ścianach komórkowych i przestworach międzykomórkowych oraz w wakuolach (WIERZBICKA 1995, 1998).

Mechanizmy tolerancji działają w momencie znalezienia się jonów metali ciężkich we wnętrzu komórki – w cytoplazmie, gdzie ich wpływ jest najbardziej niebezpieczny (KOPCEWICZ i LEWAK 2002). Podstawę mechanizmów tolerancji stanowi ochronne działanie metabolitów stresowych, syntetyzowanych w odpowiedzi na wzrost stężenia metalu w cytoplazmie (np. prolina, wiele cukrów) lub działanie polipeptydów i tzw. białek stresowych (syntetyzowanych w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, w tym metale ciężkie), wśród których należy wymienić przekaźniki sygnałów, białka strukturalne, enzymy, chelatory metali, np. glutation i jego pochodne – fitochelatyny, a także osmotyny, HSP (białka szoku cieplnego) i białka RAB. Poziom wymienionych białek wzrasta w cytoplazmie w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów metali ciężkich (KOPCEWICZ i LEWAK 2002).

Do dalszych rozważań nad mechanizmami odporności na metale ciężkie może być też pomocna klasyfikacja procesów, działających na poziomie komórkowym. Należą do nich głównie: wiązanie metali w ścianach komórkowych, w czym biorą udział głównie pektyny, chelatowanie jonów metali w cytoplazmie przez białka i polipeptydy – glutation i jego pochodne oraz białka indukowane stresem, transport utworzonych kompleksów do wakuoli, gdzie metale po dysocjacji takich kompleksów mogą być magazynowane przy udziale kwasów organicznych lub związków

polihydroksyfenolowych, czy wreszcie usuwanie metali poza komórkę w wyniku aktywnego transportu (WIERZBICKA 1995, 1998;

KOPCEWICZ i LEWAK 2002; BARANOWSKA-MOREK 2003).

MECHANIZMY ODPORNOŚCI DZIAŁAJĄCE U ROŚLIN *ARMERIA MARITIMA*

Rośliny *Armeria maritima* były badane pod kątem działania mechanizmów odporności, warunkujących wzrost na glebach silnie skażonych metalami ciężkimi. Badania wykonywano na roślinach porastających gleby zanieczyszczone, w rejonach górnictwa i hutnictwa rud metali – cynku, ołowiu i miedzi, a także na roślinach poddanych działaniu metali ciężkich w warunkach eksperymentalnych. Rozpatrywano mechanizmy na poziomie całego organizmu, na poziomie tkankowym i komórkowym.

WYKLUCZANIE I REDYSTRYBUCJA METALI CIĘŻKICH NA POZIOMIE ORGANIZMU

U roślin *Armeria maritima* wykazano mechanizm wykluczania i redystrybucji metali ciężkich (Zn, Cd, Pb, Cu). Zbadano zawartość metali ciężkich w organach dwóch gatunków roślin, porastających teren skażony w wyniku działalności huty metali nieżelaznych w północnej Francji. Porównano rozmieszczenie metali ciężkich w roślinach *Armeria maritima* subsp. *halleri* oraz w roślinach zdolnych do hiperakumulacji metali ciężkich – *Cardaminopsis halleri* (DAHMANI-MÜLLER i współaut. 2000). Hiperakumulacja jest zjawiskiem, które występuje u najbardziej odpornych roślin metalolubnych i polega na gromadzeniu metali ciężkich stężeniach tkankach pędów, w następujących stężeniach: >10 000 mg Zn lub Mn, >1000 mg Ni, Cu, Cr, Co lub Pb, >100 mg Cd, > 1 mg Au na kg suchej masy pędu. W cytowanych badaniach wykazano, że w roślinach *Armeria maritima* przeważająca część pobranych metali ciężkich – zwłaszcza ołowiu i miedzi – była gromadzona w korzeniach (DAHMANI-MÜLLER i współaut. 2000). Natomiast u roślin gatunku *Cardaminopsis halleri* następowało silne gromadzenie metali ciężkich w pędach i liściach. Porównując rozmieszczenie metali ciężkich w liściach *Armeria maritima*, autorzy stwierdzili znacznie wyższe stężenie wszystkich badanych metali w liściach suchych w porównaniu do liści zielonych (DAHMANI-MÜLLER i współaut. 2000). Uzyskane wyniki znalazły potwierdzenie w naszych badaniach: w roślinach zebranych na terenie hałdy pogórnicy w Bolesławiu koło Olkusza

wykazałyśmy najsilniejsze gromadzenie cynku, ołowiu i kadmu w korzeniach i suchych liściach. Stwierdziłyśmy także, że rośliny po eksperymentalnej hodowli w pożywkach mineralnych charakteryzowały się podobnym rozmieszczeniem metali jak rośliny pobierających te metale w warunkach terenowych (SZAREK-ŁUKASZEWSKA i współaut. 2004).

Podsumowując, wykazano, że u roślin *Armeria maritima* następuje zatrzymywanie metali ciężkich w korzeniach, zaś w części nadziemnej redystrybucja metali do liści starzejących się, które następnie mogą być odrzucone z rośliny. Należy zauważyć, że w konsekwencji górna warstwa profilu glebowego w miejscach występowania *Armeria maritima* będzie wzbogacana w metale, przez rozkład zrzuconych suchych liści, silnie skażonych metalami ciężkimi.

LOKALIZACJA CYNKU W TKANKACH I KOMÓRKACH ROŚLIN *ARMERIA MARITIMA*

O mechanizmach odporności istniejących w roślinach można wnioskować na podstawie rozmieszczenia metali ciężkich, prowadząc obserwacje mikroskopowe na poziomie tkankowym i komórkowym. Jedną z najlepszych metod do realizacji tego celu jest transmisyjna mikroskopia elektronowa. Jednak preparatyka stosowana w mikroskopii elektronowej powoduje, że metale ciężkie obecne w tkankach są wypłukiwane lub przemieszczane, co może być źródłem błędnych interpretacji. Wykazano, że przy zastosowaniu klasycznej techniki utrwalania tkanek do obserwacji w transmisyjnym mikroskopie elektronowym możliwe jest badanie wyłącznie ołowiu (ANTOSIEWICZ i WIERZBICKA 1999). Ołów jest silnie wiązany w komórkach i pozostaje w miejscach pierwotnej lokalizacji, pomimo długotrwałego przepłukiwania tkanek różnymi odczynnikami. Inne metale są w dużym stopniu wypłukiwane podczas preparatyki. Dlatego podczas przygotowania tkanek do badań stosuje się technikę mrożenia tkanek lub techniki cytochemiczne. Przykładem takiego postępowania jest cytochemiczna technika autometalografii. Po zastosowaniu autometalografii, podczas badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, zlokalizowano

cynk w roślinach *Armeria maritima* subsp. *halleri* rosnących na terenie skażonym metalami ciężkimi (HEUMANN 2002).

Autometalografia jest techniką pozwalającą na zatrzymanie metali ciężkich w miejscach ich pierwotnej lokalizacji przez strącenie metali z siarczkiem dodawanym na początkowym etapie preparatyki. Następnie siarczki metali są „uwidaczniane” przez wiązanie się do nich jonów srebra pochodzących z soli srebra, dodawanych równocześnie z odczynnikami redukującymi jony srebra do postaci metalicznej. Powstałe złogi metalicznego srebra mogą być obserwowane w mikroskopie elektronowym, wskazując miejsca lokalizacji metali ciężkich. Za pomocą autometalografii zlokalizowano rozmieszczenie cynku w komórkach korzeni i liści roślin *Armeria maritima*. Był to pierwszy przypadek zastosowania techniki autometalografii do badania materiału roślinnego (HEUMANN 2002). Obecność cynku w komórkach wykazano za pomocą metod EDX i ESI. Metoda EDX umożliwia analizę składu pierwiastkowego na podstawie energii promieniowania rentgenowskiego poszczególnych pierwiastków w preparacie. Metoda ESI pozwala na uwidocznienie konkretnego poszukiwanego pierwiastka dzięki jego specyficznej energii rozproszenia nieelastycznych elektronów. W miejscach nagromadzenia elektronowo gęstych złogów udowodniono obecność cynku, srebra i siarki.

Zastosowaną metodą wykazano nagromadzenie cynku w zewnętrznych warstwach korzenia – w ryzodermie i w komórkach kory, przy czym cynk był obecny głównie w ścianach komórkowych i w wakuolach. Wiadomo, że w tych warstwach następuje transport metali ciężkich drogą apoplastyczną, aż do momentu osiągnięcia najbardziej wewnętrznej warstwy kory – endodermy. Endoderma jest pojedynczą warstwą komórek, z których każda jest otoczona suberynowym zgrubieniem, tzw. pasemkiem Caspary’ego, zatrzymującym radialny transport apoplastyczny (SZWEYKOWSKA i SZWEYKOWSKI 2004). Przez tę strefę substancje przenikają wyłącznie po wnikięciu do symplasty komórek endodermy. Ta suberynowa „granica” stanowi poważną barierę w transporcie metali ciężkich w głąb korzenia i zapobiega w ten sposób ich przemieszczaniu do nadziemnych części rośliny (BARANOWSKA-MOREK 2003). Wykazano, że cynk był zatrzymywany w endodermie korzenia *Armeria maritima*, co ograniczało transport do części nadziemnych. Natomiast

w liściach stwierdzano gromadzenie cynku w ścianach komórkowych wiązek przewodzących, w ścianach komórkowych i wakuolach komórek mezofilu, oraz szczególnie duże nagromadzenie w sąsiedztwie komórek wydzielniczych i wewnątrz tych komórek. Komórki wydzielnicze, wraz z komórkami towarzyszącymi i komórkami podstawy budują wielokomórkowe gruczoły wydzielnicze – gruczoły solne, występujące w epidermie górnej i dolnej liści *Armeria maritima*. Wykazano w ten sposób, że gruczoły solne epidermy liści uczestniczą w wydzielaniu cynku z roślin (HEUMANN 2002).

Podsumowując, w cytowanej pracy wykazano następujące mechanizmy wykluczania cynku: kompartmentację komórkową, barierę dla transportu w endodermie oraz wydzielanie na powierzchnię liści przez komórki wydzielnicze gruczołów solnych epidermy.

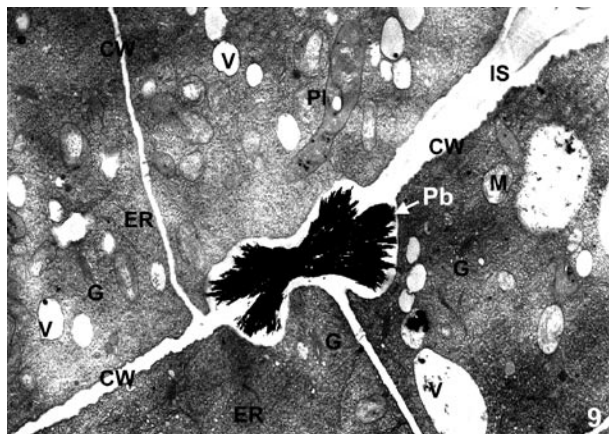
MECHANIZMY ODPORNOŚCI ROŚLIN *ARMERIA MARITIMA* NA MIEDŹ

U roślin *Armeria maritima* subsp. *halleri*, zebranych w Niemczech w rejonie dawnej kopalni miedzi, wykazano kompleksową odporność na ten metal (NEUMANN i współaut. 1995). W korzeniach i liściach *Armeria maritima* stwierdzono występowanie skupisk idioplastów, o wakuolach wypełnionych związkami fenolowymi, np. garbnikami. Udowodniono, że w wakuolach tych komórek zgromadzona była miedź. Jony miedzi były chelatowane przez grupy hydroksylowe cząsteczek związków fenolowych. Jednocześnie wykazano obecność niskocząsteczkowego białka stresowego HSP 17 w cytoplazmie komórek. Białko HSP 17 należy do białek szoku cieplnego, (ang. heat shock protein), zaangażowanych również w tolerancję metali ciężkich. Również w tej pracy wykazano udział gruczołów solnych w wydzielaniu miedzi z roślin. W kryształach na liściach wykazano obecność m. in. miedzi, cynku i żelaza (NEUMANN i współaut. 1995).

Podsumowując, udowodniono takie mechanizmy unikania i tolerancji miedzi, jak chelatowanie miedzi przez związki fenolowe w wakuolach komórek garbnikowych, wydzielanie miedzi z roślin przez komórki wydzielnicze gruczołów solnych epidermy oraz obecność w cytoplazmie białka stresowego.

LOKALIZACJA OŁOWIU W KORZENIACH *ARMERIA MARITIMA*

Lokalizacja metali ciężkich w roślinach *Armeria maritima* jest zagadnieniem aktu-



Ryc. 9. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego – warstwa kory w strefie wydłużania korzenia siewki *Armeria maritima*.

Rośliny były hodowane w pożywce mineralnej z dodatkiem 2,5 mg/l Pb^{2+} . Widoczne fragmenty czterech sąsiadujących komórek z ołowiem (Pb) w ścianie komórkowej, natomiast ołowiu brak wewnątrz komórek, w cytoplazmie i w sąsiedztwie organelli. Pow. 8000 x. Symbole: Pb – złóg ołowiu, CW – ściana komórkowa, IS – przestwór międzykomórkowy, V – wakuola, ER – retikulum endoplazmatyczne, Pl – proplastyd, M – mitochondrium, G – aparat Golgi'ego.

alnie realizowanym w Zakładzie Ekotoksikologii UW. Prace są prowadzone zarówno na roślinach zebranych bezpośrednio na hałdach cynkowo-ołowiowych w okolicach Olkusza, jak i na roślinach wyhodowanych w kontrolowanych warunkach, z nasion zebranych na hałdach. Badania te mają na celu poznanie mechanizmów odporności roślin *Armeria maritima*, pozwalających na wzrost w warunkach silnego skażenia metalami ciężkimi.

W celu lokalizacji ołowiu stosujemy klasyczną technikę utrwalania do obserwacji w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, która daje bardzo dobre rezultaty w badaniach tkanek roślinnych (WIERZBICKA 1987a, 1987b; ANTOSIEWICZ i WIERZBICKA 1999). W korzeniach siewek *Armeria maritima*, hodowanych z dodatkiem $PbCl_2$ stwierdzono wiązanie ołowiu w duże agregaty w ścianach komórkowych (Ryc. 9). Takie złogi ołowiu obserwowano w zróżnicowanej części korzeni. Podobne struktury zawierające ołów obserwowano wcześniej w korzeniach siewek innego badanego przez nas gatunku, występującego na hałdach cynkowo-ołowiowych – *Dianthus carthusianorum*, goździka kartuzka (BARANOWSKA-MOREK i WIERZBICKA

2004). Magazynowanie w ścianach komórek kory korzenia jest sposobem unieszkodliwienia ołowiu: zapobiega wnikaniu ołowiu do symplasty komórek korzenia. Komórki widoczne na zdjęciu 9 nie zawierają ołowiu wewnątrz. Związanie w ścianach komórkowych tkanek korzenia powstrzymuje równocześnie transport ołowiu do pędu (WIERZBICKA 1995).

ROLA WYTWORÓW EPIDERMY W ODPORNOŚCI ROŚLIN *ARMERIA MARITIMA* NA METALE CIĘŻKIE

Wykazywano wcześniej, że w procesach detoksyfikacji metali ciężkich u roślin ważną rolę pełni epiderma i różne typy włosków. W epidermie liści roślin gatunku *Armeria maritima* występują jednokomórkowe włoski zwykłe i wielokomórkowe włoski gruczołowe – gruczoły solne. Jest to cecha gatunkowa *Armeria maritima* i obserwujemy ją w populacjach pochodzących z różnych siedlisk. Wykazano, że te wytwory epidermy biorą udział w odpowiedzi roślin na metale ciężkie: miedź (NEUMANN i współaut. 1995) oraz ołów, kadm i cynk (SŁYSZ i WIERZBICKA 2005).

Po hodowli hydroponicznej roślin w pożywce mineralnej z dodatkiem cynku, ołowiu i kadmu, badano rozmieszczenie tych metali w liściach. Stwierdzono, że we włoskach zwykłych liści oraz w komórkach gruczołów solnych było znacznie więcej metali ciężkich, w porównaniu z innymi komórkami liści. Metodą EDX, połączoną ze skaningową mikroskopią elektronową, zbadano skład substancji wydzielanej przez gruczoły solne. Tymi niezależnymi metodami udowodniono obecność na powierzchni liści metali ciężkich, wydzielonych przez gruczoły solne (SŁYSZ i WIERZBICKA 2005). Podsumowując, u roślin *Armeria maritima* udowodniono redystrybucję metali ciężkich do włosków zwykłych oraz ich wydzielanie przez gruczoły solne.

Żywe komórki włosków mogą gromadzić metale ciężkie dzięki obecności czynników chelatujących w cytoplazmie (GUTIÉRREZ-ALCALÁ i współaut. 2002) oraz dzięki kompartmentacji metali w ścianach komórkowych i wakuolach. Transport metali ciężkich do włosków zwykłych epidermy był dotychczas badany u roślin zdolnych do gromadzenia dużych ilości metali ciężkich w liściach, czyli u hiperakumulatorów (SALT i współaut. 1995, KÜPPER i współaut. 1999). Możliwe, że zdolność pewnych gatunków roślin do gromadzenia metali ciężkich w liściach jest pod-

wyższa dzięki transportowi metali ciężkich do włosków epidermy. Wydzielanie metali ciężkich przez włoski gruczołowe było również udowodnione u innych gatunków roślin (CHOI i współaut. 2001; LAVID i współaut. 2001a, b). Możliwe jest, że u gatunku *Armeria maritima*, który jest halofitem zdolnym do wzrostu w środowisku zasolonym, proces detoksyfikacji przez gruczoły solne zachodzi szczególnie wydajnie.

W badaniach nad mechanizmami odporności roślin gatunku *Armeria maritima* na metale ciężkie wykazano do tej pory, że u roślin tych następuje: zatrzymywanie metali ciężkich w korzeniach, kierowanie metali ciężkich do starzejących się liści i do włosków zwykłych epidermy, usuwanie metali ciężkich z organizmu przez gruczoły solne, kompartmentacja metali ciężkich w ścianach komórkowych, wakuolach i przestworach międzykomórkowych oraz chelatowanie metali ciężkich przy udziale garbników w wakuolach komórek.

CZY ODPORNOŚĆ NA METALE CIĘŻKIE JEST ZRÓŻNICOWANA W OBREBIE GATUNKU *ARMERIA MARITIMA*?

W niniejszym artykule omówiono mechanizmy odporności roślin gatunku *Armeria maritima* na nadmiar metali ciężkich w środowisku. Rośliny *Armeria maritima* występują zarówno na glebach skażonych metalami ciężkimi, jak i na glebach wolnych od zanieczyszczeń. Wcześniejsze badania, prowadzone w naszym laboratorium nad innymi roślinami z hałd cynkowo-ołowiowych – *Silene vulgaris* (lepnica rozdęta), *Dianthus carthusianorum* (goździk kartuzek) i *Biscutella laevigata* (pleszczotka górską) – wyka-

zały, że u roślin tego samego gatunku przystosowania do nadmiaru metali ciężkich, w tym poziom tolerancji, były lepiej rozwinięte w populacjach z hałd, niż w populacjach z terenów nieskażonych (WIERZBICKA i PANUFNIK 1998, ZAŁĘCKA i WIERZBICKA 2002, WIERZBICKA 2002, WIERZBICKA i PIELICHOWSKA 2004). Różnice te są rezultatem procesów mikroewolucyjnych zachodzących w populacjach z hałd w warunkach zanieczyszczonego środowiska (WIERZBICKA i ROSTAŃSKI 2002). Dane przedstawione przez KÖHL (1997) wskazują, że populacje roślin *A. maritima* pochodzących z hałd cynkowo-ołowiowych i z terenów nieskażonych różnią się poziomem tolerancji na cynk w testach krótkoterminowych. W Zakładzie Ekotoksykologii aktualnie realizujemy prace nad porównaniem poziomu tolerancji w populacjach roślin *Armeria maritima*, pochodzących z różnych siedlisk. Badania te pozwolą ustalić, czy wzrost roślin *Armeria maritima* na hałdach jest związany z genetycznie utrwalonym podwyższeniem poziomu tolerancji metali ciężkich.

Składam serdeczne podziękowania Prof. Krystynie Grodzińskiej i Dr Grażynie Szarek-Łukaszewskiej (Instytut Botaniki im. W. Szafera, PAN, Kraków) za wskazanie tego niezwykle ciekawego gatunku do badań i za pomoc w rozwiązywaniu problemów ekologiczno-florystycznych. Dziękuję również Prof. Małgorzacie Wierzbickiej (Zakład Ekotoksykologii, Wydział Biologii UW) za wszelką pomoc, życzliwe rady i cenne wskazówki.

ARMERIA MARITIMA – THE PLANT SPECIES ADAPTED TO GROWTH ON SOILS POLLUTED BY HEAVY METALS

Summary

Armeria maritima plants grow on unpolluted sandy soils and on soils strongly polluted by heavy metals. The heavy metal resistant ecotype of this species occurs in Poland on zinc-lead waste heaps in the Olkusz ore-mining region. In plants occurring on such polluted soils the mechanisms of resistance against toxic influence of heavy metals have been developed. In this article the mechanism of heavy metal resistance, divided into two main groups – avoiding of and tolerant to heavy metals – in *A. maritima* are discussed. So far, in this plant the following mechanisms of resistance have been described: (1) at the organism level – immobiliza-

tion of a great part of heavy metals in roots (with a significant role of root endodermis), accumulation of heavy metals in oldest leaves followed by its fall (detoxification of the aboveground part of plant), accumulation of heavy metals in trichomes and their removal through salt glands of leaf epidermis, (2) at the cellular and ultra structural level – possible role of polyhydroxyphenolic compounds in vacuoles of idioblasts, storage in cell walls and vacuoles (compartmentation), moreover, tolerance mechanisms such as induction of heat shock proteins in cytoplasm.

LITERATURA

- ANTOSIEWICZ D. M., 1992. *Adaptations of plants to an environment polluted with heavy metals*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 61, 281-299.
- ANTOSIEWICZ D. M., WIERZBICKA M., 1999. *Localization of lead in Allium cepa L. cells by electron microscopy*. J. Microsc. 195, 139-146.
- BAKER A. J. M., 1987. *Metal tolerance*. New Phytologist 106 (Suppl.), 91-111.
- BARANOWSKA-MOREK A., 2003. *Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich*. Kosmos 52, 283-298.
- BARANOWSKA-MOREK A., WIERZBICKA M., 2004. *Localization of lead in root tip of Dianthus carthusianorum*. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 46, 45-56.
- CHOI Y.-E., HARADA E., WADA M., TSUBOI H., MORITA Y., KUSANO T., SANO H., 2001. *Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes*. Planta 213, 45-50.
- CLEMENS S., PALMGREEN M. G., KRÄMER U. 2002. *A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation*. Trends Plant Sci. 7, 309-315.
- DAHMANI-MÜLLER H., VAN OORT F., GÉLIE B., BALABANE M., 2000. *Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter*. Environ. Pollut. 109, 231-238.
- DOBRAŃSKA J., 1955. *Badania florystyczno-ekologiczne nad roślinnością galmanową okolic Bolesławia i Olkusza*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 24, 357-500.
- ERNST W. H. O., 1998. *Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level*. [W:] *Exotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. SCHÜÜRMAN G., MARKERT B. (red.). John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag.
- GODZIK B., 1984. *Tolerancja wybranych gatunków roślin na metale ciężkie*. Praca doktorska, Instytut Botaniki PAN, Kraków.
- GRODZIŃSKA K., SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., 2002. *Hałdy cynkowo-olowiowe w okolicach Olkusza - przeszłość, teraźniejszość i przyszłość*. Kosmos 51, 127-138.
- GUTIÉRREZ-ALCALÁ G., GOTOR C., MEYER A. J., FRICKER M., VEGA J. M., ROMERO L. C., 2002. *Glutathione biosynthesis in Arabidopsis trichome cells*. Plant Biology 97, PNAS, 11108-11113.
- HEUMANN H.-G., 2002. *Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant Armeria maritima subsp. halleri by autometallography*. J. Plant Physiol. 159, 191-203.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.), 2002. *Fizjologia roślin*. PWN, Warszawa.
- KÜPPER H., ZHAO F. J., MCGRATH S. P., 1999. *Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. Plant Physiol. 119, 305-311.
- KÖHL K. I. 1997. *Do Armeria maritima (Mill.) Willd. ecotypes from metalliferous soils and non-metalliferous soils differ in growth response under Zn stress? A comparison by a new artificial soil method*. J. Exp. Botan. 48, 1959-1967.
- LAVID N., BARKAY Z., TEL-OR E., 2001a. *Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae)*. Planta 212, 313-322.
- LAVID N., SCHWARTZ A., YARDEN O., TEL-OR E., 2001b. *The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae)*. Planta 212, 323-331.
- LEFEVRE C., 1974. *Population variation and taxonomy in Armeria maritima with special reference to heavy-metal tolerant populations*. New Phytologist 73, 209-219.
- MIREK Z., PIĘKOŚ-MIRKOWA H., ZAJĄC A., ZAJĄC M., 2002. *Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist*. Instytut Botaniki PAN, Kraków.
- NEUMANN D., ZUR NIEDEN U., LICHTENBERGER O., LEOPOLD I., 1995. *How does Armeria maritima tolerate high heavy metal concentrations?* J. Plant Physiol. 149, 704-717.
- PAWŁOWSKI B. (red.), 1963. *Flora Polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*. Tom X. Instytut Botaniki PAN. PWN, Warszawa.
- RUTKOWSKI L., 1998. *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*. PWN, Warszawa.
- SALT D. E., PRINCE R. C., PICKERING I. J., RASKIN I., 1995. *Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard*. Plant Physiol. 109, 1427-1433.
- SŁYSZ A., WIERZBICKA M. H., 2005. *Przystosowania roślin Armeria maritima do wzrostu w środowisku skażonym metalami ciężkimi*. [W:] *Obieg pierwiastków w przyrodzie. Monografia*. Tom III. GWOREK B. (red.). Instytut Ochrony Środowiska, 629-636.
- SZAFER W., 1946. *Rodzaj Armeria w Polsce*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae; XVII, 1, Polskie Towarzystwo Botaniczne.
- SZAFER W., KULCZYŃSKI S., PAWŁOWSKI B., 1986. *Rośliny polskie. Klucz do oznaczania wszystkich gatunków roślin naczyniowych rosnących w Polsce bądź dziko, bądź też zdziczałych lub częścię hodowanych*. Część II, PWN, Warszawa.
- SZAFER W., ZARZYCKI K. (red.), 1972. *Szata roślinna Polski*. PWN, Warszawa.
- SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., NIKLIŃSKA M., 2002. *Concentration of alkaline and heavy metals in Biscutella laevigata L. and Plantago lanceolata L. growing on calamine spoils (S. Poland)*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 44, 29-38.
- SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., SŁYSZ A., WIERZBICKA M., 2004. *Response of Armeria maritima (Mill.) Willd. to Cd, Zn and Pb*. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 46, 19-24.
- SZWEYKOWSKA A., SZWEYKOWSKI J., 2004. *Botanika*. Tom I. *Morfologia*. PWN, Warszawa.
- TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., MOORE D. M., VALENTINE D. H., WALTERS S. M., WEBB D. A. (red.), 1972. *Flora Europaea. Diapensiaceae to Myoporaceae*. Cambridge University Press.
- WIERZBICKA M., 1987a. *Lead translocation and localization in Allium cepa roots*. Canad. J. Botan. 65, 1851-1860.
- WIERZBICKA M., 1987b. *Lead accumulation and its translocation barriers in roots of Allium cepa L. - autoradiographic and ultrastructural studies*. Plant, Cell Environ. 10, 17-26.
- WIERZBICKA M., 1995. *Oddziaływanie metali ciężkich na rośliny*. Kosmos 44, 639-651.
- WIERZBICKA M., 1998. *Lead in the apoplast of Allium cepa L. root tips - ultra structural studies*. Plant Sci. 133, 105-119.
- WIERZBICKA M., 2002. *Przystosowanie roślin do wzrostu na hałdach cynkowo-olowiowych okolic Olkusza*. Kosmos 51, 139-150.
- WIERZBICKA M., PANUFNIK D., 1998. *The adaptation of Silene vulgaris to growth on a calamine waste heaps (S Poland)*. Environ. Pollut. 101, 415-426.
- WIERZBICKA M., PIELICHOWSKA M., 2004. *Adaptation of Biscutella laevigata L., a metal hyperaccumulator, to growth on a zinc-lead waste heap in*

- southern Poland. Differences between waste – heap and mountain populations. *Chemosphere* 54, 1663–1674.
- WIERZBICKA M., ROSTAŃSKI A., 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biologia Cracoviensia, Series Botanica* 44, 7–19.
- WIERZBICKA M., SŁYSZ A., 2005. Does *Armeria maritima* subsp. *halleri* (Plumbaginaceae) occur in Poland? *Polish Botanical Studies* 19, 105–117.
- WIERZBICKA M., SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., GRODZIŃSKA K., 2004. Highly toxic thallium in plants from the vicinity of Olkusz (Poland). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59, 84–88.
- WÓJCIK M., 2000. Fitoremediacja – sposób oczyszczania środowiska. *Kosmos* 49, 135–148.
- ZAJĄC A., ZAJĄC M. (red.), 2001. *Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce*. Pracownia Chorologii Komputerowej, Instytut Botaniki UJ, Kraków.
- ZAŁĘCKA R., WIERZBICKA M., 2002. The adaptation of *Dianthus carthusianorum* to growth on a calamine waste heap. *Plant Soil* 246, 249–257.