

Bisutella laevigata subsp. *woycickii* – nowy endemit i relikwit postglacjalny dla flory polskiej

Olga BEMOWSKA-KAŁABUN¹, Krzysztof BRZOST², Dorota PANUFNIK-MĘDRZYCKA³,
Maria PIELICHOWSKA⁴, Małgorzata WIERZBICKA^{5*}

^{1,2,3,5} Zakład Ekotoksykologii, Instytut Biologii Środowiskowej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

⁴ Zakład Edukacji dla Zrównoważonego Rozwoju, Akademia Pedagogiki Specjalnej im. Marii Grzegorzewskiej, ul. Szczęśliwicka 40, 02-353 Warszawa

Przystosowania roślin do obecności metali ciężkich w podłożu

Rośliny kolonizujące gleby metalonośne muszą się cechować plastycznością morfologiczną i fizjologiczną (Baker 1987, Dahmani-Muller i in. 2000). Pewien poziom odporności na metale ciężkie, tzw. odporność konstytucjonalna pojawia się u wszystkich gatunków roślin, nawet u tych, które podczas wzrostu nie miały kontaktu z metalami ciężkimi. Niektóre gatunki mają jednak szczególnie dobrze rozwinięte mechanizmy odporności na metale ciężkie – tzw. odporność indukowaną. Powstała ona na drodze selekcji odpornych ekotypów, zachodzącej w środowisku o podwyższonej zawartości metali ciężkich w podłożu (Wierzbicka 2002, 2015). Na obszarach metalonośnych, takich jak np. hałdy cynkowo-ołowiane (galmanowe), występują rozmaite taksony roślin naczyniowych, mchów i porostów. Zostały one dokładnie omówione w monografii „Ekotoksykologia – rośliny, gleby, metale”, wydanej w 2015 r. pod redakcją naukową Małgorzaty Wierzbickiej. Cechą wspólną

organizmów występujących na hałdach galmanowych jest zdolność do życia na podłożu metalonośnym bez objawów stresu. Organizmy te nazywamy metalofitami. Wśród metalofitów wyróżnia się gatunki związane wyłącznie z glebami metalonośnymi (tzw. metalofity absolutne/obligatoryjne) oraz takie, które występują również na glebach „czystych” (metalofity fakultatywne/pseudometalofity). Pierwsza grupa organizmów to na ogół wysoce wyspecjalizowane endemity, które ewoluowały na podłożach bogatych w zwietrzeliny minerałów rudnych przez tysiące lat. Druga grupa organizmów miała natomiast kontakt z metalami znacznie krócej, ale i te organizmy wykazują szereg cech przystosowawczych pozwalających im przetrwać na obszarach metalonośnych (Antonovics i in. 1971, Prasad 2004, Baker i in. 2010, Rostański i in. 2015, Szarek-Łukaszewska i in. 2015, Wierzbicka 2015).

Rośliny zasiedlające metalonośne podłoża, obok przystosowań do wysokiego poziomu metali ciężkich, rozwijają również przystosowania do innych czynników utrudniających wzrost, takich jak np. susza, silna insolacja, czy też niedobór składników odżywczych związany z małą ilością materii organicznej w podłożu. W wyniku wielokierunkowej adaptacji może z czasem dojść

* Autor korespondujący

do powstania różnic pomiędzy osobnikami populacji tego samego gatunku występującymi na terenach metalonośnych i niemetalonośnych. Procesy prowadzące do powstania utrwalonych genetycznie różnic w obrębie gatunku określane są mianem mikroewolucji, która została szerzej omówiona w poprzednim rozdziale tej książki. Tego typu zmiany zaszyły np. u gatunków metalofitów zasiedlających hałdę cynkowo-ołowiową w Bolesławiu (hałdę odpadów górniczych z odkrywki Bolesław, Włodarz – Rodział 1, niniejszy tom) koło Olkusza, m.in. u *Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalrée, *Armeria maritima* (Mill.) Willd., *Dianthus carthusianorum* L. i *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. Zmiany tego typu zaszyły także w gatunku, któremu poświęcony jest ten tom – *Biscutella laevigata* L. (Kruckeberg i Kruckeberg 1990, Lefebvre i Vernet 1990, Wierzbicka i Panufnik 1998, Wierzbicka 2002, 2015, Wierzbicka i Rostański 2002, Załęcka i Wierzbicka 2002, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Abratowska 2006, Ernst 2006, Przedpeńska i Wierzbicka 2007, Abratowska i in. 2012, Wójcik i in. 2013, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2017, 2020).

Jednym z mechanizmów przystosowawczych do niesprzyjających warunków panujących na hałdach jest tzw. strategia życiowa typu r, rozwijająca się u niektórych gatunków roślin z terenów metalonośnych. Prowadzi ona do wytwarzania osobników o małych rozmiarach, o skróconym cyklu życiowym, szybko wchodzących w fazę generatywną i wytwarzających duże ilości małych nasion (np. *A. arenosa*, *D. carthusianorum* i *S. vulgaris*) (Wierzbicka i Panufnik 1998, Załęcka i Wierzbicka 2002, Przedpeńska i Wierzbicka 2007, Wierzbicka 2015). U tych roślin w wyniku rozmnażania generatywnego powstaje znaczna liczba nasion, zaś długi okres ich żywotności zapewnia zróżnicowanie puli genetycznej gatunku. Jest to strategia roślin pionierskich. Jednak na podłożu galmanowym wzrost siewek powstałych z nasion jest słaby, pozostają jedynie osobniki o najlepszych cechach przystosowawczych. Wykazano, że u *B. laevigata* jednym z mechanizmów przystosowawczych do wzrostu na hałdach galmanowych jest występowanie klonalnej formy rozmnażania wegetatywnego. Młode rośliny powstają z pączków korzeniowych i to tak licznie, że w ciągu jednego sezonu wegetacyjnego

jedna roślina jest zdolna wytworzyć do 15 roślin potomnych (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017). Reprodukacja wegetatywna jest dla roślin kosztowna energetycznie, co wynika z wysokich nakładów na wytwarzanie rozmnożeń (Falińska 1997). Zapewnia ona jednak sukces rozrodczy w warunkach trudnych siedlisk, do których zaliczają się zarówno hałdy cynkowo-ołowiowe, jak i piargowe, górskie zbocza. Osobniki potomne, podobnie jak roślina macierzysta, posiadają również korzystne cechy, umożliwiające im wzrost w trudnych warunkach. A zatem rozmnażanie wegetatywne odgrywa bardzo istotną rolę w strategii przetrwania gatunku *B. laevigata* w warunkach trudnych dla wzrostu (Wierzbicka i in. 2015, 2017), co będzie jeszcze omawiane w dalszych częściach tego rozdziału. Opisany przykład jest prawidłowością wśród roślin klonalnych, pozwalającą zachować swoisty kompromis pomiędzy nowymi genotypami, wprowadzanymi do środowiska w wyniku rozmnażania płciowego, a powielaniem genotypu w efekcie rozmnażania wegetatywnego osobników (klonów), które są najlepiej dostosowane do lokalnie panujących warunków siedliskowych (Falińska 1997).

Omawiając przystosowania roślin do wzrostu na pogórnicych hałdach należy wspomnieć o reakcjach obronnych na metale ciężkie. Zasadniczo dzielimy je na dwie grupy mechanizmów: (1) unikania metali ciężkich, których celem jest zapobieganie wniknięciu metali do wnętrza komórki oraz (2) tolerancji metali ciężkich, które są odpowiedzią na obecność metalu we wnętrzu komórki (Abratowska 2006, Kacperska 2007, Verbruggen i in. 2009). W przypadku mechanizmów unikania wyróżniamy następujące strategie u roślin: wykluczenie, eliminację, redystrybucję i kompartmentację. Przez wykluczenie rozumiemy procesy, których celem jest zapobieganie pobieraniu metali ciężkich przez roślinę. Zalicza się tu wydzielanie do ryzosfery (otoczenia korzeni) związków chelatujących (wiążących) jony metali (dzięki czemu stają się one niedostępne dla roślin), jak również zapobieganie rozprzestrzenianiu się metali w roślinie, dzięki barierom istniejącym na drogach transportu metali w korzeniach i pędach (Wierzbicka 1995, Clemens i in. 2002, Baranowska-Morek 2003, Baranowska-Morek i Wierzbicka 2004, Abratowska

2006, Verbruggen i in. 2009). Korzenie roślin mogą modyfikować swoje otoczenie poprzez wydzielanie związków, które są zdolne do zmniejszania ilości dostępnych metali ciężkich dla roślin przez wiązanie ich w glebie. Przykładowo korzenie mogą wydzielać związki pektynowe, które łączą się z metalami. Te złożone związki nie są pobierane przez korzenie, zatem nadmiar metali ciężkich nie dociera do cytoplazmy komórkowej. Chroni to rośliny przed pobraniem wysokich dawek metali (Olko 2009, Wierzbicka 2015, Bothe i Słomka 2017). Metale ciężkie mogą zostać również związane z kwasami, takimi jak kwas jabłkowy lub cytrynowy, poza korzeniami lub w ich wnętrzu. Wydzielanie korzeniowe może również zmienić wartość odczynu gleby (pH) i tym samym zmienić zarówno dostępność, jak i szybkość pobierania metali ciężkich do korzeni roślin (Bothe i Słomka 2017).

Pośród sposobów ochrony szczególnie wrażliwych obszarów w roślinie oraz barier zapobiegających rozprzestrzenianiu się metali ciężkich w korzeniach i pędach, należy wymienić przede wszystkim: ciche centrum (strefa QC, ang. *quiescent centre*) i strefę merystematycznych komórek czapeczki w wierzchołkowej części korzenia, komórki merystematycznego perycyklu oraz endodermę (Wierzbicka 2015). W pierwszym z wymienionych obszarów znajdują się komórki inicjalne, odgrywające szczególnie ważną rolę w procesach regeneracji korzenia, dlatego też wymagają szczególnej ochrony przed wnikaniem metali ciężkich (Wierzbicka 1987a, 1995). Komórki merystematycznego perycyklu (inaczej okólnicy, warstwa komórek miększowych na obwodzie walca osiowego w korzeniu), pełnią funkcje takiej bariery na pograniczu wierzchołka i zróżnicowanej strefy korzenia. Metale ciężkie gromadzą się w ścianach komórkowych tych komórek. W wyniku procesu egzocytozy metale są wyrzucane z symplasty do apoplastu korzenia. Proces ten chroni tkanki głębiej położone, z których powstają tkanki przewodzące (Baranowska-Morek i Wierzbicka 2004). Ściany komórkowe endodermi (warstwy komórek znajdującej się w głębi korzenia, na granicy kory pierwotnej i walca osiowego) posiadają tzw. pasemka Caspariego, w których ściana komórkowa wraz z blaszką środkową przesycone są suberyną i ligniną. Uniemożliwia to dyfundowanie wody wraz z jonami metali ciężkich. Jest

to ochrona przed wnikaniem metali do tkanek przewodzących, a przez to chronione są nadziemne części roślin. W szczególności, chroniony jest cały system fotosyntetyczny (Wierzbicka 1987b). Dzięki barierze w generatywnej części kwiatu, która znajduje się w dnie kwiatowym, zalążki pozostają wolne od metali ciężkich, nawet przy znacznych ich ilościach w innych częściach roślin (Ernst i in. 1990). Przypomina to barierę pepowinową u ssaków. Okrywy nasienne chronią zarodki roślin przed metalami ciężkimi podczas procesu pęcznienia nasion. Bariera ta znika, kiedy okrywa nasienne zostanie rozerwana przez kiełkujący korzeń zarodkowy (Wierzbicka i Obidzińska 1998). Różne bariery w liściach utrudniają rozprzestrzenianie się metali do kolejnych warstw komórek liścia, np. komórki pochwy okołowiązkowej w liściu jednoliściennych chronią wiązki przewodzące (Wierzbicka 2015).

Eliminacja, kolejna strategia unikania metali ciężkich, to procesy, które działają gdy metale ciężkie dostały się już do tkanek roślin. Prowadzą one do pozbycia się metali z rośliny. Do mechanizmów eliminacji należy wydalanie metali z organizmu przez jego powierzchnię, wydzielanie metali przez gruczoły i włoski wydzielnicze, jak również zrzucanie całych organów zawierających metale ciężkie (Ernst 1998, Clemens i in. 2002). Włoski na liściach roślin rosnących w obecności metali z reguły zawierają duże ilości metali. Przykładowo okazy *B. laevigata* występujące na hałdzie odpadów górniczych w Bolesławiu miały zwiększoną ilość włosków gromadzących duże ilości metali (talu, kadmu, ołowiu i cynku). U podstawy włoska znajduje się centralna, duża wakuola. Badania wykazały, że właśnie w tej części włoska zdeponowane są największe ilości metali (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017). Zatem komórki włosków stanowią obszary, do których wyrzucane są nadmierne ilości szkodliwych pierwiastków. Dzięki temu mogą być chronione pozostałe komórki liścia (Ma i in. 2005). Innym przykładem eliminacji może być wydzielanie metali ciężkich wraz z innymi solami przez gruczoły solne roślin (np. *A. maritima*). Również komórki epidermy mogą wydzielać metale ciężkie na powierzchnie liści (np. *S. vulgaris*) (Wierzbicka 2015). Jako przykład eliminacji warto także wymienić fakt, że najstarsze, zasychające

i odrzucane liście roślin ze stanowisk silnie zanieczyszczonych metalami, często zawierają największe ilości metali ciężkich. Ochronia to pozostałe, młode części roślin, przed metalami. Przykładowo u *B. laevigata* usuwanie nadmiaru metali ciężkich polega m.in. właśnie na ich gromadzeniu w najstarszych liściach, które następnie zasychają (Godzik 1984, 1991, Pieliowska 2007, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Mechanizmem unikania metali ciężkich jest także redystrybucja. Rozumiemy pod tym pojęciem procesy, które mają na celu ograniczenie obecności metali ciężkich i ich transport do miejsc, gdzie istnieje mniejsze ryzyko ich toksycznego wpływu na organizm, np. do starzejących się liści (Ernst 1998), co wiąże się z opisanym w poprzednim akapicie procesem eliminacji.

Ostatnim mechanizmem unikania metali jest kompartmentacja rozpatrywana na poziomie komórkowym. Polega ona na gromadzeniu metali ciężkich w miejscach, gdzie nie stanowią one zagrożenia dla komórek roślinnych, np. w ścianach komórkowych, przestworach międzykomórkowych i w wakuolach. Tworzone są kompleksy metali, np. w wakuoli z kwasami nieorganicznymi i organicznymi, pochodnymi fenoli i glikozydami (Wierzbicka 1995, 1998, Abratowska 2006, Kacperska 2007). Dobrym przykładem są tu także zmiany zachodzące w ścianie komórkowej pod wpływem nadmiaru metali ciężkich. Zaobserwowano, że struktura i właściwości ściany komórkowej ulegają zmianie – przede wszystkim następuje zwiększenie w niej ilości związków pektynowych. Związki pektynowe łączą się z jonami metali ciężkich, tworząc pektyniany. Pod wpływem działania metali ciężkich następuje także pogrubienie ścian komórkowych przez zwiększenie ilości związków pektynowych, dzięki czemu możliwe jest związanie większej ilości metali ciężkich w ścianach komórkowych. Zjawisko to zaobserwowano np. w komórkach korzeni *Allium cepa* L. i w komórkach *Funaria hygrometrica* Hedw. (Wierzbicka 1998, 1999, 2015, Krzesłowska i in. 2009, 2010). Poza pektynami, w ścianie komórkowej zdolność do wiązania metali ciężkich wykazują także grupy karboksylowe kwasów poligalakturonowych i związki fenolowe, które tworzą kompleksy z jonami metali (Wierzbicka 2015). Także u *B. laevigata* stwierdzono,

że ołów w największych ilościach był gromadzony w ścianach komórkowych, czemu często towarzyszyło zwiększenie ich grubości. Ołów był również obecny w przestworach międzykomórkowych, znaczne jego ilości stwierdzono także w wakuolach komórkowych (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Mechanizmy tolerancji działają, gdy jony metali ciężkich znajdują się już we wnętrzu komórki (w cytoplazmie), gdzie ich wpływ na metabolizm komórki jest najbardziej niebezpieczny. W odpowiedzi na wzrost stężenia metalu w cytoplazmie syntetyzowane są m.in.: metabolity stresowe (np. prolina oraz wiele cukrów), polipeptydy i tzw. białka stresowe (syntetyzowane także w odpowiedzi na inne czynniki stresowe niż obecność metali ciężkich). Są nimi np. przekaźniki sygnałów, białka strukturalne, enzymy, chelatory metali (np. glutation i jego pochodne – fitochelatyny), a także osmotyny (białka związane ze stresem osmotycznym), białka szoku cieplnego (tzw. HSP, ang. *heat shock proteins*) oraz białka RAB (ang. *ras-associate binding proteins*, jedna z grup białek odpowiedzialnych za transport pęcherzykowy) (Abratowska 2006, Kacperska 2007, Varbruggen i in. 2009). Większość metali ciężkich jest związana i transportowana w postaci kompleksów z niskocząsteczkowymi ligandami. Najczęściej jest to cząsteczka lub anion w związkach kompleksowych, który jest przyłączony bezpośrednio do atomu centralnego lub kationu centralnego, zwanego centrum koordynacji albo rdzeniem kompleksu. Najważniejszymi z nich są aminokwasy (np. histydyna i nikotianamina), kwasy organiczne (np. kwas cytrynowy, jabłkowy, szczawiowy), fityna, flawonoidy, fitochelatyny i metalotioneiny (Pohlmeier 2004, Salt i in. 1995, 1998, Krämer i in. 1996, Clemens i in. 2002, Kim i in. 2005, Haydon i Cobbett 2007, Olko i in. 2008). Zwiększona synteza wymienionych związków stanowi podstawę działania mechanizmów tolerancji roślin na metale ciężkie.

Jak już wspomniano, po wnikięciu jonów metali do komórki, bardzo szybko są one kompleksowane przez niskocząsteczkowe ligandy, np. metalotioneiny, fitochelatyny, kwasy organiczne (głównie cytrynowy i jabłkowy), aminokwasy (histydyna, cysteina, nikotianamina) czy fitynę (forma zapasowa fosforu) (Van Steveninck i in. 1990, Krämer

i in. 1996, Hagemeyer 1999, Takahashi i in. 2003, Sharma i Dietz 2006). Po skompleksowaniu jonów metalu, ligand wraz z metalem mogą być przetransportowane do wakuoli, gdzie związane jony metali pozostają nieaktywne. Przykładowo, w wakuolach komórek epidermy *A. cepa*, kadm występował w połączeniu z kwasami organicznymi oraz z histydyną. Ołów z kolei występował w połączeniu z grupami tiolowymi i z histydyną. Tkanki roślin mają zwiększone możliwości detoksykacji metali ciężkich, gdy zawierają w wakuolach komórkowych znaczne ilości związków fenolowych, które wychwytyują metale. Dzieje się tak np. u *A. maritima* (Przedpeńska-Wąsowicz i Wierzbicka 2011, Wierzbicka 2015).

Metalotioneiny są to małe białka bogate w cysteinę, która w cząsteczce posiada grupę tiolową (-SH). Efektywność wiązania jonów metali polega na ich dużym powinowactwie do grupy -SH, która wiąże metale ciężkie w cytoplazmie. Metalotioneiny występują w komórkach zwierzęcych i grzybowych, ale geny kodujące metalotioneiny są również powszechne w komórkach roślinnych (Abratowska 2012, Bothe i Słomka 2017). Fitochelaty, zaliczane do III grupy metalotionein, są peptydami tiolowymi charakterystycznymi dla roślin. Prekursorem fitochełatyn jest glutation i powstają one przy udziale enzymu nazywanego syntazą fitochełatynową (PCS, ang. *phytochelatin synthase*). Charakterystycznym elementem fitochełatyn jest wielokrotnie (2–11) powtórzony motyw dwóch aminokwasów: kwasu glutaminowego i cysteiny. Karboksyterminalnym aminokwasem w cząsteczce fitochełatyn jest glicyna, a w homologach fitochełatyn, nazywanych izofitochełatynami, zamiast glicyny występuje β -alanina, seryna, kwas glutaminowy lub glutamina. Fitochełatyny uczestniczą w detoksyfikacji metali poprzez wiązanie ich do grup -SH cysteiny (Clemens i in. 1999, Agrawal i in. 2011, Abratowska 2012, Bothe i Słomka 2017, Wójcik i in. 2017). Przykładowo, kadmo-proteiny powstałe na skutek połączenia fitochełatyn z kadmem wykryto w tkankach *Arabidopsis halleri* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz, po traktowaniu roślin tym metalem (Przedpeńska-Wąsowicz i in. 2012, Wierzbicka 2015).

Metale ciężkie mogą być również chelatowane przez aminokwasy. Na przykład u *Noccaea*

caerulescens (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey. wykazano wiązanie metali, w szczególności niklu, przez histydynę. Wykazano także, że nikotianamina uczestniczy w transporcie cynku (także żelaza i innych metali), szczególnie u *A. halleri*, który następnie w postaci takiego kompleksu jest deponowany w wakuoli (Bothe i Słomka 2017). Z danych literaturowych wiadomo, że nikotianamina odgrywa istotną rolę w tolerancji roślin na metale ciężkie. Posiada właściwości chelatowania metali, może pośredniczyć w załadunku i rozładunku floemu (Stephan i Scholz 1993). U roślin hiperakumulujących cynk, np. *A. halleri*, wykazano obecność genów kodujących syntazę nikotianaminy. Na poziomie komórkowym, kompleksy metalu z nikotianaminą usuwane są z cytoplazmy do wakuoli, gdzie następuje ich izolacja i tym samym detoksykacja. Nikotianamina odgrywa istotną rolę w transporcie takich pierwiastków, jak cynk, miedź, żelazo, nikiel czy mangan (Takahashi i in. 2003, Weber i in. 2004, Kim i in. 2005). Inne badania przeprowadzone najnowszymi metodami chemii analitycznej pokazały, że cynk występuje w roślinach *B. laevigata* właśnie w kompleksie z nikotianaminą (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Cząsteczkami wiążącymi jony metali w cytoplazmie są także glutation i poliaminy. Komponenty ściany komórkowej roślin, w szczególności pektyny i frakcje celulozy, mogą również służyć do adsorpcji metali ciężkich (Bothe i Słomka 2017), o czym wspomniano już wcześniej przy omawianiu mechanizmu kompartmentacji. Przykładowo, wykazano, że komórki korzeni *D. carthusianorum* (Baranowska-Morek 2008) wiążą ołów wewnątrz pęcherzyków diktiosomalnych, przenoszących pektyny, czyli substancje budulcowe ściany komórkowej. Pęcherzyki te łączyły się następnie z plazmalemmą, a ich zawartość na drodze egzocytozy była usuwana na teren ściany komórkowej, gdzie formowały się duże złogi ołowiu (Baranowska-Morek 2008, Abratowska 2012). Z kolei, w komórkach korzeni i epidermy liści spichrzowych *A. cepa*, po traktowaniu ołowiem, zaobserwowano tworzenie się uwypukleń plazmalemmy (tzw. plazmotubul). Na szczycie plazmotubul widoczne było nagromadzenie ołowiu, który był odkładany w postaci złogów na terenie ściany komórkowej (Wierzbicka 1998, Wierzbicka i in. 2007).

Stresowi spowodowanemu przez metale ciężkie, często towarzyszą również inne rodzaje stresów, takie jak np. zasolenie, susza, deficyty pokarmowe czy kwasność gleby. U roślin w takich sytuacjach następuje indukowana ekspresja genów odpowiadających za reakcję na stres. W jej wyniku wytwarzane są m.in. transferaza S-glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa, cytochrom P450 i tioredoksyna. Takie białka (enzymy) mogą służyć do detoksykacji ROS, czyli tzw. reaktywnych form tlenu, generowanych m.in. przez nadmiar metali ciężkich. Ponadto mogą być produkowane także białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock proteins*), które powstają nie tylko w wysokich temperaturach, ale również pod wpływem innych czynników stresowych, w tym także na skutek narażenia na nadmiar metali ciężkich. HSP nie tylko funkcjonują jako chaperony (białka opiekuńcze) w zwijaniu i składaniu białek, ale mogą również służyć do ochrony i naprawy białek przed uszkodzeniem przez stres oksydacyjny. Metale są także wiązane przez inne białka opiekuńcze, tzw. metalochaperony (Huffman i O'Halloran 2001, Hall 2002, Ouziad i in. 2005, Hildebrandt i in. 2007, Kacperska 2007, Luo i in. 2016, Bothe i Słomka 2017).

Po omówieniu głównych mechanizmów ochrony roślin przed metalami ciężkimi, warto wspomnieć, że udział w wytworzeniu tolerancji na metale mają u roślin także występujące w plazmalemmie transportery błonowe i akwaporyny. Wykazano na przykład, że zmieniony transport wody w komórkach, wynikający z różnic w aktywności akwaporyn, może podwyższać poziom tolerancji na metale ciężkie (Przedpeńska-Wąsowicz i Wierzbicka 2011, Wierzbicka 2015). Rolę w łagodzeniu stresu związanego z metalami ciężkimi, szczególnie u drzew, pełnią również ektomykoryzowe grzyby (EMF, ang. *ectomycorrhizal fungi*). Wykazano, że EMF zmniejszają akumulację metali ciężkich m.in. przez *Populus alba* L., *Pinus sylvestris* L. czy *Betula* sp. (Hrynkiewicz i in. 2015, Bothe i Słomka 2017).

W dalszej części niniejszego rozdziału zostanie przedstawiona taksonomia dwóch podgatunków *B. laevigata* występujących w Polsce, a następnie zostaną szczegółowo omówione przystosowania tego gatunku do metali ciężkich.

Taksonomia *B. laevigata* z Tatr i Bolesławia

Zgodnie z danymi literaturowymi (Pawlus 1985, Guinea i Heywood 1964, Wąsowicz 2015, Rostański i in. – Rozdział 3, niniejszy tom) *B. laevigata* jest jedynym przedstawicielem we florze polskiej rodzaju *Biscutella* L. Roślina ta jest byliną osiągającą od 10 do 40 cm wysokości. Jest to gatunek bardzo zmienny. W całej Europie opisano dotychczas dwa jej podgatunki (Guinea i Heywood 1964). Przez wiele lat podawano, że w Polsce, w Tatrach, występują również dwa podgatunki: *B. laevigata* subsp. *kernerii* Mach.-Laur. oraz subsp. *gracilis* Mach.-Laur. Jednakże morfologiczne różnice pomiędzy tymi podgatunkami nie były jednoznaczne i odróżnienie ich przez dłuższy czas wydawało się wątpliwe. Ostatecznie stwierdzono, że na obszarze gór Europy Centralnej, w tym również w Tatrach, występuje podgatunek *B. laevigata* subsp. *gracilis* (Guinea i Heywood 1964, 1993, Pawlus 1985, Mirek i in. 2002). Także nowsze badania morfologiczne i genetyczne, przeprowadzone w Zakładzie Ekotoksykologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW), wskazują na występowanie w Tatrach tylko jednego podgatunku *B. laevigata* subsp. *gracilis* (Pieliuchowska 2007, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020).

Na podstawie badań morfologicznych osobników *B. laevigata* pochodzących z trzech różnych stanowisk w Tatrach: z Czerwonych Wierchów, Doliny Małej Łąki i Doliny Jaworzynki stwierdzono, że rośliny tam występujące bardzo różniły się pomiędzy sobą, zarówno wyglądem, jak i wielkością. Było to związane ze stopniem nasłonecznienia i wilgotnością stanowiska, na którym występowały. Z roślin z tych trzech stanowisk zebrano nasiona a następnie wyhodowano rośliny w glebie ogrodniczej, w szklarni – czyli w jednakowych warunkach nasłonecznienia i wilgotności. Z nasion *B. laevigata* z badanych stanowisk z Tatr uzyskano rośliny o jednakowej wielkości i podobnym pokroju (Pieliuchowska 2007). Dowodzi to braku różnic morfologicznych utrwalonych genetycznie pomiędzy badanymi roślinami.

W dalszym toku badań przeprowadzono analizę genetyczną *B. laevigata* z trzech stanowisk w Tatrach (z Doliny Jaworzynki, Doliny Małej Łąki

i Stołów), z wykorzystaniem markerów molekularnych – metodą AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*). Badania te umożliwiły poznanie struktury genetycznej badanych populacji. Ostatecznie wykazano bardzo niewielkie dystanse genetyczne pomiędzy poszczególnymi populacjami z Tatr, tak że wszystkie osobniki z tych populacji zostały zgrupowane w jednym obszarze (Ryc. 2 w Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 5, niniejszy tom). Uzyskany wynik świadczy o braku różnic genetycznych oraz o znaczącym przepływie genów pomiędzy badanymi populacjami z Tatr (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). A zatem, wyniki badań jednoznacznie wskazują, że w Tatrach występuje tylko *B. laevigata* subsp. *gracilis*.

Równocześnie przeprowadzono badania genetyczne *B. laevigata* porastającej hałdy pogórnicy w Bolesławiu. Zbadano poziom różnorodności genetycznej pomiędzy populacjami *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr. Wyniki tych badań przedstawiono na Rycinie 2, w Rozdziale 5. Stwierdzono bardzo dużą odległość genetyczną pomiędzy roślinami pochodzącymi z hałdy a roślinami z Tatr – ponad 30-krotnie większą, niż odległość genetyczna oszacowana wyłącznie pomiędzy populacjami tatrzańskimi. Ponadto w populacji roślin z hałdy nie stwierdzono obecności genotypów z Tatr. Przepływ genów pomiędzy populacjami z Tatr a populacją z hałdy ustał prawdopodobnie, co najmniej kilka tysięcy lat temu (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). Wydaje się więc, że występująca odrębność populacji roślin z hałdy jest wynikiem procesu ewolucyjnego, który zdecydowanie przekracza ramy czasowe wyznaczone przez pierwsze doniesienia literaturowe o występowaniu *B. laevigata* na pogórnicych stanowiskach w okolicach Olkusza (Uechtritz 1877, Wierzbicka i in. 2015).

Znakomity polski botanik, Władysław Szafer, który badał niżowe stanowiska roślin górskich uznał, że *B. laevigata* występująca w okolicach Olkusza jest reliktem glacialnym (Szafer 1930). Przemawiały za tym dane kopalne, które mówią o obecności tego gatunku w czasie ostatnich zlodowaceń. Przeprowadzone przez nas badania genetyczne pozwalają na szacunkowe datowanie początków pojawienia się *B. laevigata* w okolicach Olkusza – izolacja genetyczna pomiędzy populacjami z Tatr i Olkusza mogła nastąpić w czasie

zlodowacenia środkowopolskiego, a więc nawet około 120 000 lat temu (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015).

Można się zastanawiać, w jaki sposób *B. laevigata* utrzymała się na tym obszarze przez tak długi okres czasu. Odpowiedź jest prosta. Budowa geologiczna rejonu olkuskiego wskazuje, że zawsze były to tereny bogate w złoża rud cynkowo-olowiowych. Na powierzchni gruntu powstawały wychodnie złóż rud cynkowo-olowiowych, które istniały na długo przed podjęciem przez człowieka eksploatacji przemysłowej tego terenu. Wychodnie skał rudonośnych mogły być miejscem występowania *B. laevigata* z racji bardzo wysokiej jej tolerancji na metale ciężkie, a szczególnie cynku. Natomiast po rozpoczęciu wydobywania rud metali powstały nowe siedliska (np. hałdy odpadów pogórnicych zanieczyszczonych metalami pochodzącymi z rud) bardzo dogodne dla wzrostu tej pionierskiej rośliny.

Jak wykazano, populacje *B. laevigata* z terenów w rejonie olkuskim od tysięcy lat ewoluowały w izolacji od pozostałych populacji. Pomiędzy tymi grupami roślin występują również znaczne różnice morfologiczne, anatomiczne i fizjologiczne (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). Dlatego populacji *B. laevigata* z hałd można nadać rangę podgatunku. Dla tego, nowo odkrytego taksonu, proponujemy nazwę *B. laevigata* L. subsp. *woycickii* M. Wierzb., Pielich. & Wasowicz (pleszczotka Wóycickiego). W ten sposób chcemy uczcić pamięć profesora Zygmunta Wóycickiego (1871–1941), który był jednym z założycieli Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i który zapoczątkował badania nad florą galmanową okolic Olkusza. Ostatnio ukazała się publikacja nomenklatoryczna przedstawiająca ten nowy podgatunek pleszczotki (Wierzbicka i in. 2020).

Na koniec tych rozważań pragniemy podkreślić wyjątkowość roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia. Są to rośliny niezwykle cenne dla nauki, które można określić jako „relikt polodowcowy”, czyli będący pozostałością po okresie zlodowaceń, oraz jako „endemit” – czyli podgatunek występujący jedynie w okolicy Olkusza (endemit to takson unikalny dla danego regionu). Ponieważ do endemitów zwykle zalicza się wyższy takson – gatunek, to w tym przypadku możemy ściślej powiedzieć, że podgatunek *woycickii* ma charakter

endemiczny. Rośliny te mają ogromną wartość, zasługującą na popularyzację wiedzy o nich oraz na pełną ich ochronę w rejonie olkuskim.

Wpływ siedliska na morfologię *B. laevigata* z Bolesławia i z Tatr

Na morfologię roślin decydujący wpływ ma siedlisko, w którym występują. Rośliny kolonizujące m.in. środowiska suche, zasolone bagna, gleby kwaśne czy metalonośne, muszą cechować się morfologiczną i fizjologiczną plastycznością, o czym pisano w Rozdziale 5 niniejszego tomu. Generalnie, cecha ta charakteryzuje odmiany, ekotypy i gatunki roślin spotykanych na siedliskach trudnych do zasiedlenia. Dobrym przykładem są tu gatunki charakterystyczne dla flory terenów metalonośnych, np.: *S. vulgaris*, *D. carthusianorum*, *A. maritima*, *N. caerulea* oraz *B. laevigata* (Bemowska-Kałużna i in. – Rozdział 5, niniejszy tom). Poniżej prześledzimy zarówno morfologię *B. laevigata* subsp. *woycickii* z pogórnicy galmanowej w Bolesławiu, jak również morfologię *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr.

Biscutella laevigata – metalofit fakultatywny

Zanim jednak omówimy morfologię pleszczotki górskiej, warto przedstawić siedliska, na których występuje ten gatunek. W Polsce, zarówno w Tatrach, jak i na łąkach cynkowo-ołowiowych (galmanowych) w rejonie olkuskim, zawartość metali w glebie jest podwyższona, przy czym na łąkach stężenia metali są dwa-trzy rzędy wielkości większe od stężenia metali w Tatrach. W rejonie olkuskim średnia zawartość metali ciężkich w badanych podłożach (głównie galmanowych) wynosi: 3657 mg/kg ołowiu, 9764 mg/kg cynku i 76 mg/kg kadmu (Kapusta i in. 2015). Natomiast badania gleb w Tatrzańskim Parku Narodowym wykazały, że łączyny tam występujące także należą do gleb o stosunkowo wysokiej zawartości metali ciężkich, które wynoszą dla: ołowiu 38–411 mg/kg, cynku 81–745 mg/kg i kadmu 0,4–17,0 mg/kg (Miechówka i in. 2002). W glebie ze stanowisk *B. laevigata* w tych rejonach Tatr, stężenia metali mieszczą się w podanych wyżej zakresach (Rostański i in. – Rozdział 3, niniejszy tom). Na podobnych stanowiskach stwierdzono obecność *B. laevigata* we Francji na łączynie cynkowo-ołowiowej w Les

Malines (Las Avinières) w pobliżu Montpellier, gdzie stwierdzono następujące stężenia metali: cynku – 15 000 mg/kg, ołowiu – 5000 mg/kg, talu – 40 mg/kg. W Alpach Austriackich z kolei, obecność *B. laevigata* stwierdzono na metalonośnym stanowisku nad rzeką Gailitz, gdzie stężenia metali w glebie wynosiły: cynku – do 75 000 mg/kg, ołowiu – do 4000 mg/kg, kadmu – do 44 mg/kg. Opisano również, że *B. laevigata* występuje na terenach o niepodwyższonych zawartościach metali ciężkich. Są to np. Alpy Austriackie, w rejonie Hochobir, gdzie stwierdzono stężenia metali na poziomie tła geochemicznego obszarów niemetalonośnych: cynku – 63 mg/kg, ołowiu – 33 mg/kg, kadmu – 0,03 mg/kg (Anderson i in. 1999a, Wenzel i Jockwer 1999, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Gatunki roślin występujące na glebach metalonośnych nazywamy metalofitami. Mogą to być albo metalofity obligatoryjne – jeśli występują wyłącznie na glebach metalonośnych albo metalofity fakultatywne – jeśli występują zarówno na glebach metalonośnych, jak i normalnych. Biorąc pod uwagę fakt, że *B. laevigata* występuje, w Polsce i innych krajach Europy, na glebach charakteryzujących się niską, wysoką i bardzo wysoką koncentracją metali ciężkich należy stwierdzić, że jest to metalofit fakultatywny (Wierzbicka i in. 2015, 2017). Jednocześnie, dotychczas przeprowadzone badania (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Brzost 2005, Owczar 2006, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017) wskazują na wysokie preferencje *B. laevigata* do wzrostu na glebach metalonośnych.

W ramach dotychczasowych badań wykazano także, że na ilość pobranych metali ciężkich przez *B. laevigata* wpływają dwa czynniki: okres wegetacji oraz stopień zadarnienia podłoża. Przykładowo, najwyższe stężenia ołowiu w tkankach *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia stwierdzano u osobników rosnących na niezadarnionym podłożu galmanowym, pod koniec okresu wegetacyjnego (listopad). W tym przypadku, stężenie ołowiu w korzeniach roślin wzrosło trzy razy, zaś w liściach cztery razy w porównaniu do osobników występujących na zadarnionym podłożu galmanowym. Ponadto, w okresie listopada stwierdzono istotny wzrost (trzy-cztery razy) stężenia ołowiu w liściach, w stosunku do czerwca, niezależnie od tego czy

rośliny pochodziły z podłoża zadarnionego, czy niezadarnionego (Ryc. 1). Podobną zależność zaobserwowano dla cynku i kadmu (Pielichowska 2007).

***Biscutella laevigata* – preferuje gleby zasobne w wapń**

Pleszczotka górską z Bolesławia i z Tatr występuje na podłożach o dużej zawartości wapnia, o odczynie (pH) alkalicznym. Tło geochemiczne dla gleb w Polsce wynosi dla wapnia 1700 mg/kg przy pH 5,9 (Lis i in. 1995), w porównaniu z nim na hałdzie w Bolesławiu zawartość wapnia w podłożu jest bardzo wysoka (73 873 mg/kg s.m., przy pH 7,81) (Tabela 1). W Tatrach zawartości tego pierwiastka w podłożu są jeszcze wyższe i wynoszą 250 000 mg/kg (przy pH 7,3), jak podaje Godzik (1984) lub 118 000 mg/kg, jak podają Niklińska i Szarek-Łukaszewska (2002). Zatem obecność wysokich zawartości wapnia w podłożu wydaje się mieć istotne znaczenie dla pleszczotki górskiej, jako całego gatunku. Należy sobie uświadomić fakt, że duża zawartość wapnia w podłożu i jego wysoki odczyn, powodują mniejszą toksyczność metali ciężkich dla roślin. W takich warunkach mniejsze ilości metali ciężkich znajdują się w formach rozpuszczalnych w glebie, dostępnych dla roślin (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015). Preferowanie przez *B. laevigata* siedlisk zasobnych w wapń, o alkalicznym odczynie, jest ważną cechą gatunku, pozwalającą jej kolonizować obszary o podwyższonych stężeniach metali.

***Biscutella laevigata* – siedliska suche i wilgotne**

Jak wynika z badań (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017), wzrost *B. laevigata* subsp. *woycickii* odbywa się najczęściej na hałdzie w warunkach charakterystycznych dla siedlisk kserotermicznych. Pleszczotka górską występuje tu na glebach suchych, szkieletowych, z małą ilością materii organicznej, na podłożu galmanowym (Ryc. 2A). Rośliny osiągają w tych warunkach różną wielkość, w zależności od zasobności podłoża w wodę, ale ich liście mają przeciętnie $4 \pm 1,34$ cm długości oraz $0,8 \pm 0,3$ cm szerokości (Ryc. 3A, B). W Tatrach natomiast (Ryc. 2B), wyróżniono dwa główne typy stanowisk *B. laevigata* subsp. *gracilis*, jedno wilgotne, gdzie

rośliny rosły bujnie i były znacznie większe od roślin występujących na terenie hałdy pogórnicy oraz drugie suche i naskalne, gdzie rośliny pokrojem przypominają rośliny *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia (Ryc. 3C, D). Pleszczotka górską na tych stanowiskach charakteryzowała się bardzo dużą zmiennością wielkości i pokroju. W zależności od warunków siedliskowych (stanowisko suche czy też bardziej wilgotne) średnie długości liści wynosiły odpowiednio 5 ± 2 cm i $9 \pm 3,7$ cm, a średnia szerokość liści $0,9 \pm 0,3$ cm i $1,0 \pm 0,4$ cm. Wykazano jednak, że różnice w wielkości roślin z Bolesławia i Tatr (Ryc. 4) nie są cechą utrwaloną genetycznie. W pierwszym pokoleniu roślin (F1), hodowanych w jednakowych warunkach szklarniowych o optymalnej dla wzrostu wilgotności, rozmiary roślin z obu terenów uległy ujednoczeniu (Ryc. 5). Stwierdzono zatem, że mniejsze rozmiary roślin z hałd galmanowych w porównaniu do roślin z Tatr stanowiły odpowiedź na niekorzystne warunki wilgotnościowe lub obecność metali ciężkich (Pielichowska 2007). Dobrze ilustruje to Rycina 6.

***Biscutella laevigata* – termin kwitnienia**

Kolejnymi cechami różnicującymi rośliny z hałd w Bolesławiu i z Tatr, zależnymi od warunków siedliskowych były terminy kwitnienia i owocowania. Na hałdach *B. laevigata* subsp. *woycickii* zwykle szybko wchodziła w fazę generatywną (maj – czerwiec). Pewna liczba osobników powtarzała kwitnienie we wrześniu – październiku. Natomiast osobniki *B. laevigata* subsp. *gracilis* w Tatrach zwykle później wchodziły w fazę generatywną, zaś termin kwitnienia zależał od wysokości występowania roślin. Zaobserwowano następującą zależność, im wyżej nad poziomem morza znajdowały się rośliny tym później kwitły (w wyższych partiach gór rośliny kwitły w okresie sierpień – wrzesień, a rośliny z dolin w okresie czerwiec – lipiec). Jednak cecha ta nie utrzymała się u roślin potomnych podczas hodowli *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* w szklarni, w jednakowych warunkach. Wszystkie badane rośliny wchodziły w okres kwitnienia jednocześnie, w czerwcu (Pielichowska 2007). A zatem, termin wchodzenia roślin w fazę generatywną jest jedynie cechą wywołaną przez różne warunki siedliskowe, natomiast nie jest to cecha utrwalona genetycznie.

Cechy podgatunków *B. laevigata* utrwalone genetycznie

W ramach badań nad *B. laevigata* (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017, 2020), wykazano szereg cech genetycznie utrwalonych, różnicujących osobniki *B. laevigata* subsp. *woycickii* z łańdy galmanowej w Bolesławiu i osobniki *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr. Różnice te obserwowano zarówno u roślin z naturalnych stanowisk pokolenia rodzicielskiego (F0), jak i roślin z pierwszego pokolenia potomnego (F1), które były hodowane w szklarni. Wykazano następujące różnice pomiędzy przedstawicielami obu podgatunków:

- gęstość pokrycia liści włoskami epidermalnymi – włoski epidermalne zajmowały dużą powierzchnię liści u *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia (zwykle 75–100% pokrycia), zaś małą u *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr (zwykle 5–50% pokrycia) (Ryc. 7),
- pokrycie liści warstwą wosku – mniejsze u roślin z Bolesławia i większe u roślin z Tatr,
- grubość blaszki liściowej – blaszka liściowa była cieńsza u *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia (około 0,03 mm) niż u *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr (około 0,045 mm), różnica średnio o 0,015 mm, istotna statystycznie. Zaobserwowano, że zwiększona grubość blaszki liściowej u pleszczotki górskiej z Tatr wynika ze zwiększenia rozmiarów komórek miękiszu palisadowego przy stałej liczbie komórek w miękiszu palisadowym roślin z obu podgatunków (Ryc. 8),
- barwa liści – jasnozielona u pleszczotki górskiej z Bolesławia (52% roślin) i ciemnozielona u tej z Tatr (74% roślin) (Ryc. 3, 5, 9). Zawartość chlorofilu była jednakowa u obu podgatunków, a przyczyną różnic koloru liści była różnica w grubości blaszek liściowych,
- wielkość nasion i siła ich kiełkowania – nasiona były mniejsze o 50% u pleszczotki górskiej z Bolesławia (średni ciężar $1,8 \pm 0,1$ mg) niż u tej z Tatr (średni ciężar $3,0 \pm 0,2$ mg), co wykazano zarówno dla roślin z pokolenia rodzicielskiego (naturalne stanowiska), jak i roślin potomnych (szklarnia) (Ryc. 10).

Siła kiełkowania nasion roślin z Bolesławia i Tatr wynosiła odpowiednio około 70% i 85%, czyli była zbliżona. W obu przypadkach zdolność do kiełkowania nasion utrzymywała się na podobnym poziomie przez kolejne trzy lata,

- tolerancja na metale ciężkie – dla ołowiu i kadmu była wyższa o około 50%, a dla cynku o 90% u *B. laevigata* subsp. *woycickii*, niż u *B. laevigata* subsp. *gracilis* (Ryc. 11),
- rozmnażanie wegetatywne (formy klonalne) (Ryc. 12A, B) – zdolność do wytwarzania rozet potomnych (tzw. ramet) z pączków korzeni (Ryc. 12C–F). Jedna roślina z Bolesławia wytwarzała średnio 4 ± 2 rozety, zaś jedna roślina z Tatr średnio 2 ± 2 rozety.

Dla *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia i *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr obserwowano także pewne podobieństwa, będące cechami gatunkowymi:

- potencjał do hiperakumulacji talu – był na zbliżonym poziomie u obu podgatunków,
- wielkość roślin i kształt liści – w pokoleniach potomnych cechy te były jednakowe u roślin obu podgatunków (Ryc. 5, 6).

Grubość blaszki liściowej i intensywność pokrycia liści włoskami epidermalnymi wiąże się z przystosowaniem do siedlisk kserotermicznych. Przy czym rośliny z łańdy galmanowej w Bolesławiu i te z gór wytworzyły odmienne strategie „radzenia sobie” z warunkami tych siedlisk, m.in. brakami wody i silnym nasłonecznieniem. Liście *B. laevigata* subsp. *woycickii* są cienkie i pokryte licznymi włoskami. Intensywne pokrycie liści włoskami zabezpiecza rośliny z łańd przed nadmierną transpiracją. Z kolei liście *B. laevigata* subsp. *gracilis* są grube, z nielicznymi włoskami, ale za to pokryte grubszą warstwą wosków. Z badań wynika, że grubsze blaszki liściowe u *B. laevigata* subsp. *gracilis*, w porównaniu do subsp. *woycickii*, były skutkiem zwiększenia rozmiarów komórek miękiszu palisadowego. Przy czym liczba komórek w miękiszu palisadowym u obu podgatunków pleszczotki pozostawała stała. Większe komórki miękiszu palisadowego z dużymi wakuolami (gromadzenie wody w tkankach) oraz pokrycie liści grubą warstwą wosków chroni rośliny z Tatr przed nadmierną transpiracją i wysokim promieniowaniem UV, z jakim mamy do czynienia

w górach (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020).

Zarówno pokrój, jak i wielkość roślin na pogórniczych hałdach galmanowych są mniej zróżnicowane niż w roślin tatrzańskich. Można to tłumaczyć dominującymi warunkami kserotermicznymi na całym obszarze hałd. Z kolei, bardzo duże zróżnicowanie morfologiczne pleszczotki górskiej w Tatrach jest spowodowane dużymi różnicami w warunkach siedliskowych między jej stanowiskami (m.in. temperatury powietrza, nasłonecznienia), wynikającymi głównie z różnic w wysokości n.p.m., w nachyleniu i ekspozycji stoku, ważna jest również zmienność w dostępności wody. Jak już wspomniano, różnice w pokroju i wielkości roślin nie utrzymywały się w kolejnym pokoleniu, przy ich hodowli w jednakowych warunkach. Również różnice w terminie kwitnienia są związane z typem siedliska, na którym występuje *B. laevigata*. Na hałdach temperatura powietrza w ciągu roku jest wyższa niż w górach, a zatem okres wegetacji roślin zaczyna się wcześniej, pierwsze kwitnienie występuje w kwietniu i może zostać powtórzone we wrześniu/październiku. Wysoko w górach okres wegetacji zaczyna się później (lipiec–wrzesień) (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017). Kwiaty roślin z Bolesławia i Tatr były jednakowe – miały cztery żółte płatki korony o długość około 4–7 mm. Na przemiennie z płatkami korony występowały krótsze od nich, cztery żółtozielone działki kielicha. Kwiaty były obupłciowe z pojedynczym słupkiem z szyjką i pałeczkowatym znamieniem oraz kilkoma pręcikami (Ryc. 13) (Pielichowska 2007). Z kolei, różnica w wielkości nasion między *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr była już cechą niezależną od siedliska, istotnie różnicującą rośliny z obu podgatunków. Nasiona roślin z Bolesławia były o 50% mniejsze od nasion roślin z Tatr. Była to cecha utrwalona genetycznie (Ryc. 10) (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). Wymienione różnice pomiędzy podgatunkami są bardzo istotne z punktu widzenia ich taksonomii.

Zdolność do tworzenia klonalnych form rozmnażania zapewnia sukces rozrodczy całemu gatunkowi *B. laevigata* na hałdach galmanowych i w górach. Włoski epidermalne u pleszczotki

górskiej pełnią istotną rolę w detoksykacji nadmiaru cynku, ołowiu, kadmu i talu. Należy jednak zaznaczyć, że zwiększona ilość włosków u roślin z Bolesławia, w porównaniu do tych z Tatr jest jednym z możliwych wyjaśnień większej tolerancji *B. laevigata* subsp. *woycickii* na metale ciężkie.

Tolerancja na metale *B. laevigata* (zwłaszcza subsp. *woycickii* z hałdy w Bolesławiu) jest związana z szeregiem mechanizmów umożliwiających detoksykację. Na poziomie całego organizmu, mechanizmy te polegają na usuwaniu metali wraz z najstarszymi liśćmi lub na wspomnianym już gromadzeniu metali we włoskach epidermalnych liści. Natomiast na poziomie komórki polegają one m.in. na odkładaniu metali w wakuoli, ścianach komórkowych i przestworach międzykomórkowych, jak również na syntezie związków chelatujących (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Brzost 2005, Owczarz 2006, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). Zagadnienia te zostaną szerzej omówione w dalszej części rozdziału.

Tolerancja na metale ciężkie *B. laevigata* z Bolesławia i z Tatr

Poznanie przystosowań wykształconych przez rośliny porastające hałdy galmanowe, takie jak *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia, które umożliwiają im wzrost na obszarach metalonasylnych, może ułatwić w przyszłości wykorzystanie tych roślin w procesach fitoremediacji gleb silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi (Muszyńska i in. – Rozdział 7, Wiszniewska i in. – Rozdział 8, niniejszy tom). Wymaga to jednak przeprowadzenia doświadczeń w ściśle kontrolowanych warunkach oraz porównania osobników o wyższej i niższej tolerancji na metale ciężkie. W Zakładzie Ekotoksykologii UW, przeprowadzono właśnie takie eksperymenty (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020). Pozwoliły one zaobserwować różnice między osobnikami *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia i *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr. Najważniejsze wyniki z wymienionych prac przedstawiono poniżej.

Poziom tolerancji na metale ciężkie siewek pleszczotki górskiej z Bolesławia i Tatr badano przy

pomocy korzeniowego testu tolerancji Wilkins'a oraz porównania ich biomasy. Indeks tolerancji (IT) to przyrost długości korzeni roślin traktowanych metalem, wyrażony w procentach kontroli (Wilkins 1957). Rośliny były hodowane w pożywce płynnej Knopa, zaś ich wzrost w roztworach zawierających dany metal trwał 12 dni. Zastosowano następujące stężenia metali ciężkich: 2,5 mg/l ołowiu, 10 mg/l cynku oraz 4 mg/l kadmu. Wykazano, że siewki *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr istotnie różniły się poziomem tolerancji na ołów, cynk i kadm. Stwierdzono podwyższony poziom tolerancji o około 50% na ołów i kadm oraz o 90% na cynk i to w dwóch kolejnych pokoleniach potomnych (F1, F2). U *B. laevigata* subsp. *woycickii* stwierdzono bardzo wysoką tolerancję na ołów w pokoleniu F1 i F2, zatem była ona utrwalona genetycznie. Dla cynku tolerancja siewek roślin z hałdy w Bolesławiu stwierdzona w F1 również utrzymywała się na wysokim poziomie w porównaniu do siewek roślin z Tatr, choć na niższym poziomie niż w przypadku tolerancji na ołów (Ryc. 11). Podobnie wyglądała tolerancja na kadm u siewek roślin z obu podgatunków. Innym, obok testu korzeniowego, wskaźnikiem tolerancji roślin na metale ciężkie jest pomiar biomasy. Po 12 dniach traktowania siewek wymienionymi wyżej metalami ciężkimi, wykonano pomiar ich biomasy. Stwierdzono, że ciężar siewek z pierwszego (F1) i drugiego pokolenia (F2) *B. laevigata* subsp. *woycickii* traktowanych metalami ciężkimi był wyższy niż u roślin *B. laevigata* subsp. *gracilis* (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015).

Badano również dorosłe osobniki *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr pod kątem tolerancji na ołów i kadm. W długoterminowym teście porównano ich wzrost (długość korzeni i liści, pojawianie się nowych korzeni, liczbę liści żywych i uschniętych). Podczas tego eksperymentu do roztworów hodowlanych dodawano co 3 tygodnie coraz wyższe stężenia ołowiu lub kadmu: 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l i 16 mg/l. Po 12-tygodniowym okresie inkubacji roślin z metalami, pozostawiono je jeszcze na 3 tygodnie w pożywce bez metali, aby zaobserwować, czy występuje u nich zdolność do regeneracji. W ramach tych badań wykazano, że osobniki *B. laevigata* subsp. *woycickii* przez cały okres trwania

eksperymentu wytwarzały nowe korzenie i to we wszystkich badanych stężeniach ołowiu (Ryc. 14). Natomiast u roślin z Tatr nowe korzenie pojawiały się tylko przez pierwsze dwa tygodnie. Następnie rozwój korzeni został zahamowany. Rośliny z Bolesławia traktowane ołowiem, charakteryzowały się także intensywniejszym przyrostem nowych liści w porównaniu do roślin z Tatr. Na roślinach z obu podgatunków pojawiały się także uschnięte liście, przy czym więcej ich było u roślin z Tatr, co wskazuje na ich powolne zamieranie. W przypadku traktowania *B. laevigata* kadmem, rośliny z Bolesławia i Tatr wytwarzały nowe korzenie w pierwszych tygodniach trwania eksperymentu, przy niskich stężeniach tego pierwiastka (2 mg/l i 4 mg/l kadmu). Następnie, wraz ze wzrostem stężeń kadmu w pożywce (8 mg/l i 16 mg/l), u roślin z Bolesławia następował spadek liczby nowych korzeni, zaś u roślin z Tatr zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu nowych korzeni. Wykazano także, że po traktowaniu kadmem, przyrost liczby nowych, żywych liści był wyższy u *B. laevigata* subsp. *woycickii*, w porównaniu z roślinami *B. laevigata* subsp. *gracilis*. Po zaprzestaniu inkubacji roślin z badanymi metalami stwierdzono, że te z hałd galmanowych mają silniejszą zdolność regeneracji niż te z Tatr.

Podsumowując, wykazano, że *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia, zarówno w fazie siewki, jak i w fazie dojrzałości wegetatywnej, charakteryzuje się podwyższoną tolerancją na metale ciężkie (ołów, cynk i kadm), w porównaniu z *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr (Pielichowska 2007).

Stężenie metali i ich translokacja u *B. laevigata*

Podczas eksperymentalnej hodowli roślin w pożywkach płynnych z dodatkiem metali zbadano stężenie metali ciężkich w siewkach i dorosłych roślinach *B. laevigata* subsp. *woycickii* z hałd z Bolesławia i subsp. *gracilis* z Tatr. Badania te pokazały, jaka jest intensywność pobierania i translokacja metali u tych roślin. W eksperymentach wykorzystano siewki (pokolenie F1 i F2) oraz 2,5-miesięczne dorosłe rośliny (pokolenie F1) inkubowane przez 12 dni (doświadczenie krótkoterminowe) w roztworach z metalami ciężkimi o stężeniach: 2,5 mg/l ołowiu, 10 mg/l cynku oraz 4 mg/l kadmu.

Porównano pobieranie metali przez siewki i dorosłe rośliny *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr oraz stężenia metali w roślinach. Stwierdzono, że ołów pobierany był w mniejszych ilościach przez siewki niż rośliny dorosłe. W korzeniach siewek zawartość ołowiu dochodziła do 2500 mg/kg s.m., a u roślin dorosłych do 10 000 mg/kg s.m. W częściach nadziemnych siewek stężenie ołowiu było wyższe (około 180 mg/kg s.m.), w porównaniu do stężenia tego pierwiastka u roślin dojrzałych (około 20 mg/kg s.m.). Z kolei cynk także był akumulowany w różnym stopniu przez siewki i rośliny dorosłe. Stwierdzono, że korzenie siewek *B. laevigata* subsp. *woycickii* miały istotnie wyższe stężenie cynku niż korzenie siewek *B. laevigata* subsp. *gracilis* – odpowiednio około 9000 i 5000 mg/kg s.m. W przypadku roślin z Bolesławia, istotnie wyższe stężenie cynku stwierdzono w częściach nadziemnych siewek (około 3000 mg/kg s.m.) niż częściach nadziemnych roślin dojrzałych (około 1800 mg/kg s.m.). Wykazano wyższy transport metali do części nadziemnych przez siewki, w porównaniu z roślinami dojrzałymi (Pielichowska 2007).

W przypadku dorosłych roślin (F1), ołów, cynk i kadm gromadzone były głównie w ich korzeniach. Nie wykazano istotnych różnic w gromadzeniu tych metali w korzeniach pomiędzy roślinami z Bolesławia i Tatr. Korzenie w największym stopniu gromadziły ołów, następnie cynk, a w najmniejszym kadm. Zaobserwowano także, że *B. laevigata* gromadziła metale zarówno w liściach dojrzałych, jak i usychających. Transport badanych pierwiastków do części nadziemnych był zróżnicowany i zależał zarówno od rodzaju pierwiastka, jak i pochodzenia roślin. Większą translokację cynku i kadmu do części nadziemnych zaobserwowano u roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii* niż u subsp. *gracilis* z Tatr. W przypadku ołowiu transport do części nadziemnych był bardzo słaby i jednakowy dla roślin obu podgatunków (Pielichowska 2007).

Charakterystyka podłoża galmanowego

Podłoże hałdy cynkowo-ołowiowej w Bolesławiu nie jest jednorodne. Jest to odpad pogórnicy będący mieszaniną różnie rozdrobnionych i w różnym stopniu zwietrzałych odpadów z wydobywania rud o zmiennej zawartości pierwiastków

(Brunarska i Szarek-Łukaszevska – Rozdział 2, niniejszy tom). Do eksperymentów prowadzonych w naszym laboratorium użyliśmy podłoża galmanowego pobranego ze starej hałdy w Bolesławiu w trzech miejscach. Następnie pobrane podłoże zostało wymieszane i usunięto z niego kamienie. Stężenie pierwiastków w podłożu galmanowym pokazuje Tabela 1. Dla porównania wykonano badania gleby ogrodniczej. Zbadano stężenie zarówno metali ciężkich, jak również pierwiastków odżywczych (Tabela 1).

Porównując skład podłoża galmanowego z glebą ogrodniczą, widoczne są bardzo wysokie stężenia metali ciężkich w podłożu galmanowym. W przypadku cynku różnice między podłożem galmanowym a glebą ogrodniczą są wyższe o cztery rzędy wielkości. W przypadku ołowiu, kadmu i talu różnice te są wyższe o dwa rzędy wielkości (Tabela 1). Należy podkreślić, że ilość metali dostępna w glebie dla roślin mieściła się w granicach kilku procent ich całkowitej zawartości. Ciekawie przedstawiają się stężenia pierwiastków odżywczych. Podłoże galmanowe w porównaniu do gleby ogrodniczej zawierało podwyższone ilości: wapnia (5 razy więcej), magnezu (3 razy), potasu (7 razy) i żelaza (133 razy). Natomiast znamieną jest niska zawartość azotu w podłożu galmanowym. Było go 19 razy mniej niż w glebie ogrodniczej (Tabela 1). Azot w glebie jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Bez wątpliwości nazbyt niska ilość azotu w podłożu galmanowym była jednym z podstawowych czynników limitujących skład flory galmanowej oraz limitujących wzrost roślin. Ilość węgla również była mniejsza w podłożu galmanowym niż w glebie ogrodniczej – 6-krotnie. Wynika to jednak z faktu niewielkiej ilości biomasy roślin w podłożu galmanowym. Odczyn podłoża galmanowego wynosił 7,81, podczas gdy odczyn gleby ogrodniczej wynosił 4,97 (Tabela 1).

Wyniki przeprowadzonej analizy pokazują, jak nietypowy skład ma podłoże galmanowe w porównaniu z glebą ogrodniczą. Biorąc pod uwagę te wyniki zadziwiający jest fakt, że rośliny są zdolne do zasiedlania tak trudnego dla wzrostu podłoża. Jak pokazuje następny podrozdział, takie możliwości posiada pleszczotka górską – a nawet wykazuje pewną skłonność do stymulacji wzrostu na takim podłożu.

Wzrost *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* w podłożu galmanowym

Podczas badania tego niezwykle ciekawego gatunku często zadawaliśmy sobie pytanie, czy rośliny pochodzące z Tatr będą również rosły na podłożu z hałdy w Bolesławiu? Aby to sprawdzić przeprowadziliśmy hodowlę obu podgatunków pleszczotki w podłożu galmanowym (pokolenie F1). Kontrolą były rośliny hodowane w ziemi ogrodniczej. Do obu typów podłoży przesadzono rośliny w różnym wieku: 2-tygodniowe siewki, rośliny 1-miesięczne, 2-miesięczne oraz 10-miesięczne dojrzałe rośliny. Hodowlę roślin prowadzono przez okres 5 miesięcy. Okazało się, że zarówno osobniki *B. laevigata* subsp. *woycickii*, jak i *B. laevigata* subsp. *gracilis* dobrze rosną w podłożu galmanowym, osiągając zbliżone rozmiary (Ryc. 15).

Najbardziej wrażliwe na wzrost w podłożu galmanowym były rośliny najmłodsze, tj. przesadzone do tego podłoża w fazie siewki. Wzrost siewek w podłożu galmanowym był praktycznie całkowicie zahamowany, w jednakowym stopniu u obu podgatunków pleszczotki górskiej. Po okresie 2,5 miesiąca większość siewek w podłożu galmanowym zaczęła zamierać. W obu przypadkach przeżyło jedynie 10% siewek. Rośliny 1-miesięczne, po okresie 5 miesięcy hodowli w podłożu galmanowym, osiągały wielkość około 20–50% roślin kontrolnych. Rośliny *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia charakteryzował lepszy wzrost niż rośliny subsp. *gracilis* z Tatr. W tej fazie wzrostu w największym stopniu zaznaczyły się różnice między oboma podgatunkami w tolerancji na podłoże galmanowe (Ryc. 16A). Natomiast rośliny przesadzone w wieku dwóch miesięcy, po 5 miesiącach wzrostu na podłożu galmanowym, osiągały od 70% do 160% kontroli. Gdy do podłoża galmanowego przesadzono rośliny najstarsze 10-miesięczne (dojrzałe rośliny) rośliny te uzyskiwały przeciętnie większe rozmiary niż rośliny kontrolne – od 105% do 160% kontroli po 5 miesiącach ich hodowli. Zwykle największe rozmiary osiągał subsp. *woycickii*. Zatem, przeprowadzone badania wskazały na bardzo dużą różnicę we wrażliwości roślin *B. laevigata* obu podgatunków w zależności od ich wieku, na wzrost w podłożu galmanowym. Dla roślin w fazie siewki (z obu podgatunków) podłoże galmanowe było

toksyczne dla większości siewek. Natomiast im starsze rośliny, tym ich wzrost w podłożu galmanowym był łatwiejszy. W przypadku najstarszych roślin (2- i 10-miesięcznych) dochodziło nawet do stymulacji ich wzrostu na podłożu galmanowym, ale w większym stopniu u podgatunku *woycickii* (Ryc. 15). Wynik ten wskazuje na wysoką tolerancję dojrzałych osobników *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* na wzrost w podłożu galmanowym. W ten sposób wykazano, że rośliny z Tatr posiadają wystarczającą odporność na metale i mogą rosnąć na podłożu galmanowym, jeśli przetrwają fazę siewki (naturalna selekcja). Podgatunek *woycickii* wykazuje jednak lepsze przystosowanie do wzrostu w podłożu galmanowym (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015).

Pobieranie metali z podłoża galmanowego przez *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis*

W ramach powyższego doświadczenia, u roślin hodowanych w warunkach laboratoryjnych w podłożu galmanowym, sprawdzono również zawartość metali, które zwykle występują w galmanie: ołowiu, cynku, kadmu i talu. Po 5 miesiącach hodowli, rośliny rosnące na podłożu galmanowym, zarówno te z Bolesławia jak i z Tatr, zawierały w swoich tkankach około: 700 mg/kg s.m. ołowiu, 8000 mg/kg s.m. cynku, 75 mg/kg s.m. kadmu oraz 70 mg/kg s.m. talu. Te wysokie stężenia metali świadczą o dużych zdolnościach gatunku do gromadzenia tych pierwiastków w tkankach, przy braku objawów ich toksycznego działania, czyli o wysokiej tolerancji roślin na metale ciężkie (Wierzbicka i in. 2015).

Porównując powyższe wyniki z pobieraniem metali przez osobniki subsp. *woycickii*, rosnące w warunkach naturalnych na hałdach galmanowych w Bolesławiu, można zauważyć zaskakującą różnicę. Otóż rośliny rosnące na hałdzie galmanowej zawierały w swoich tkankach 2–3 razy mniej metali w porównaniu z roślinami hodowanymi w laboratorium, również w podłożu galmanowym. Dla przykładu rośliny z hałdy zawierały: do 240 mg/kg s.m. ołowiu, do 2618 mg/kg s.m. cynku oraz do 35 mg/kg s.m. kadmu (Pielichowska 2007). Nie spodziewaliśmy się takiego wyniku,

ponieważ czas wzrostu roślin pleszczotki górskiej na hałdzie był wielokrotnie dłuższy (roślina wieloletnia), w porównaniu z naszym eksperymentem (5 miesięcy). Sądziliśmy, że rośliny rosnące na hałdzie zawierają więcej metali niż rośliny hodowane w laboratorium – okazało się, że jest odwrotnie. Podłoże galmanowe w obu przypadkach miało podobny skład. A zatem, co było powodem tak znacznego zwiększenia pobierania metali podczas ich eksperymentalnej hodowli w galmanie? Różnica była tylko jedna. W warunkach eksperymentalnych rośliny były stale podlewane, aby zapewnić im optymalny wzrost. Natomiast w warunkach naturalnych (hałda) najczęściej panują warunki deficytu wody. Jak widać, susza zmniejsza dostępność metali dla roślin. Oznacza to, że w warunkach nadmiernych ilości opadów, dużo większa ilość metali będzie pobierana przez rośliny, a przez to będą one włączane w obieg biologiczny, co jest bardzo niekorzystnym zjawiskiem. Obniżenie odczynu podłoża galmanowego znacznie zwiększy dostępność metali dla roślin.

Występuje również różnica w pobieraniu metali zależna od wieku roślin, w warunkach gdy przesadzano do podłoża galmanowego rośliny w różnym wieku (2-tygodniowe siewki, rośliny 1-miesięczne, 2-miesięczne oraz 10-miesięczne dojrzałe rośliny) i hodowano je w nim przez okres 5 miesięcy. U *B. laevigata* subsp. *woycickii* i *B. laevigata* subsp. *gracilis* pobieranie i transport cynku, ołowiu i kadmu było wyższe u roślin młodych (siewki, rośliny 1- i 2-miesięczne), w porównaniu z roślinami najstarszymi (10-miesięcznymi). Różnice te były 3-, 4-krotne i istotne statystycznie. Translokacja ołowiu, cynku i kadmu z korzeni do części nadziemnych była stosunkowo wysoka we wszystkich badanych kombinacjach. Przykładowo, dla 10-miesięcznych roślin, po 5 miesiącach hodowli w glebie galmanowej translokacja metali z korzeni do części nadziemnych wynosiła 60–70% dla ołowiu, 80% dla cynku i 40–50% dla kadmu.

W przypadku czwartego z badanych metali – talu, wykazano, że był on pobierany zarówno przez pleszczotkę górską z Bolesławia jak i z Tatr. Tal gromadzony był w największym stopniu przez siewki (osiągał stężenie średnio 219 mg/kg s.m.), a w znacznie mniejszym stopniu przez rośliny starsze – 1-, 2- i 10-miesięczne (osiągał stężenie średnio

43 mg/kg s.m.). Wśród tych starszych roślin nie stwierdzono istotnych różnic w ilości talu akumulowanego przez korzenie i transportowanego do części nadziemnych, w zależności od ich wieku. Stężenie talu w korzeniach było niskie w porównaniu ze stężeniem tego pierwiastka w częściach nadziemnych, gdzie stwierdzono około 85% całkowitej zawartości talu w roślinie, we wszystkich grupach wiekowych roślin z Bolesławia i Tatr (Pieliuchowska 2007, Wierzbicka i in. 2015).

Omówione dotąd badania pokazują, że większa wrażliwość na metale siewek niż roślin dorosłych spowodowana jest tym, że pobierały one kilkukrotnie więcej pierwiastków niż rośliny dorosłe. Zastanawiano się więc, w jaki sposób dochodzi do utrzymania gatunku *B. laevigata* i rozwoju osobników dojrzałych, które tak licznie występują na hałdzie galmanowej w Bolesławiu, jeśli faza siewki tych roślin jest tak wrażliwa na wzrost w podłożu galmanowym? Wydaje się, że odpowiedzią na to pytanie jest zdolność tego gatunku do tworzenia klonalnych form rozmnażania wegetatywnego (Ryc. 12). W wyniku selekcji siewek, do dalszego wzrostu zdolne są nieliczne rośliny (5–10%). Zagadnienie to zostało szerzej omówione w podrozdziale „Przystosowania roślin do obecności metali ciężkich w podłożu”. Warto w tym miejscu jeszcze raz podkreślić, że wytwarzanie klonalnej formy rozmnażania wegetatywnego było bardziej efektywne u osobników *B. laevigata* subsp. *woycickii* niż u osobników *B. laevigata* subsp. *gracilis* (Pieliuchowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017). Oznacza to, że przy próbach rekultywacji świeżych hałd cynkowo-ołowiowych, najkorzystniejszymi sposobami działania będzie wysianie bardzo dużej liczby nasion, ponieważ tylko kilka procent roślin zdoła przejść fazę siewki, lub też przesadzanie roślin starszych, przynajmniej 2-miesięcznych.

Tolerancja na metale ciężkie roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* w porównaniu do tolerancji innych gatunków roślin

Zastanawiające jest, czy tolerancja na metale ciężkie u *B. laevigata* jest wyjątkowo wysoka w porównaniu do tolerancji innych gatunków

roślin? W przypadku roślin porastających łądy, charakteryzujących się tolerancją indukowaną (nabytą) na metale ciężkie, badania (Wierzbicka 1999) pokazały, że gatunki o najwyższej tolerancji na ołów można uszeregować w następujący sposób począwszy od gatunków najmniej tolerancyjnych: *Leontodon hispidus* L. < *B. laevigata* < *S. vulgaris*.

Co zaś w przypadku tolerancji konstytucjonalnej (wrodzonej)? Przeprowadzono badania porównawcze dla większej liczby gatunków roślin uprawnych i dzikich. Wykazały one, że najwyższą tolerancję na ołów wykazują jęczmień i kukurydza, a spośród roślin łądowych wspomniane już – *S. vulgaris* i *B. laevigata* (Wierzbicka 1999). Niższy poziom tolerancji wykazały pszenica, groch, ogórek, łubin i rzodkiewka, najniższy zaś fasola, rzepak i soja. W Zakładzie Ekotoksykologii Wydziału Biologii UW podjęto także badania, mające na celu porównanie poziomu tolerancji na kadm roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis*, w odniesieniu do trzech gatunków roślin uprawnych: ogórka (*Cucumis sativus* L.), fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) (Brzost 2005). Wykazano, że już dawka 2,5 mg/l kadmu powoduje zahamowanie przyrostu długości korzeni roślin traktowanych tym metalem, w porównaniu do roślin kontrolnych. Działanie inhibycyjne kadmu było jednak różne dla różnych gatunków. Wyliczone wartości indeksu tolerancji Wilkins'a (Wilkins 1957) pozwoliły określić poziom tolerancji badanych gatunków na kadm i podzielić te gatunki na trzy grupy roślin: o najwyższej tolerancji – *C. sativus* i *Z. mays* (indeks tolerancji roślin na kadm utrzymywał się tu na poziomie około 60%), o średniej tolerancji – *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* (indeks tolerancji roślin na kadm utrzymywał się tu na poziomie około 40%) oraz o niskiej tolerancji – *P. vulgaris* (indeks tolerancji roślin na kadm wynosił tu średnio 10%) (Ryc. 17). Stężenie kadmu w korzeniach badanych gatunków roślin było najwyższe w przypadku *Z. mays* i wynosiło 1936 mg/kg s.m., mniej tego pierwiastka gromadził *C. sativus*. Średnie wartości zanotowano u *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis*. Najmniej kadmu w korzeniach gromadziła *P. vulgaris* – zaledwie 1056 mg/kg s.m. W częściach nadziemnych roślin zawartość kadmu była najwyższa u *B. laevigata* subsp. *woycickii* – 2039 mg/kg s.m.,

a o połowę mniej tego pierwiastka gromadziła *B. laevigata* subsp. *gracilis* – 1048 mg/kg s.m. U pozostałych gatunków stężenie kadmu w częściach nadziemnych wynosiło od 290 mg/kg s.m. do 1337 mg/kg s.m. (Ryc. 18). Wyniki te wskazują, że największy transport kadmu do części nadziemnych zachodził w siewkach *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia. Dowodzi to, że różnice w tolerancji poszczególnych gatunków nie były związane z ilością kadmu w roślinach. Czyli wynikały z procesów wewnętrznych, specyficznych dla danego gatunku.

Gdybyśmy chcieli uszeregować badane gatunki zgodnie z poziomem wykazywanej tolerancji od najmniej do najbardziej tolerancyjnych na kadm, to taki szereg wyglądałby następująco: *P. vulgaris* < *B. laevigata* subsp. *gracilis* < *B. laevigata* subsp. *woycickii* < *Z. mays* < *C. sativus*. Istotnym jest przy tym fakt, że wystąpiła różnica w tolerancji na kadm pomiędzy *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr. Rośliny *B. laevigata* subsp. *woycickii* wykazały podwyższoną tolerancję na kadm o około 20%, w porównaniu do pleszcotki górskiej z Tatr (Wierzbicka 1999, Brzost 2005).

Otrzymane wyniki wskazują, że tolerancja na ołów i kadm jest dość przeciętna u roślin pleszcotki górskiej, w porównaniu z innymi gatunkami roślin. Wynik ten był dla nas zaskoczeniem. Dlaczego zatem kukurydza o najwyższej tolerancji na badane metale nie rośnie na łądach?

Cynkolubność jako tajemnica *B. laevigata*

Rośliny metalolubne bez przeszkód rozwijające się w środowisku, w którym stężenia metali ciężkich w glebie wielokrotnie przekraczają dopuszczalne normy, są tematem wielu prac badawczych. Jak już wiemy, do takich roślin należy m.in. bohaterka tej książki pleszcotka górską, która występuje licznie na łądzie odpadów górniczych z wydobycia rud cynku i ołowiu w Bolesławiu. W wielu pracach zwracano uwagę na zdumiewające występowanie tego gatunku na terenie Polski. Gatunek ten występuje w Tatrach, ale również na niżu, wyłącznie na łądach w Bolesławiu. Według Szafera (1927) jest to plejstoceniński relikw z epoki glacialnej na niżu polskim. Fakt ten potwierdziły badania genetyczne

(Wąsowicz i in. 2014), omówione w poprzednim rozdziale (Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 5, niniejszy tom). Nadal jednak niewyjaśnione pozostaje, tak bardzo zagadkowe, rozmieszczenie roślin tego gatunku na obszarze naszego kraju. Z jakiej przyczyny rośliny te występują na izolowanych stanowiskach, w dużej odległości od siebie (ok. 100 km)? Przez wiele lat zadawano sobie to pytanie.

Wiadomym jest, że *B. laevigata* charakteryzuje się przystosowaniami do suchych i silnie nasłonecznionych siedlisk (kserotermicznych), o czym pisano na początku tego rozdziału. Jest rośliną światłolubną, dobrze znosi deficyty wody. Preferuje podłoża zasobne w wapń (Dobrzańska 1955) – zatem, co stało na przeszkodzie szerszemu zakresowi występowania tego gatunku zarówno w Polsce, jak i w Europie?

Wydaje się, że główną przyczyną jest obecność cynku w podłożu i to w wysokich stężeniach. W glebie łądy w Bolesławiu stężenie cynku jest bardzo wysokie, ponad 50 000 mg/kg, podobnie wysokie jest stężenie żelaza, ponad 55 000 mg/kg. Natomiast stężenie ołowiu wynosi tu około 3100 mg/kg, a kadmu 180 mg/kg (Niklińska i Szarek-Łukaszewska 2002). Pochodzenie tych metali jest łatwe do wyjaśnienia. łądy powstały w wyniku działań górniczych, są to odpady pozostające po wydobyciu rud cynku i ołowiu (Włodarz – Rozdział 1, Brunarska i Szarek-Łukaszewska – Rozdział 2, niniejszy tom). W Tatrach jednak, gdzie także występuje *B. laevigata*, nie spodziewano się podwyższonych stężeń metali ciężkich. Godzik (1984), a później Babst-Kostecka i in. (2016) stwierdzili, że na stanowisku w Tatrach (np. w Dolinie Małej Łąki) podłoże zawiera zaskakująco wysokie stężenie cynku, ponad 300 mg/kg. Poza nadmiernymi ilościami cynku występuje tam również ołów w stężeniu nawet ponad 200 mg/kg.

Okazało się, że głównym źródłem podwyższonego stężenia metali ciężkich w Tatrach było wydobycie rud metali w ubiegłych wiekach (Miechówka i in. 2002). W Tatrach znajdowały się huty żelaza, które były czynne z przerwami do 1878 r. Pozostałością po tej działalności są niektóre nazwy dzielnic Zakopanego (głównego miasta u podnóża Tatr), np. Kuźnice – nazwa ta pochodzi od słowa kuźnia, czyli budynku przeznaczonego do prac kowalskich. Dawniejsza nazwa tej dzielnicy to Huty Hamerskie.

Pojawiła się ona w zapisach historycznych w 1766 r. Należy teraz uzasadnić, dlaczego uznajemy cynk za główną przyczynę tak ciekawego występowania w Polsce roślin *B. laevigata*.

W badaniach laboratoryjnych autorów tego rozdziału, porównano tolerancję na cynk roślin *B. laevigata* z tolerancją innych gatunków roślin: fasoli (*P. vulgaris*), ogórka (*C. sativus*) i kukurydzy (*Z. mays*) (Owczarz 2006). Badane były rośliny w fazie siewki. Hodowane przez 11 dni w pożywce mineralnej z dodatkiem cynku w postaci $ZnCl_2$ (8 mg/l). Przez ten czas mierzono wzrost roślin (korzeni i pędów). W identyczny sposób hodowano rośliny kontrolne (bez dodatku nadmiaru cynku do pożywki). Końcowe wyniki pokazuje Rycina 19. Wykazano, że *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia nadzwyczaj dobrze tolerowała nadmiar cynku. Tolerancja tych roślin wyrażona w procentach kontroli wynosiła 200%. Oznacza to silną stymulację ich wzrostu w obecności cynku. Natomiast nieco niższą tolerancję wykazała *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr – około 100–150% kontroli. Również ta wartość oznacza stymulację wzrostu roślin spowodowaną przez cynk. Pozostałe trzy gatunki roślin znacznie gorzej znosiły obecność nadmiaru cynku w pożywce. Poziom ich tolerancji wynosił od 20 do 80% kontroli, co oznacza, że podana dawka cynku była dla nich toksyczna, jednak nie była śmiertelna. Badane gatunki pod względem tolerancji na cynk można było uszeregować w następującej kolejności, zaczynając od roślin najmniej tolerancyjnych: *C. sativus* < *P. vulgaris* < *Z. mays* < *B. laevigata* subsp. *gracilis* < *B. laevigata* subsp. *woycickii* (Owczarz 2006).

Dane przedstawione powyżej jednoznacznie wskazują na niezwykle wysoki poziom tolerancji na cynk pleszczotki górskiej, przy czym *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia była silnie stymulowana do wzrostu przez ten pierwiastek. Charakteryzował ją dwukrotnie większy wzrost korzeni w porównaniu do kontroli. *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr również osiągały większą długość korzeni, ale maksymalnie były one większe o 50% w stosunku do kontroli. Rośliny uprawne, które stanowiły punkty odniesienia dla roślin *B. laevigata*, były dobrane zgodnie ze znajomością ich tolerancji na metale ciężkie. Wiadomo, że kukurydza dobrze znosi nadmiar metali ciężkich w glebie, a ogórek

i fasola – gorzej (Wierzbicka 1999). W ten sposób mogła powstać skala porównawcza poziomu tolerancji roślin na cynk. Takie porównanie pozwoliło wykazać niezwykle wysoką tolerancję na cynk gatunku *B. laevigata*, a szczególnie – osobników *B. laevigata* subsp. *woycickii* pochodzących z łąki w Bolesławiu. Wysoką tolerancję na cynk u całego gatunku *B. laevigata* potwierdzają także badania Babst-Kosteckiej i in. (2016).

Zastanawiano się również, jak duże ilości cynku zdołają pobrać badane rośliny do swoich tkanek. Wyniki jednoznacznie wskazały na cynkolubność *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr. Stężenie cynku w tkankach badanych roślin było bardzo wysokie. Stężenie cynku w korzeniach roślin traktowanych cynkiem było największe u *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia i wynosiło 20 287 mg/kg s.m. Ponad połowę mniej tego pierwiastka gromadziła w korzeniach *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr (10 005 mg/kg s.m.) i *Z. mays* (10 445 mg/kg s.m.). Najniższe wartości stężeń stwierdzono w *P. vulgaris* (4167 mg/kg s.m.) oraz *C. sativus* (4488 mg/kg s.m.). Z kolei, w częściach nadziemnych roślin traktowanych cynkiem zawartość tego pierwiastka była najwyższa u *C. sativus*, wynosiła 3752 mg/kg s.m., niższe stężenia zanotowano u *B. laevigata* z Bolesławia i z Tatr (odpowiednio 2093 i 2278 mg/kg s.m.) oraz *P. vulgaris* (2147 mg/kg s.m.). Najmniej cynku, 1306 mg/kg s.m., stwierdzono w częściach nadziemnych *Z. mays*. Wyniki te wskazują, że największy transport cynku do części nadziemnych zachodził w roślinach *C. sativus*. U *B. laevigata* z Bolesławia i Tatr również utrzymywał się na wysokim poziomie (Owczarz 2006, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

W ten sposób wykazano, że wzrost *B. laevigata* z łąki w Bolesławiu i z Tatr był stymulowany poprzez obecność cynku w pożywce, i że gromadził się on w ich tkankach w bardzo dużych ilościach. Natomiast na wzrost pozostałych badanych gatunków pierwiastek ten działał hamująco, chociaż rośliny te w tkankach zawierały niższe stężenia cynku. Można więc stwierdzić, że *B. laevigata* jest rośliną nie tylko „cynko-znośną” (czyli dobrze tolerującą nadmiar cynku (Przedpeńska-Wąsowicz i in. 2012), ale wręcz cynkolubną (czyli lepiej rozwijającą się przy nadmiarach cynku) (Owczarz 2006, Przedpeńska-Wąsowicz i in. 2012, Wierzbicka

i in. 2015, 2017). Cecha ta najmocniej wystąpiła u *B. laevigata* subsp. *woycickii*. W warunkach naturalnych taka cecha gatunkowa jest niezwykle przydatna. Obecność cynku w podłożu ogranicza wzrost wielu gatunków roślin. Tak się nie dzieje w przypadku *B. laevigata*. W warunkach nadmiaru tego pierwiastka w podłożu, działa on wręcz stymulująco na jej wzrost – niczym „super witamina”, podczas gdy dla innych gatunków jest po prostu trucizną. Dlatego nasz tytułowy gatunek może zwyciężać z innymi roślinami w konkurencji o siedlisko. W ten sposób, jako gatunek pionierski może zasiedlić podłoże wzbogacone w cynk. Cecha ta może wyjaśniać występowanie *B. laevigata* w Polsce, w Tatrach i na łąkach cynkowo-olowiowych w Bolesławiu. Na obu tych stanowiskach stwierdzono nadmiar cynku w podłożu. Natomiast na innych terenach, gdzie nie stwierdzono podwyższonych stężeń cynku w podłożu pleszczotka górską przegrywa konkurencję o siedlisko. Z tego samego powodu, czyli zbyt niskiej tolerancji na cynk, np. wspomniana wcześniej kukurydza nie będzie zdolna do wzrostu na łąkach cynkowo-olowiowych.

Powstaje następne pytanie – czy nadmiar cynku w glebie jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju *B. laevigata*. Okazuje się, że ten gatunek dobrze rośnie i kwitnie również w glebie ogrodniczej, o typowej zawartości cynku. Rycina 20 pokazuje jak znaczne rozmiary (wysokość 80 cm, szerokość 40 cm) może osiągnąć pleszczotka górską w komfortowych warunkach podczas wzrostu w glebie ogrodniczej (hodowla w ogrodzie) (Pielichowska 2007). Również inni badacze wskazują, że pleszczotka górską może występować w Tatrach na stanowiskach o „normalnej” zawartości cynku (Babst-Kostecka i in. 2016). Cynkolubność *B. laevigata* jest zatem atutem w warunkach konkurencji z innymi gatunkami roślin.

Pozostaje jeszcze pytanie: co leży u podstawy tego szczególnego procesu, jakim jest cynkolubność *B. laevigata*? Do odpowiedzi na to pytanie zbliżają nas wyniki badań nad specją cynku – czyli związkami chemicznymi, w jakich cynk był obecny w tkankach pleszczotki górskiej. Badania przeprowadzono najnowszymi metodami chemii analitycznej, z zastosowaniem złożonego układu chromatograficznego – wielowymiarowej

chromatografii SE/HILIC ICP-MS. Na podstawie uzyskanych widm stwierdzono, że cynk występuje w roślinach w połączeniu kompleksowym z nikotianaminą (Ryc. 21) (Pielichowska 2007, Wierzbička i in. 2015, 2017). Jest to jeden z mechanizmów tolerancji na metale ciężkie, omawiany szerzej na początku tego rozdziału. Znamienne jest to, że nie stwierdzono innego mechanizmu tolerancji na metale, mianowicie występowania kompleksów metali z fitochelatynami, którego spodziewano się na podstawie wyników innych badaczy (Przedpeńska-Wąsowicz i in. 2012). Nikotianamina odgrywa istotną rolę w tolerancji roślin na metale, w szczególności na cynk. Posiada właściwości wiązania metali, może brać udział w załadunku i rozładunku floemu (Stephan i Scholz 1993). U roślin hiperakumulujących cynk, m.in. *A. halleri* wykazano obecność genów kodujących syntazę nikotianaminy (Weber i in. 2004). Na poziomie komórkowym, kompleksy metalu z nikotianaminą usuwane są z cytoplazmy do wakuoli, gdzie następuje ich izolacja i tym samym proces detoksykacji. Nikotianamina odgrywa także istotną rolę w transporcie takich pierwiastków, jak: cynk, miedź, żelazo, nikiel czy mangan (Takahashi i in. 2003, Kim i in. 2005). Obecność nikotianaminy w kompleksowym połączeniu z cynkiem w odpowiedzi na podwyższone stężenie cynku w *B. laevigata*, bez wątplenia związana jest ze zjawiskiem cynkolubności tego gatunku i może stanowić klucz do zagadki występowania *B. laevigata* na hałdach galmanowych w Bolesławiu, jak i w Tatrach (Wierzbička i in. 2015, 2017).

Detoksykacja metali ciężkich w komórkach – mechanizm kompartmentacji

Jak wykazały badania autorów niniejszego rozdziału, spośród wszystkich organów, korzenie *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia i subsp. *gracilis* z Tatr pobierały i gromadziły największe ilości metali ciężkich w swoich tkankach. Kiedy dorosłym roślinom podawano sole ołowiu, cynku czy kadmu w pożywce płynnej przez 12 dni, to w korzeniach pozostawało 99% pobranego ołowiu, 75% pobranego cynku i 68% pobranego

kadmu. Pozostała ilość pobranych metali była transportowana do części nadziemnych badanych roślin. Zawartość metali w korzeniach wielokrotnie przekraczała stężenia rozpuszczalnych form metali w otaczającym środowisku. Przykładowo, ołów w pożywce płynnej znajdował się w stężeniu 2,5 mg/l, podczas gdy po 12 dniach traktowania roślin tym metalem w tkankach pleszczotki górskiej występował (w zależności od fazy rozwojowej rośliny i jej organu) w stężeniach od 20 do 10 000 mg/kg s.m. (Pielichowska 2007, Wierzbička i in. 2015, 2017).

Powstaje zatem pytanie: w jakich miejscach gromadzone są metale w komórkach korzeni, skoro przy tak dużych, toksycznych zawartościach metali *B. laevigata* zachowała możliwość wzrostu i rozwoju? Odpowiedź na to pytanie dała wizualizacja złogów ołowiu w komórkach wierzchołków wzrostu korzeni, przy użyciu technik mikroskopii elektronowej. Siewki i dorosłe rośliny były traktowane roztworem ołowiu o stężeniu 8 mg/l przez jeden dzień oraz przez pięć dni (Pielichowska 2007, Wierzbička i in. 2015, 2017). Obserwacje wierzchołków korzeni siewek *B. laevigata* z Bolesławia i z Tatr po jednym dniu inkubacji z ołowiem, wykazały obecność tego pierwiastka głównie w ścianach komórkowych, ale także w przestworach i wakuolach. Gromadzeniu ołowiu w ścianach komórkowych towarzyszyło często zwiększenie ich grubości. Nie stwierdzono obecności ołowiu w cytoplazmie komórek (Ryc. 22A, B). Z kolei, obserwacje siewek *B. laevigata* subsp. *woycickii* i subsp. *gracilis* po pięciodniowej inkubacji w ołowiu, wykazały, że duże złogi ołowiu znajdowały się głównie w ścianach komórkowych i było ich więcej niż po jednym dniu inkubacji (Ryc. 22C, D, E) (Pielichowska 2007, Wierzbička i in. 2015, 2017).

Obserwacje wierzchołków korzeni dojrziałych roślin z obu podgatunków po jednodniowej inkubacji z ołowiem, wykazały obecność ołowiu w ścianach komórkowych i przestworach międzykomórkowych. Złogi te były liczne, ale drobne. Stwierdzono również gromadzenie ołowiu w wakuolach (Ryc. 23A, B, C). Natomiast, obserwacje wierzchołków korzeni po pięciodniowej inkubacji z ołowiem wykazały niewielką ilość złogów ołowiu. Pierwiastek ten sporadycznie występował w ścianach

i przestworach komórkowych (Ryc. 23D, E) (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

W ten sposób wykazano, że detoksykacja metali w komórkach *B. laevigata* zarówno subsp. *woycickii*, jak i subsp. *gracilis* polega na gromadzeniu metali w wakuolach, ścianach komórkowych i przestworach międzykomórkowych. Nie obserwowano różnic między tymi dwoma podgatunkami w gromadzeniu ołowiu. Natomiast stwierdzono mniejszą ilość złogów ołowiu w wierzchołkach korzeni roślin starszych, w porównaniu z siewkami (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017). Mamy tu zatem do czynienia z omawianym wcześniej mechanizmem kompartmentacji. Dzięki temu, nawet toksyczne pierwiastki, jeśli są zatrzymywane w wymienionych wyżej obszarach komórki, nie będą włączane w metabolizm komórki. Pozostają wtedy nietoksyczne dla całego organizmu, gdyż nie mają kontaktu z cytoplazmą, gdzie zachodzą ważne procesy metaboliczne. Stanowi to ważny mechanizm obronny *B. laevigata* jako całego gatunku przed toksycznym działaniem metali, który umożliwia wzrost roślin na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Rola włosków epidermalnych w tolerancji na metale ciężkie – mechanizm eliminacji

Jednym z mechanizmów unikania metali ciężkich jest eliminacja. Jak wspomniano na początku tego rozdziału gromadzenie metali ciężkich we włoskach epidermalnych jest przykładem eliminacji. Z tym mechanizmem mamy do czynienia u *B. laevigata* subsp. *woycickii* z terenu pogórniczego w Bolesławiu.

Przeprowadzono analizę pierwiastkową włosków epidermalnych na liściach roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii*, które rosły na podłożu galmanowym w warunkach laboratoryjnych. Posłużono się metodą laserowego odparowania połączonego ze spektrometrem mas (LA-ICP-MS). Po przeprowadzeniu wiązki lasera równoległe do brzegu liścia, gdzie włoski epidermalne występowały na powierzchni liścia, stwierdzono w nich obecność: dużych ilości wapnia i manganu, średnich ilości magnezu, talu i ołowiu oraz małych ilości cynku

i kadmu (Ryc. 24). Wykazano zatem obecność wszystkich metali występujących w wysokich stężeniach w podłożu galmanowym z Bolesławia. Wynik ten dowodzi, że włoski epidermalne faktycznie stanowią „zlewnię” metali ciężkich z liści roślin (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Włoski u pleszczotki górskiej są żywe. Dokładne obserwacje przeprowadzone z zastosowaniem mikroskopii świetlnej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej pozwoliły stwierdzić, że pojedynczy włoszek na liściach *B. laevigata* zbudowany jest z jednej komórki, otoczonej grubą ścianą komórkową. Komórka ta jest prawie cała wypełniona wakuolą (Ryc. 25). Nadmiar metali ciężkich pobranych przez roślinę może być gromadzony w centralnej wakuoli komórki włoska lub w jego grubych ścianach. Dzięki tym procesom chronione są pozostałe komórki liścia (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Owczarz 2006, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017). Przykładowo, obecność złogów kadmu we włoskach liściowych u *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia zaobserwowano bardzo szybko, bo już po 24 godzinach inkubacji roślin z tym metalem w hodowli w pożywce mineralnej. Szczególnie duże ilości kadmu były odkładane przede wszystkim w podstawach włosków epidermalnych liści i łodyg (Brzost 2005, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017). Gęste pokrycie włoskami liści roślin *B. laevigata* subsp. *woycickii*, omówione wcześniej we fragmencie przedstawiającym morfologię (Ryc. 7A, C), umożliwia detoksykację znacznych ilości metali ciężkich. Zatem, proces detoksyfikacji u tego podgatunku jest wydajniejszy niż u roślin *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr, gdzie na blaszkach liściowych jest niewielka liczba włosków epidermalnych (Ryc. 7B, D) (Wierzbicka 2002, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017).

Usuwanie metali przez najstarsze i zasychające liście – mechanizmy redystrybucji i eliminacji

Kolejnymi mechanizmami unikania metali ciężkich, występującymi u *B. laevigata* subsp. *woycickii* są: mechanizm redystrybucji, polegający na transporcie metali do starzejących się liści oraz

mechanizm eliminacji – zrzucanie starzejących się liści o wysokiej zawartości metali ciężkich w tkankach. Wykazano, że w warunkach naturalnych pobieranie metali ciężkich z podłoża zanieczyszczonego metalami przez pleszczotkę górską jest procesem narastającym w czasie. Świadczy o tym dwukrotne zwiększenie ilości cynku w roślinach w okresie jesiennym, w porównaniu do początku okresu wegetacyjnego. Wskazuje na to także wykrycie maksymalnego stężenia metali w najstarszych tkankach (Wierzbicka i in. 2015, 2017). Podobne zależności dla *B. laevigata* opisała również Godzik (1984, 1991), a dla innych gatunków roślin Ernst (1995).

Wymienione wyżej badania były prowadzone dla osobników występujących w terenie, co utrudnia określenie ich wieku. Pleszczotka górską jest byliną, zatem w terenie występują zarówno rośliny roczne, jak i wieloletnie. Nie wiadomo zatem, jak długo rośliny gromadziły w swoich tkankach metale ciężkie. Dlatego też wykonano badania dla 5-miesięcznych roślin, hodowanych w podłożu galmanowym, w szklarni w jednakowych warunkach. Wykazano, że w najstarszych i usychających liściach, ilość metali ciężkich była bardzo wysoka – np. ołowiu 277 mg/kg s.m., cynku 2787 mg/kg s.m., podczas gdy w zielonych liściach, wartości te wynosiły odpowiednio – 150 mg/kg s.m. oraz 1520 mg/kg s.m. Zatem zawartość ołowiu w usychających liściach była znacząco wyższa niż w liściach zielonych (Pielichowska 2007, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017).

Wykazano także, że pobieranie kadmu przez komórki liści i korzeni wpływa na gospodarkę mineralną, zwłaszcza wapnia a w mniejszym stopniu magnezu. Zaobserwowano, że średnie stężenie wapnia i magnezu w liściach wzrasta wraz z ich wiekiem. Jednakże, wykazano także, że wyższe stężenie kadmu w tkankach liści (oraz innych organów) obniża w nich procentową zawartość wapnia i magnezu. Zatem mamy tu do czynienia z konkurencją w transporcie pomiędzy jonami kadmu a jonami wapnia i magnezu. Wymienione prawidłowości stwierdzono dla roślin z obu podgatunków. Zatem wymienione mechanizmy unikania metali ciężkich są cechą gatunkową (Brzost 2005). Dzięki powyższym badaniom, ostatecznie udowodniono, że u roślin *B. laevigata* występuje usuwanie

nadmiaru metali ciężkich przez ich gromadzenie w najstarszych liściach – jest to mechanizm redystrybucji. Najstarsze liście ze zgromadzonymi metalami w swoich tkankach następnie zasychają i są usuwane z rośliny, co jest przykładem mechanizmu eliminacji.

Biscutella laevigata jako hiperakumulator talu

Wśród metalofitów szczególną grupę stanowią hiperakumulatory. Rośliny te odznaczają się zdolnością do pobierania z gleby i akumulowania w nadziemnych swych częściach wyjątkowo dużych ilości metali ciężkich, bez widocznego negatywnego wpływu na procesy metaboliczne (Baker i Brooks 1989, Branquinho i in. 2007, Roosens i in. 2008, Przedpelska-Wąsowicz 2015). W literaturze spotyka się różne poziomy zawartości pierwiastków w roślinach, powyżej których rośliny uznawane są za zdolne do hiperakumulacji. Dla przykładu u roślin rosnących na ich naturalnych siedliskach van der Ent i in. (2013) zaproponowali zawartość danego pierwiastka, wyrażoną w miligramach na kilogram suchej masy pędów, równą: 100 dla kadmu, selenu i talu, 300 dla kobaltu, miedzi i chromu, 1000 dla niklu i ołowiu, 3000 dla cynku i 10 000 dla manganu. W przypadku talu podawany jest też poziom hiperakumulacji na poziomie 500 mg/kg s.m. (Anderson i in. 1999a, Leblanc i in. 1999). Zatem, hiperakumulatorami nazywamy rośliny, które rosną na glebach wzbogaconych w metale i są zdolne do gromadzenia w pędach ilości metali ponad 100 krotnie wyższych niż inne rośliny (m.in.: dla kadmu powyżej 100 mg/kg s.m., dla ołowiu powyżej 1000 mg/kg s.m., dla cynku powyżej 10 000 mg/kg s.m. oraz dla talu 100 lub 500 mg/kg s.m. (Anderson in.1999a, Leblanc i in.1999, van der Ent i in. 2013). Hiperakumulatory są ciągle poszukiwane ze względu na praktyczną możliwość wykorzystania ich przy oczyszczaniu gleb z metali ciężkich (fitoremediacji) (Salt i in. 1998, Lasat 2002, Muszyńska i in. – Rodział 7, niniejszy tom).

Znamiennie jest to, że dotychczas najwięcej gatunków hiperakumulujących metale ciężkie odnotowano w rodzinie kapustowatych (*Brassicaceae*) (Baker i Brooks 1989, Reeves 2003, Krämer

2010), do której należy również bohaterka tej książki, pleszczotka górską. Powstaje zatem pytanie, czy skoro *B. laevigata* ma tak wydajne mechanizmy detoksyfikacji metali ciężkich, to jest zdolna do ich hiperakumulacji?

Badania prowadzone nad roślinami *B. laevigata* w Europie Zachodniej wykazały, że rośliny z populacji terenów metalonośnych w Alpach Austriackich są zdolne do hiperakumulacji ołowiu (powyżej 1000 mg/kg s.m. pędów) (Wenzel i Jockwer 1999, Reeves 2003, Krämer 2010), a w południowej Francji (Les Malines) także talu (do 15 200 mg/kg s.m.) (Anderson i in. 1999a, Leblanc i in. 1999). *B. laevigata* z Alp zawierały także podwyższoną zawartość kadmu w pędach (do 78 mg/kg s.m.), ale poniżej granicy hiperakumulacji (Wenzel i Jockwer 1999). Zaliczono zatem *B. laevigata* do hiperakumulatorów talu i ołowiu. Z kolei dotychczasowe badania nad *B. laevigata* subsp. *woycickii* pochodzącymi z hałdy cynkowo-ołowiowej w Bolesławiu, wykazały, że rośliny te mają znacznie podwyższoną tolerancję na obecność w podłożu takich pierwiastków jak ołów, kadm i cynk, w porównaniu z roślinami podgatunku *gracilis* z rejonu Tatr Zachodnich (Wierzbicka i Pielichowska 2004, Wąsowicz i in. 2014). Jednak w tkankach tych roślin nie zostały przekroczone poziomy metali, które wyraźnie wskazywałyby na hiperakumulację.

Biscutella laevigata wraz z dwoma innymi dziko rosnącymi gatunkami, tj. *Iberis intermedia* L. i *Melandrium album* (Mill.) Garcke, jak również jednym gatunkiem uprawnym z grupy *Brassica oleracea acephala* uchodzą w literaturze za jedyne dotychczas poznane hiperakumulatory talu (Anderson i in. 1999a, LaCoste i in. 1999, Leblanc i in. 1999, Al-Najar i in. 2003, Scheckel i in. 2004, 2007, Sheoran i in. 2009, Escarré i in. 2011, Pościć i in. 2013, 2015). Warto podkreślić, że u pleszczotki górskiej badanej w południowej Francji (na terenie osadników poftlotacyjnych wokół huty cynku i ołowiu w Les Malines, Les Avinières, w pobliżu Montpellier odnotowano znacznie wyższe niż progowe dla hiperakumulacji stężenia talu w pędach, tj. 15 200 mg/kg s.m. (Anderson i in. 1999a, Leblanc i in. 1999, van der Ent i in. 2013). Z kolei w dojrzałych liściach *I. intermedia* stwierdzono zawartość talu od 2810 mg/kg s.m. pędów według LaCoste i in. (1999) oraz Leblanc i in. (1999)

do około 13 000 mg/kg s.m. według Scheckel i in. (2004), natomiast w przypadku innych gatunków zawartość tego pierwiastka wahała się między około 1000 a 3000 mg/kg s.m. pędów: u *S. latifolia* wynosiła około 1500 mg/kg s.m. (Escarré i in. 2011), *B. oleracea acephala* 12 000 mg/kg s.m. i *I. intermedia* 29 000 mg/kg s.m. (Al-Najar i in. 2003). Należy podkreślić, że stężenia talu w roślinach rosnących w niezanieczyszczonym środowisku zwykle nie przekraczają wartości od 0,02 mg/kg s.m. (van der Ent i in. 2013) do 0,05 mg/kg s.m. (Wierzbicka i in. 2004).

Na tej podstawie oparto przypuszczenie, że *B. laevigata* subsp. *woycickii* występująca w rejonie wydobywania i przetwarzania rud cynkowo-ołowiowych okolic Bolesławia, gdzie stwierdzono znacznie podwyższoną zawartość talu w glebie (Dmowski i in. 1998, Dmowski 2000, Dmowski i Badurek 2001, 2002, Wierzbicka i in. 2004), również może hiperakumulować ten metal. Do zanieczyszczenia środowiska talem w największym stopniu przyczynia się wydobywanie i przetwarzanie rud metali ciężkich zawierających domieszki talu jak i działalność elektrociepłowni oraz rafinerii (Sager 1994). W glebie wokół huty cynku i ołowiu Zakładów Górniczo-Hutniczych „Bolesław” (ZGH „Bolesław”) odnotowano zawartość talu, aż 149 mg/kg s.m., a w odpadach poftlotacyjnych 30–40 mg/kg s.m. (Dmowski i Badurek 2002). Dla porównania przeciętna zawartość talu w glebach niezanieczyszczonych mieści się w granicach 0,02–2,8 mg/kg s.m. (Kabata-Pendias 2011).

Tal oddziałuje silnie toksycznie na rośliny, zwierzęta i człowieka, głównie ze względu na podobieństwo chemiczne do potasu, z którym konkuruje, zaburzając metabolizm komórek (Scheckel i in. 2007). O tym, że tal stanowi faktyczne zagrożenie dla różnych grup organizmów przekonały liczne badania biomonitoringowe w uprzemysłowionym rejonie Górnego Śląska i Małopolski (Dmowski i in. 1998, Dmowski 2000, Dmowski i Badurek 2001, 2002, Wierzbicka i in. 2004). Dla przykładu, w piórach srok (*Pica pica* Linnaeus) z okolic Bukowna, w sąsiedztwie wspomnianej huty cynku i ołowiu ZGH „Bolesław”, stwierdzono kilkaset razy wyższe stężenie talu niż w piórach srok z innych uprzemysłowionych terenów w Polsce (Dmowski 2000). Z drugiej strony, tal jest pierwiastkiem

ważnym w różnych gałęziach przemysłu (Scheckel i in. 2007, Sheoran i in. 2009). Stąd też badania nad zdolnością do hiperakumulacji talu u pleszczotki górskiej mają nie tylko charakter poznawczy, ale także prowadzone są z myślą o potencjalnym wykorzystaniu tych roślin w fitoremediacji gleb (Anderson i in. 1999a, LaCoste i in. 1999, Bini 2010, Ali i in. 2013, Muszyńska i in. – Rozdział 7, niniejszy tom) i fitogórnictwie, czyli pozyskiwaniu metali z roślin zdolnych do akumulacji ich znacznych ilości (Anderson i in. 1999a, LaCoste i in. 1999, Leblanc i in. 1999, Sheoran i in. 2013).

W badaniach nad pleszczotką górską, do analizy zawartości talu z reguły pobierano rośliny pochodzące z terenu zanieczyszczonego talem (Anderson i in. 1999a, LaCoste i in. 1999, Leblanc i in. 1999, Pościć i in. 2015), rzadko natomiast prowadzono hodowlę roślin z różnych populacji tego gatunku w ujednoczonych warunkach szklarni (Pościć i in. 2013). Dlatego wnioski o hiperakumulacji talu wysnute z badań terenowych należało przyjmować raczej z ostrożnością, ponieważ na poziomie talu w roślinach mogło wpływać wiele czynników. Po pierwsze, tal może pochodzić nie tylko z gleby pobrany przez korzenie, ale także z opadu pyłu z powietrza, co może być szczególnie widoczne u roślin gęsto pokrytych włoskami. Po drugie, podłoże, na którym rosną rośliny może mieć bardzo niejednorodny skład (Vaňek i in. 2010). Po trzecie, nieznaną jest okres akumulacji talu w częściach nadziemnych roślin, gdyż w populacjach naturalnych występują rośliny w różnym wieku i fazie wzrostu, ponieważ pleszczotka górska jest rośliną wieloletnią. W ramach badań prowadzonych na obszarze hałdy w Bolesławiu oznaczono także zawartość talu w podłożu galmanowym pobranym z siedlisk o różnym pokryciu roślinnością. Wykazano, że podłoże to miało zróżnicowaną zawartość talu w zależności od miejsca z którego pochodziło, to z miejsc nieporośniętych roślinnością zawierało 43 mg/kg s.m. a z miejsc zadarnionych 15,2 mg/kg s.m. (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Zróżnicowane pokrycie roślinnością jest kolejnym czynnikiem, który pośrednio wpływa na możliwość akumulacji talu przez pleszczotkę górską, gdyż w miejscach bardziej zadarnionych, gdzie talu jest mniej w podłożu galmanowym, rośliny pobiorą go też mniej.

Wstępne badania zespołu autorów niniejszego rozdziału na *B. laevigata* subsp. *woycickii* zebranych w terenie, z hałdy galmanowej w Bolesławiu pokazały, że ilość talu w pędach nie tylko nie wskazywała na hiperakumulację tego pierwiastka, ale była wręcz znikoma (przy względnie wysokiej zawartości talu w glebie, tj. średnio 43 mg/kg s.m. i maksymalnie 78 mg/kg s.m., zaś w pędach *B. laevigata* talu było średnio 0,1 mg/kg s.m. i maksymalnie 0,5 mg/kg s.m.) (Wierzbicka i in. 2004). Dlatego, biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia z Francji o hiperakumulacji talu przez pleszczotkę górską (Anderson i in. 1999a, Leblanc i in. 1999) postanowiono to sprawdzić w ujednoczonych warunkach hodowli i na dwóch podgatunkach: subsp. *woycickii* z Bolesławia oraz subsp. *gracilis* z Tatr Zachodnich (Wierzbicka i in. 2016). Rośliny w różnym wieku: 2-tygodniowe, 1-, 2- i 10-miesięczne hodowane były w podłożu pochodzącym z hałdy galmanowej w Bolesławiu oraz w ziemi ogrodniczej (kontrola). Hodowla roślin trwała 5 miesięcy. Należy podkreślić, że w formie dostępnej dla roślin tal występował w bardzo małych ilościach (1,1 mg/kg). Mimo to, w ciągu całego okresu hodowli rośliny *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia i *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr pobrały znaczną ilość talu – było go średnio 98,5 mg/kg s.m. Najwięcej talu było w liściach, średnio 164,9 mg/kg s.m. (w poszczególnych osobnikach zawartość talu w liściach wahała się od 59,8 do 588,2 mg/kg s.m.). W korzeniach zawartość talu była znacznie niższa, średnio 32 mg/kg s.m. Spośród roślin z Bolesławia i z Tatr, z różnych grup wiekowych, najwięcej talu pobrały siewki (219 mg/kg s.m.), a najmniej najstarsze rośliny (43,4 mg/kg s.m.), stężenie pobranego talu malało zatem wraz z wiekiem roślin. Kiedy do podłoża galmanowego dodano związek zwiększający dostępność talu (EDTA), rośliny pobrały go średnio jeszcze więcej, tj. 108,9 mg/kg s.m., z czego najwięcej talu było w liściach 138,4 mg/kg s.m. (maksymalnie nawet 260 mg/kg s.m.) (Pielichowska 2007, Wierzbicka i in. 2016).

O zdolności do hiperakumulacji talu przez rośliny świadczy jego dystrybucja w ich organizmach. W korzeniach *B. laevigata* zatrzymywane było jedynie 16% pobranego talu, a 84% było transportowane do liści. Tal rozmieszczony był w roślinach według wzoru: najwięcej w zielonych

liściach, mniej w korzeniach, najmniej w najstarszych usychających liściach. Współczynnik translokacji (będący ilorzem zawartości metalu w pędzie do jego zawartości w korzeniu, Anderson i in. 1999a, b) był wysoki i wynosił 6,1, podczas gdy współczynnik biokoncentracji (odnoszący zawartość metalu w pędzie do jego zawartości w glebie, Anderson i in. 1999a, b) wynosił 10,9. Po dodaniu do podłoża galmanowego EDTA współczynnik translokacji wyniósł 2,2, a współczynnik biokoncentracji 5,8 (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Należy zaznaczyć, że wartości obu współczynników powyżej 1 są charakterystyczne dla hiperakumulatorów metali i wskazują na znacząco większy transport metali do części nadziemnych w porównaniu z ich zawartością w korzeniach roślin (van der Ent i in. 2013). Badania laboratoryjne wykazały, że zawartość talu w pleszczotce górskiej nie przekroczyła wartości progowej dla hiperakumulacji tego pierwiastka 500 mg/kg s.m. podawanej przez Anderson i in. (1999a) oraz Leblanc i in. (1999), jednak była wyższa od wartości progowej 100 mg/kg s.m. podawanej przez van der Ent i in. (2013) (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Wydaje się więc, że *B. laevigata* jest fakultatywnym hiperakumulatorem talu, a przynajmniej ma duży potencjał do hiperakumulacji tego pierwiastka. Jest to cecha właściwa dla całego gatunku, niezależna od pochodzenia roślin ze starej hałdy galmanowej w Bolesławiu czy ze stanowiska w Tatrach.

Zwraca uwagę fakt, że inni autorzy obserwowali zdolność do hiperakumulacji talu raczej w populacjach pleszczotki górskiej występujących na terenach metalonośnych niż w populacjach z terenów niezanieczyszczonych, a więc przypisywali ją wybranym populacjom a nie całemu gatunkowi (Pościć i in. 2013, 2015). Na rozbieżność w różnych pracach, dotyczącą tego, czy hiperakumulacja metali jest cechą gatunku czy specyficzną dla populacji wskazali Pollard i in. (2014), podkreślając że zagadnienie to wymaga dalszych badań i pełniejszego wyjaśnienia. Zdaniem autorów niniejszego rozdziału może to być cecha gatunkowa niezależna od miejsca pochodzenia roślin.

Warto zaznaczyć, że w pracy Pościć i in. (2015) jedyna z populacji pleszczotki górskiej, w której stwierdzono bardzo wysoką i właściwą hiperakumulatorom zawartość talu, była populacją z terenów

wzbogaconych w rudy cynku i ołowiu (Cave de Predil, włoskie Alpy). Populacja ta była też odrębna genetycznie od populacji z innych obszarów. W pracy Wąsowicz i in. (2014) również potwierdzono za pomocą badań genetycznych odrębność populacji pleszczotki pochodzącej ze starej hałdy galmanowej w Bolesławiu i nadano jej rangę podgatunku, o czym pisano już w Rozdziale 5 niniejszego tomu. Jednakże wykazano, że zarówno *B. laevigata* subsp. *woycickii* z Bolesławia, jak i *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr, choć izolowane w sensie przestrzennym i genetycznym (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2020), mają zdolność do hiperakumulacji talu (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Warto zaznaczyć, że występuje ona w Tatrach również na podłożu wzbogaconym w metale i była na tamtejszych stanowiskach klasyfikowana jako gatunek metalolubny (Godzik 1991, 1993), co wskazuje na wysoką tolerancję na metale u pleszczotki górskiej bez względu na miejsce jej pochodzenia. Można uznać, że zdolność do hiperakumulacji talu jest cechą gatunkową.

Stosując do analizy składu pierwiastkowego metodę laserowego odparowania ze spektrometrem mas, LA-ICP-MS, wykazano, w jaki sposób tal jest rozmieszczony w liściach pleszczotki hodowanej na podłożu galmanowym z dodatkiem EDTA (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Po przejściu wiązki laserowej wzdłuż kilku linii biegnących w poprzek liścia oraz wzdłuż brzegu liścia, uzyskano profile rozmieszczenia talu. Okazało się, że najwięcej talu występowało w górnej części ogonka liściowego, a najmniej w szczytowej części blaszki liścia (Ryc. 26). Obecność talu, obok innych metali ciężkich, tj. ołowiu, cynku i kadmu, wykryta została również we włoskach epidermy liści. Złogi m.in. z talem, wybarwione na czerwono ditizonem, znajdowały się w dużej wakuoli u podstawy jednokomórkowego włoska (Ryc. 27). Obecność talu we włoskach została wykryta po raz pierwszy (Pieliowska 2007, Wierzbicka i in. 2016). Jak już wcześniej pisano, włoski na liściach *B. laevigata* mogą pełnić istotną rolę w ochronie metabolizmu innych komórek przed toksycznym wpływem metali ciężkich, w tym talu. Zdolność do gromadzenia znacznej ilości metali we włoskach uważana jest za cechę różnych hiperakumulujących gatunków, np. cynku i kadmu u *A. halleri* (Küpper

i in. 2000) czy niklu w rodzaju *Alyssum* (Broadhurst i in. 2004a, b).

Ostatecznie wykazano, że osobniki *B. laevigata* bez względu na swe pochodzenie – z łańdy cynkowo-olowiowej w Bolesławiu czy z rejonu Tatr, są w stanie hiperakumulować tal i transportować go z korzeni, głównie do zielonych liści. Jest to cecha wspólna dla całego gatunku. Najintensywniej akumulują tal młode rośliny, a z wiekiem zawartość talu w liściach maleje. Po raz pierwszy przy pomocy metody LA-ICP-MS wykazano obecność talu we włoskach epidermy liści pleszczotki, co należy uznać za mechanizm ochrony wrażliwych komórek przed toksycznym wpływem talu. Z uwagi na większą ilość włosków epidermalnych na liściach roślin łańdowych *B. laevigata* subsp. *woycickii*, w porównaniu z roślinami tatrzańskimi *B. laevigata* subsp. *gracilis*, można sądzić, że rośliny z Bolesławia są lepiej przystosowane do życia na podłożu metalonośnym. W warunkach zwiększonej dostępności talu w podłożu należy spodziewać się zwiększonego pobierania tego pierwiastka przez rośliny i przenoszenia go do części nadziemnych. Oznacza to, że pleszczotka górską może być stosowana w fitogórnictwie.

Podsumowanie – co nowego wnieśliśmy do wiedzy o *B. laevigata*

Na zakończenie tego rozdziału pragniemy wskazać, co nowego wniosły nasze badania do dotychczasowej wiedzy o *B. laevigata*.

A. Najważniejszym osiągniętym wynikiem jest wykazanie, iż na łańdzie w Bolesławiu koło Olkusza występuje unikalny podgatunek *B. laevigata* subsp. *woycickii* (pleszczotka Wóycickiego). Podgatunek ten powstał 120 tysięcy lat temu, tak więc należy go uznać za relikwit polodowcowy (inaczej relikwit glacialny). Oznacza to, że takson ten jest pozostałością okresu lodowcowego. Podgatunek ten jest unikalny dla rejonu olkuskiego i z tego powodu należy uznać, że ma charakter endemiczny. Taksony „endemiczne” i „relikwitowe” są niezwykle rzadkie we florze i z tego powodu pleszczotka górską z terenów wokół Bukowna, Bolesławia i Olkusza jest niezwykle cenna dla nauki.

B. Przez 120 tysięcy lat, rośliny tego podgatunku miały dogodne warunki do wzrostu

i rozwoju na wychodniach rud cynkowo-olowiowych nad powierzchnią gruntu. W ciągu ostatnich 800 lat, w wyniku działalności człowieka – hutnictwa cynku i ołowiu, które w okolicach Olkusza sięga XIII wieku, pojawiły się nowe siedliska, stwarzające dogodne warunki do wzrostu tej rośliny. Były to łańdy pogórnice i odpady z wysoką zawartością metali ciężkich.

C. Szczególną cechą pleszczotki górskiej jest wyjątkowo wysokie „zamiłowanie” do cynku. Jest to roślina cynkolubna – a w szczególności wysoce cynkolubny jest podgatunek *Woycickii*. Podczas gdy wysokie stężenie cynku w podłożu hamuje wzrost innych gatunków roślin – pleszczotka górską jest wręcz stymulowana do wzrostu. Taka strategia pozwala na zasiedlanie stanowisk bogatych w cynk i zwycięstwo w konkurencji z innymi gatunkami roślin. Zatem, pleszczotka górską jest rośliną pionierską szczególnie na glebach metalonośnych bogatych w cynk.

D. Wysoka zawartość cynku w glebie nie jest jednak niezbędna dla tej rośliny. Pleszczotka górską równie dobrze rośnie i kwitnie w zwykłej glebie ogrodniczej. A zatem gatunek ten jest metalofitem fakultatywnym – czyli zdolnym do wzrostu zarówno na glebach metalonośnych, jak i na glebach niezanieczyszczonych metalami.

E. *B. laevigata* jest typowym gatunkiem górskim, w Polsce występuje w Tatrach na wysokości od około 800 do ponad 2000 m n.p.m. Innym miejscem jej występowania są znacznie niżej położone tereny okolic Olkusza (około 300 m n.p.m). Odległość pomiędzy tymi dwoma stanowiskami wynosi około 100 km. Za tak wyjątkowe występowanie tego gatunku w Polsce odpowiada zdolność pleszczotki górskiej do wzrostu na glebach o wysokiej zawartości cynku. Właśnie ten pierwiastek jest obecny zarówno w podłożu w Tatrach (pozostałości po dawnych hutach żelaza), jak i w okolicach Olkusza (gleby cynkowo-olowiowe). Zatem to właśnie cynkolubność odpowiada za tak zaskakujące rozmieszczenie pleszczotki górskiej w Polsce. Wysokim stężeniom cynku na obu stanowiskach towarzyszy wysokie stężenie wapnia w podłożu, co również ma istotne znaczenie dla wzrostu pleszczotki górskiej.

F. W Tatrach występuje tylko jeden podgatunek pleszczotki górskiej. Jest to *B. laevigata* subsp. *gracilis*. Dowiodły tego badania genetyczne.

G. Główne cechy morfologiczne, które są utrwalone genetycznie i pozwalają na odróżnienie obu podgatunków to kolor liści i ich pokrycie włoskami – u subsp. *woycickii* liście są cienkie, jasno-zielone, silnie pokryte włoskami. Natomiast u subsp. *gracilis* liście są ciemnozielone, grubsze, często błyszczące, pokryte nielicznymi włoskami. Drugą cechą odróżniającą te dwa podgatunki jest wielkość nasion. Nasiona podgatunku *Woycickii* są o około 30–50% mniejsze od nasion podgatunku *gracilis*.

H. Poziom tolerancji na ołów i kadm jest różny u obu podgatunków pleszczotki górskiej. Tolerancja na te metale jest wyższa o około 50% u subsp. *woycickii* niż *gracilis*. Natomiast porównanie z innymi gatunkami roślin pokazało, że poziom tolerancji na ołów i kadm obu podgatunków pleszczotki górskiej mieści się w zakresie ich tolerancji konstytucjonalnej (wrodzonej).

I. *B. laevigata* subsp. *gracilis* z Tatr jest zdolna do wzrostu i rozwoju na podłożu galmanowym z Bolesławia. Natomiast u obu podgatunków „krytycznym punktem” jest przejście przez fazę siewki. Na tym etapie rozwoju roślin zamiera około 80–90% siewek. Do fazy dojrzałej dochodzi jedynie 10% roślin. Cecha ta jest ważna dla przyszłego stosowania pleszczotki górskiej do zasiedlania świeżych hałd. Należy wówczas wysiać bardzo dużą ilość nasion, pamiętając, że jedynie niewielki procent siewek zdoła się utrzymać. Można również na hałdę przesadzać rośliny starsze, wcześniej podhodowane przez okres 2–5 miesięcy.

J. Jeśli zdolność do dalszego wzrostu i rozwoju zachowuje jedynie kilkanaście procent wykiełkowanych nasion – to na tym etapie odbywa się silna selekcja najbardziej odpornych roślin, najlepiej dostosowanych do wzrostu w pionierskich i trudnych warunkach panujących na hałdach. Właśnie te rośliny, po osiągnięciu dojrzałości mogą dalej rozmnażać się wegetatywnie. Dzięki temu najbardziej odporna populacja roślin zasiedla teren hałdy.

K. Podłoże galmanowe, które porasta szczególnie flora galmanowa, oprócz bardzo wysokich stężeń cynku, ołowiu, kadmu i talu zawiera niedobory

pierwiastków odżywczych. Bardzo niewielkie ilości azotu mogą być czynnikiem ograniczającym skład gatunkowy flory galmanowej, jak i ograniczającym wzrost roślin. Brak azotu jest jednym z czynników limitujących rozwój roślin na hałdzie.

L. Czynnikiem ograniczającym wzrost pleszczotki górskiej na hałdzie jest również deficyt wody. Przy zwiększeniu ilości wody przez optymalne podlewanie, rośliny pleszczotki górskiej były wielokrotnie większe (co jest zrozumiałe), ale przy tym zawierały w swoich tkankach ponad 2–3 razy więcej metali. Oznacza to, że podczas silnych deszczy znacznie więcej metali ciężkich może zostać pobranych do tkanek roślin, a przez to do obiegu biologicznego.

M. Przy zwiększonej dostępności metali ciężkich z podłoża galmanowego, oba podgatunki pleszczotki górskiej wykazywały potencjalną zdolność do hiperakumulacji talu. Wydaje się więc, że jest to cecha całego gatunku.

N. Wysokie stężenia metali ciężkich w tkankach pleszczotki górskiej, przy braku objawów toksyczności, podlegają detoksyfikacji a przez to stają się nietoksyczne dla rośliny. Metale są gromadzone w ścianach komórkowych, przestworach międzykomórkowych i wakuolach, w efekcie czego chroniona jest cytoplazma komórek oraz jądro komórkowe, gdzie odbywają się istotne procesy metaboliczne roślin. Ponadto, metale odkładane są we włoskach epidermalnych na liściach roślin, przez co zmniejsza się ilość metali w innych komórkach liści. Nadmiar metali jest również przenoszony do najstarszych, usychających liści, które po odpadnięciu od rośliny zmniejszają w niej pulę metali. Większość z pobieranych metali (ołów, cynk, kadm) w największych ilościach jest zatrzymywana w korzeniach roślin. Chroni to części zielone, nadziemną część rośliny przed toksycznym działaniem, a przez to chroniony jest cały aparat fotosyntetyczny.

O. Nasiona *B. laevigata* subsp. *woycickii* są bardzo cenne, ponieważ podgatunek ten posiada najbardziej efektywne przystosowania do wzrostu na hałdach cynkowo-ołowiowych. Nasiona tych roślin mogą posłużyć do rekultywacji świeżych metalonośnych podłoży.

P. Naturalne miejsca występowania *B. laevigata* mogą służyć geologom jako wskaźniki podłoża zawierających cynk. Gatunek ten można uznać za wskaźnikowy dla pokładów rud cynku.

Biorąc pod uwagę bardzo ograniczony teren występowania *B. laevigata* subsp. *woycickii* (pogórnice okolice Bolesławia, Bukowna i Olkusza) oraz wyjątkowe cechy podgatunku, który jest endemitem, reliktem polodowcowym oraz metalofitem fakultatywnym, charakteryzującym się cynkolubnością, należy uznać go za niezwykle cenny dla nauki.

W chwili obecnej jedynie dwa stanowiska tej rośliny podlegają ochronie w Europejskiej Sieci Ekologicznej Natura 2000. Postulujemy objęcie ochroną gatunkową *B. laevigata* subsp. *woycickii* w całym rejonie olkuskim. Należy zwrócić uwagę, że ta wyjątkowa roślina, może zostać uznana za „sensację przyrodniczą” i stać się symbolem oraz jedną z atrakcji przyrodniczych całej okolicy Bolesławia, Bukowna i Olkusza.