



Różnorodność biologiczna

od komórki
do ekosystemu



pod redakcją
**Andrzeja Bajguza i
Iwony Ciereszko**



Funkcjonowanie
roślin i grzybów.
Środowisko
- eksperyment
- edukacja





Polskie Towarzystwo Botaniczne
Oddział w Białymstoku

Różnorodność biologiczna
– od komórki do ekosystemu.
Funkcjonowanie roślin i grzybów.
Środowisko – eksperyment – edukacja

pod redakcją
Andrzeja Bajguza i Iwony Ciereszko

Polskie Towarzystwo Botaniczne
Białystok 2015

Redakcja naukowa

dr hab. **Andrzej Bajguz**, prof. UwB

dr hab. **Iwona Ciereszko**, prof. UwB

Recenzenci

prof. dr hab. **Wiesław Fałtynowicz**; prof. dr hab. **Czesław Hołdyński**; prof. dr hab. **Grzegorz Jackowski**;
prof. dr hab. **Wacław Orczyk**; prof. dr hab. **Elżbieta Romanowska**; dr hab. **Andrzej Bajguz**, prof. UwB;
dr hab. **Iwona Ciereszko**, prof. UwB; dr hab. **Katarzyna Jadwiszczak**; dr hab. **Bożena Kiziewicz**;
dr hab. **Grażyna Łaska**, prof. PB; dr hab. **Adam Tylicki**; dr hab. **Małgorzata Wójcik**



Copyright © 2015 by: Polskie Towarzystwo Botaniczne – Oddział w Białymstoku.
Wszystkie prawa zastrzeżone

Korekta językowa:

Urszula Glińska

Projekt okładki:

Agencja Wydawnicza EkoPress / fot.: Andrzej Bajguz, Piotr Tałałaj, Aneta Adamczuk

Redaktor techniczny:

Andrzej Poskrobko

Realizacja:

Agencja Wydawnicza EkoPress

601 311 838

Spis treści

| | |
|---|-----|
| Wstęp | 7 |
| 1. Grzegorz Jackowski, Magda Grabsztunowicz, Małgorzata Baranek Regulacja karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco) w odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych | 9 |
| 2. Wioleta Wasilewska, Tomasz Krupnik, Maksymilian Zienkiewicz, Barbara Michalak, Elżbieta Romanowska Rola fotooddychania w kontroli odpowiedzi roślin na zmiany środowiskowe | 23 |
| 3. Edyta Łukaszuk, Iwona Ciereszko Metabolizm cukrów w warunkach stresu zranienia | 37 |
| 4. Małgorzata Wójcik, Sławomir Dresler, Piotr Sugier, Grzegorz Stanisławski, Agnieszka Hanaka, Zbigniew Krupa, Anna Tukiendorf Roślinność spontanicznie zasiedlająca składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych – różnorodność gatunkowa oraz mechanizmy adaptacji | 51 |
| 5. Ewa Muszyńska, Alina Wiszniewska, Ewa Hanus-Fajerska Roślinność terenów wzbogaconych w metaliczne pierwiastki śladowe jako unikatowe źródło bioróżnorodności | 63 |
| 6. Urszula Krasuska, Anna Dzierżyńska, Katarzyna Ciąčka, Olga Andrzejczak, Paweł Staszek, Agnieszka Gniazdowska Rośliny mięsożerne jako przykład adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego | 77 |
| 7. Grażyna Łaska Różnorodność biologiczna i walory przyrodnicze zbiorowisk roślinnych w dolinie Słoi w Puszczy Knyszyńskiej | 89 |
| 8. Izabela Tałałaj Biologia i ekologia wybranych gatunków storczyków naziemnych | 103 |
| 9. Grażyna Łaska, Aneta Sienkiewicz Stan zachowania i zagrożenie populacji sasanki otwartej <i>Pulsatilla</i> <i>patens</i> (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej | 117 |
| 10. Marta Szal Z badań nad przemianami środowiska przyrodniczego, gospodarki i osadnictwa na Pojezierzu Mrągowskim | 129 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 11. | Agnieszka Chrzanowska, Katarzyna A. Jadwiszczak Rola hybrydyzacji międzygatunkowej w kształtowaniu zmienności genetycznej oraz morfologicznej brzoź (<i>Betula</i> L.) | 145 |
| 12. | Magdalena Kulczyk-Skrzeszewska, Barbara Kieliszewska-Rokicka Różnorodność biologiczna ektomykoryzowych symbiontów topoli włoskiej (<i>Populus nigra</i> 'Italica') w środowisku zmienionym antropogenicznie | 159 |
| 13. | Jolanta Tyburska-Woś, Barbara Kieliszewska-Rokicka Mykoryza kasztanowca białego <i>Aesculus hippocastanum</i> L. w warunkach miejskich i pozamiejskich | 173 |
| 14. | Ewa Oleńska Asocjacja symbiotyczna roślin bobowatych z ryzobiami | 187 |
| 15. | Bożena Kiziewicz, Adam Kamil Trzeszczkowski, Anna Godlewska, Elżbieta Muszyńska, Natalia Rogoz Grzyby wybranych fontann miejskich Białegostoku | 201 |
| 16. | Sylwia Kiercul Materiały do bioty porostów Podlasia III. Wieś Janowicze, gmina Juchnowiec Kościelny (Polska północno-wschodnia) | 213 |
| 17. | Anna Matwiejuk Bioróżnorodność wokół nas – porosty jako biowskaźniki zanieczyszczenia powietrza | 225 |
| 18. | Alicja Piotrowska-Niczyporuk, Andrzej Bajguz Udział glonów w fitoremediacji środowisk wodnych skażonych metalami ciężkimi | 239 |
| 19. | Iwona Biziewska, Marta Talarek, Andrzej Bajguz Rola brassinosteroidów w odpowiedzi roślin na stres metali ciężkich | 253 |
| 20. | Zuzanna Denkiewicz, Bożena Kozłowska-Szerenos, Iwona Ciereszko Wpływ askorbinianu na zdolności antyoksydacyjne komórek <i>Chlorella vulgaris</i> rosnących w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego | 265 |
| 21. | Michał Sulkiewicz, Iwona Ciereszko Odpowiedź lokalna lub systemiczna roślin na uszkodzenia przez fitofagi | 279 |
| 22. | Marta Talarek, Iwona Biziewska, Andrzej Bajguz Rola brassinosteroidów w odpowiedzi roślin na działanie patogenów | 293 |
| 23. | Alina Stankiewicz Uczniowie szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych o szkolnym nauczaniu biologii | 305 |
| | Spis rycin | 319 |
| | Spis tabel | 321 |

Wstęp

Prezentowana Państwu monografia jest już czwartą pozycją wydawniczą cyklu poświęconego najnowszym osiągnięciom z zakresu badań nad bioróżnorodnością, prowadzonych na wszystkich poziomach organizacji życia roślin, grzybów i porostów – od komórki do ekosystemu. Motywem przewodnim cyklu jest wszechstronna analiza funkcjonowania roślin i grzybów w zmieniających się warunkach środowiska, dzięki interdyscyplinarnym badaniom genetycznym, biochemicznym, fizjologicznym, florystycznym, demograficznym oraz fitosocjologicznym.

Poszczególne rozdziały monografii prezentują szeroki zakres zagadnień naukowych związanych z ekofizjologią, biochemią, biologią rozwoju roślin, ekologią populacji, fitosocjologią, florystyką i systematyką. Autorami rozdziałów są pracownicy uczelni krajowych, uznani badacze naukowci, w większości członkowie Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

W monografii omówione zostały szczegółowo różnorodne zagadnienia przedstawiane w świetle najnowszych badań, między innymi: modyfikacja aktywności kluczowego enzymu fotosyntezy – rubisco, rola fotooddychania oraz metabolizmu cukrów w roślinach rosnących w zmiennych warunkach środowiska, różnorodność porostów czy zbiorowisk roślinnych występujących na terenach obszarów chronionych oraz na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. W tomie przedstawiono wiele przykładów dostosowań roślin do wzrostu i rozwoju w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego. Została również zasygnalizowana problematyka paleobotaniczna, dotycząca wpływu osadnictwa człowieka na szatę roślinną.

Życząc Państwu miłej lektury, mamy nadzieję, że monografia przyczyni się do owocnej dyskusji, kontynuacji interdyscyplinarnych badań nad bioróżnorodnością lub określenia nowych interesujących kierunków badań w tym zakresie.

Andrzej Bajguz, Iwona Cierieszko

1 Regulacja karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco) w odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych

Grzegorz Jackowski* / Magda Grabsztunowicz / Małgorzata Baranek

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Fizjologii Roślin

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań
*e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Streszczenie

Liczne dane dowodzą, że Rubisco podlega bardzo precyzyjnej regulacji w odpowiedzi na krótko- i długoterminowe zmiany czynników środowiskowych, a także zmieniający się kontekst ontogenetyczny. Wydarzenia regulacyjne uruchamiane w odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych, włączając w nie zastąpienie warunków komfortowych stresowymi, mogą polegać na modulacji zawartości Rubisco poprzez zmiany intensywności syntezy i degradacji obu podjednostek, względnie na modulacji aktywności karboksylacyjnej gotowych cząstek enzymu. Niniejsza praca stanowi przegląd stanu wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań wydarzeń regulacyjnych, którym podlega Rubisco, z uwzględnieniem wyników najnowszych dokonań w zakresie poznania struktury i funkcji tego enzymu.

Słowa kluczowe: aktywność karboksylacyjna, degradacja, mniejsza podjednostka Rubisco, większa podjednostka Rubisco, transkrypcja

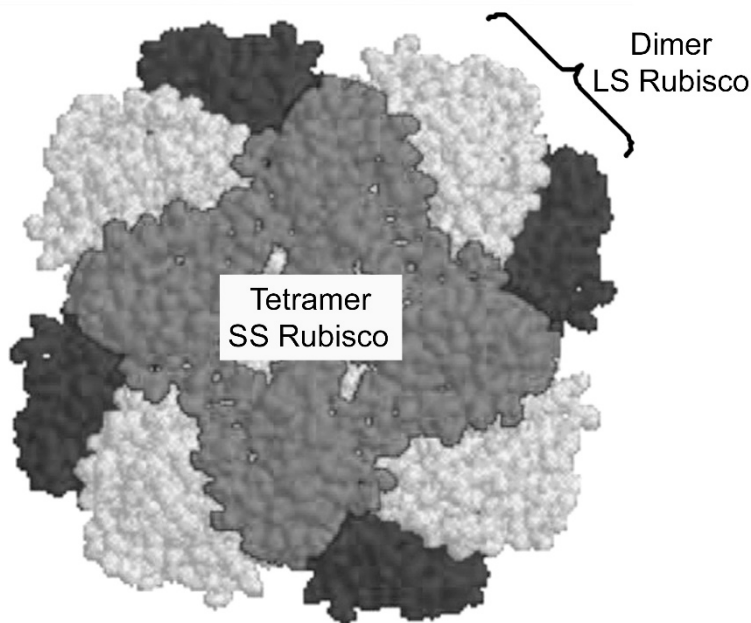
1.1. Wstęp

Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco, EC 4.1.1.39) jest najobficiej reprezentowanym białkiem w biosferze. Szacuje się, że enzym ten stanowi 0,2% wszystkich obecnych na Ziemi białek (Ellis, 1979), a u roślin typu C_3 Rubisco stanowi od 30% do 50% całkowitej puli rozpuszczalnych białek liścia; w enzymie tym zakumulowane jest także 25% całkowitej puli azotu liścia (Ellis, 1979). Rubisco katalizuje karboksylację cząsteczki rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP), co stanowi pierwszą reakcję fazy ciemnej fotosyntezy (Ellis, 1979) oraz oksigenację RuBP (Boves i in., 1971). Jeden z produktów oksigenacji RuBP podlega złożonej sekwencji reakcji składających się na cykl fotooddechowy (Chollet, 1997). Obecność Rubisco została potwierdzona w odniesieniu do większości organizmów autotroficznych, wliczając w nie: archeony, bakterie fotosyntetyczne, bakterie chemolitoautotroficzne, cyjanobakterie, eukariotyczne glony oraz rośliny wyższe.

Cząstki Rubisco są najczęściej multimerami zbudowanymi z dwóch typów podjednostek: większych (LS-large subunit, ok. 50 kDa) oraz mniejszych (SS-small subunit, ok. 13 kDa) (Whitney i in., 2011). W przypadku pewnej liczby gatunków, obie podjednostki zostały zsekwencjonowane, a ponadto udało się poznać struktury krystaliczne holokompleksu Rubisco (zostały one zdeponowane w bazach NCBI oraz PDB). Najczęściej spotykaną wersją Rubisco, obecną u roślin wyższych (ale także u większości fotoautotroficznych bakterii, cyjanobakterii, glonów niezielonych oraz krasnorostów) jest heksadekamer zbudowany z ośmiu dużych oraz ośmiu małych podjednostek, określanej jako forma I Rubisco (Ryc. 1.1.). Analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowych obu podjednostek Rubisco zaklasyfikowanych jako forma I doprowadziły do wyróżnienia w jej obrębie dwóch podtypów: „zielonego” oraz „czerwonego”, które dodatkowo podzielone zostały na dwie mniejsze grupy. W ramach podtypu „zielonego” wyróżnia się, między innymi, grupę I B charakterystyczną dla roślin wyższych, glonów zielonych i niektórych cyjanobakterii.

W heksadekamerze formy I Rubisco podjednostki LS są odpowiedzialne za aktywność karboksylacyjną – grupują się w cztery pary, w obrębie których każda z podjednostek jest zorientowana przeciwległe względem partnera. Wewnątrz każdej pary istnieją dwa centra katalityczne współtworzone przez reszty aminokwasowe należące do obu oddziaływujących ze sobą podjednostek (Whitney i in., 2011). Cztery dimery LS budują rdzeń holokompleksu, na którego biegunach zlokalizowane są dwa tetrameryczne pierścienie utworzone przez cząsteczki podjednostek SS Rubisco (Andersson, Backlund, 2008). Holokompleks Rubisco szpinaku ma kształt cylindra o średnicy $\sim 110 \text{ \AA}$ i wysokości $\sim 100 \text{ \AA}$ (Liu i in., 2010), przez wnętrze

którego przechodzi hydrofilny kanał zapewniający wystarczającą ilość miejsca niezbędnego dla otwierania i zamykania centrów katalitycznych w trakcie przeprowadzania reakcji enzymatycznej (Esquivel i in., 2013). Strukturę formy I Rubisco zapisuje się w jako $(L_2)_4(S_4)_2$, a całkowita masa cząsteczkowa holokompleksu została określona jako ok. 550 kDa (Tabita, 1999).



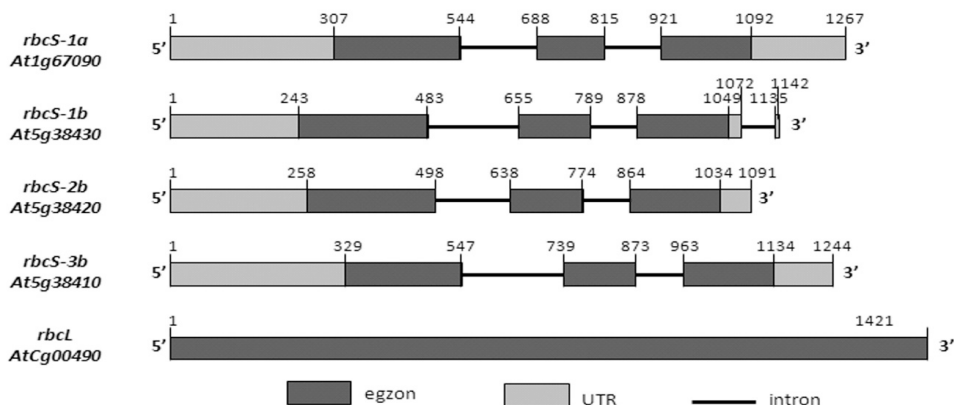
Rycina 1.1. Struktura krystaliczna Rubisco szpinaku (*Spinacia oleracea*)

Objaśnienia:

Rubisco szpinaku reprezentuje formę I, podtyp „zielony”, grupę IA. PDB ID: 1RCX

Jakkolwiek centra katalityczne są zlokalizowane w obrębie podjednostek LS, to nie ma wątpliwości, że podjednostki SS w istotny sposób wpływają na funkcje katalityczne holokompleksu. Wskazują na to wyniki doświadczeń dowodzące, że aktywność karboksylacyjna chimerycznych cząstek Rubisco, składających się z podjednostek LS ryżu oraz SS pochodzących z sorgo jest zmieniona w porównaniu z aktywnością karboksylacyjną natywnego Rubisco ryżu (Ishikawa i in., 2011). Z kolei aktywność kompleksu $(L_2)_4$, powstałego przez całkowite usunięcie podjednostek SS z holokompleksu Rubisco cyjanobakterii *Synechococcus*, okazała się o kilka procent niższa niż natywnego holokompleksu, a ponowne przyłączenie podjednostek SS do rdzenia pozwala w pełni odtworzyć aktywność katalityczną enzymu (Andrews, Ballment, 1983).

W genomie *Arabidopsis thaliana* obecne są cztery geny kodujące SS określane jako: *rbcS-1a*, *rbcS-1b*, *rbcS-2b* oraz *rbcS-3b* (Spreitzer, Salvucci, 2002) (Ryc. 1.2.). Geny te różnią się strukturą pierwszorzędową, przy czym: *rbcS-1b*, *rbcS-2b* oraz *rbcS-3b* wykazują wysokie (na poziomie ponad 95%) podobieństwo sekwencji nukleotydowej oraz długości zarówno egzonów, jak i intronów; *rbcS-1a* jest natomiast mniej podobny do każdego spośród *rbcS1-3b* niż poszczególne *rbcS1-3b* między sobą (Dean i in., 1989). Gen kodujący LS Rubisco (*rbcL*) jest u *A. thaliana* reprezentowany przez pojedynczą kopię nieposiadającą intronów, wchodzącą w skład genomu chloroplastowego, ale całkowita liczba kopii *rbcL* przypadająca na komórkę jest wyższa, co wynika ze znacznej liczby chloroplastów zlokalizowanych na jej terytorium oraz obecności wielu kopii genomu w każdym z chloroplastów (Gutierrez, Gatenby, 1995).



Rycina 1.2. Struktura genów kodujących podjednostkę SS (*rbcS-1a*, *rbcS-1b*, *rbcS-2b*, *rbcS-3b*) oraz genu kodującego podjednostkę LS Rubisco *Arabidopsis thaliana*

Objaśnienia:

UTR – odcinek kodujący rejon mRNA niepodlegający translacji

Źródło: dane elektroniczne, tryb dostępu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Cząstki Rubisco należące do formy I katalizują reakcję karboksylacji (polegającą na przyłączeniu cząsteczki CO₂ do cząsteczki RuBP) po uprzedniej aktywacji, która polega na wolnej i odwracalnej karbamylacji, tzn. przyłączeniu dodatkowej (niebędącej substratem) cząsteczki CO₂ do ε-aminowej grupy konserwatywnej reszty lizyny, zlokalizowanej w centrum katalitycznym enzymu; w przypadku szpinaku jest to Lys 201 (Lorimer, 1981). Na skutek przyłączenia się CO₂ do reszty lizyny

powstaje karbaminian, który poprzez szybką reakcję przyłączenia Mg^{2+} tworzy dodatnio naładowany związek chelatowy, dzięki czemu enzym staje się aktywny katalitycznie (Lorimer, Mizioro, 1980). Do zaktywowanej cząstki holokompleksu Rubisco wiąże się cząsteczka RuBP. Karboksylacja RuBP jest reakcją wieloetapową, która rozpoczyna się od enolizacji substratu związanego z centrum katalitycznym Rubisco. W wyniku tej reakcji dochodzi do wytworzenia nietrwałego endiolowego metabolitu pośredniego, który następnie reaguje z cząsteczką CO_2 , co prowadzi do wytworzenia nietrwałego produktu pośredniego hydratowanego, następnie do dwóch cząsteczek kwasu 3-fosfoglicerynowego (3-PGA). Cząsteczki 3-PGA są kierowane do cyklu Calvina, a jego metabolity zostają wykorzystane zarówno do syntezy skrobi, jak i regeneracji RuBP.

Rola, jaką spełnia Rubisco w metabolizmie organizmów fotoautotroficznych jest tak istotna, że zarówno zawartość, jak i aktywność karboksylacyjna tego enzymu podlega precyzyjnej i złożonej regulacji w odpowiedzi na fluktuacje czynników środowiskowych i na zmieniającą się sytuację ontogenetyczną.

1.2. Regulacja Rubisco w odpowiedzi na zmianę czynników środowiskowych innych niż natężenie światła

1.2.1. Zmiany zawartości Rubisco

Regulacja Rubisco polegająca na zmianie zawartości enzymu dotyczy zarówno syntezy, jak i degradacji obu podjednostek Rubisco i może rozgrywać się na wszystkich etapach biosyntezy białka: transkrypcji, translacji oraz wydarzeń potranslacyjnych.

W odniesieniu do regulacji na poziomie transkrypcji, zmiany natężenia czynników środowiskowych mogą, w zależności od kierunku tych zmian, powodować zarówno wzmocnienie, jak i osłabienie aktywności transkrypcyjnej genów kodujących obydwie podjednostki. Wzmocnienie transkrypcji *rbcL* i *rbcS* obserwowano na przykład w trakcie ekspozycji sosny alpejskiej na podwyższone stężenie ozonu (Peloux i in., 2001), a także u tego samego gatunku sosny i w liściach roślin *Arabidopsis thaliana* poddanych stresowi suszy (Williams i in., 1994, Peloux i in., 2001). Z kolei długoterminowa hodowla roślin *Arabidopsis thaliana* w warunkach podwyższonego stężenia CO_2 skutkuje znacznym obniżeniem zawartości holokompleksu Rubisco, które wynika z zahamowania transkrypcji genów obu podjednostek (Cheng i in., 1998).

Przykładem zaangażowania translacji w regulację zawartości Rubisco jest obniżenie wydajności translacji mRNA podjednostki LS zaobserwowane u siewek grochu (*Pisum sativum*), które poddawano trwającej do 2 dni ekspozycji na uzupełniające promieniowanie UV-B (Mackerness i in., 1997). Wydaje się prawdopodobne, że mechanizmy regulujące zawartość Rubisco na poziomie translacji, uruchamiane mogą być w odpowiedzi na różnorodne stresy środowiskowe, których wspólnym mianownikiem jest promowanie wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT). Uważa się bowiem, że nagromadzenie RFT skutkuje zmianami w statusie redoks puli glutationu komórki, czego konsekwencją jest zahamowanie translacji mRNA LS Rubisco (Irihimovitch, Shapira, 2000).

Wśród potranslacyjnych mechanizmów regulujących zawartość Rubisco wymienia się cały szereg wydarzeń obejmujących agregację i/lub degradację (beenzymatyczną lub enzymatyczną) podjednostki LS Rubisco. Jednym z lepiej scharakteryzowanych mechanizmów regulujących zawartość Rubisco, poprzez wydarzenia mające charakter potranslacyjny, jest fragmentacja beenzymatyczna LS, czynnikiem promującym którą są RFT. W przypadku inkubacji oczyszczonego Rubisco w środowisku wytwarzającym generującym rodnik hydroksylowy w reakcji Fentona (a reakcja ta może zachodzić w odpowiedzi na różnorodne stresy środowiskowe) dochodzi do miejscowo specyficznego cięcia podjednostki LS w sąsiedztwie Gly-239 (Ishida i in., 1999). Sądzi się, że miejsce to wiąże z wysoką efektywnością jony Fe^{2+} , w obecności których dochodzi do lokalnej akumulacji rodnika hydroksylowego w wyniku reakcji Fentona (Luo i in., 2002). W literaturze światowej znajdują się ponadto stosunkowo liczne przykłady wskazujące na to, że jednym z potranslacyjnych mechanizmów regulujących zawartość Rubisco jest degradacja podjednostki LS katalizowana przez proteazy (= degradacja enzymatyczna). Przykłady te obejmują wyniki badań polegających na inkubacji *in vitro* lizatów chloroplastów lub oczyszczonych preparatów Rubisco w warunkach naśladujących działanie *in vivo* różnorodnych czynników stresowych, takich jak np. podwyższona temperatura (liście ryżu – Bose i in., 1999 oraz liście pszenicy – Zhang i in., 2005). Wskazano, że kluczową rolę w enzymatycznej degradacji LS Rubisco najprawdopodobniej odgrywają RFT poprzez indukowanie oksydacyjnych modyfikacji struktury podjednostki LS, których skutkiem jest podwyższenie jej podatności na atak proteaz (Desimone i in., 1996).

Dowodzono, że degradacja LS Rubisco, do jakiej dochodzi w odpowiedzi na działanie niektórych czynników stresowych, może być poprzedzona powstaniem agregatów białko-białko z udziałem LS (jako skutek wprowadzenia do LS modyfikacji oksydacyjnych) oraz przemieszczaniem agregatów do błon chloroplastowych – taką sytuację obserwowano w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* poddawa-

nych stresowi solnemu (Marin-Navarro, Moreno, 2006) oraz w roślinach pszenicy i *Spirodela oligorrhiza* traktowanych jonami Cu^{2+} lub poddanych stresowi deficytu azotu (Mehta i in., 1992). Uważa się, że w tych przypadkach dopiero powstawanie międzybiałkowych agregatów z udziałem LS oraz wejście przez agregaty w kontakt z błonami nadaje LS podatność na degradację enzymatyczną. Zatem scenariusz wydarzeń regulacyjnych prowadzących do degradacji LS Rubisco może, ale nie musi obejmować etapu agregacji oraz przyłączenia się agregatów do błon chloroplastowych (błon tylakoidowych lub otoczek). Jednak scenariusz potranslacyjnych mechanizmów regulujących zawartość Rubisco może być jeszcze inny, tzn. obejmować formowanie agregatów z udziałem podjednostek LS, któremu nie towarzyszy degradacja powstałych agregatów. Sytuację taką odnotowano np. w przypadku działania wysokiego stężenia H_2O_2 na komórki *Chlamydomonas reinhardtii* (Esquivel i in., 2006). Zaobserwowano również, że niedobór azotu u *Euglena gracilis* prowadzi do formowania wysokocząsteczkowych agregatów z udziałem LS Rubisco, czemu towarzyszy przemieszczanie się wspomnianych agregatów ze stromy do błon chloroplastowych ale nie dochodzi do proteolitycznego usuwania LS (Garcia-Ferris, Moreno, 1994). Nie ustalono natomiast dalszych losów niezdegradowanych agregatów międzybiałkowych z udziałem LS. Elementem wspólnym dla każdego z opisanych powyżej scenariuszy potranslacyjnych mechanizmów regulujących zawartość Rubisco są modyfikacje oksydacyjne podjednostki LS Rubisco (których sprawcami są RFT), do jakich dochodzi *in vivo* w odpowiedzi na różnorodne stresy.

1.2.2. Zmiany aktywności karboksylacyjnej Rubisco

Formą regulacji Rubisco w odpowiedzi na działanie stresów mogą być także zmiany aktywności karboksylacyjnej tego enzymu, które nie są powiązane z modulacją zawartości białka holokompleksu.

Poznano kilka mechanizmów biorących udział w regulacji aktywności karboksylacyjnej Rubisco. Za podstawowy uważa się aktywację enzymu, czyli karbamylację odpowiedniej reszty lizyny w centrum katalitycznym holoenzymu. Jak już o tym pisano wcześniej, karbamylacja Rubisco jest odwracalnym procesem zachodzącym spontanicznie w obecności CO_2 i Mg^{2+} . Stopień karbamylacji Rubisco *in vivo* można określić eksperymentalnie. Wykorzystuje się do tego pomiary tzw. aktywności karboksylacyjnej początkowej, tzn. mierzonej w ekstrakcie enzymatycznym liści bezpośrednio po jego sporządzeniu, którą porównuje się następnie z tzw. aktywnością karboksylacyjną całkowitą, tj. mierzoną po wcześniejszej inkubacji ekstraktu enzymatycznego w wysycającym stężeniu CO_2 i Mg^{2+} . Iloraz wartości aktywności początkowej i całkowitej – określany w literaturze światowej jako stan aktywacji

Rubisco – jest właśnie miarą tego, jak wiele spośród dostępnych centrów katalitycznych Rubisco jest karbamylowanych *in vivo* (Parry i in., 2008). Między innymi analizy *in vitro* aktywności karboksylacyjnych Rubisco pochodzących z liści tytoniu, bawełny i szpinaku wykazały znaczne obniżenie stanu aktywacji enzymu wraz ze wzrostem temperatury (Crafts-Brandner, Salvucci, 2000; Yamori i wsp., 2006). Stan aktywacji Rubisco istotnie obniża się także w trakcie suszy, co zanotowano np. w przypadku kilkunastu śródziemnomorskich gatunków roślin (Galmes i in., 2011) – dowiedziono, że przyczyną spadku stanu aktywacji Rubisco jest w tym przypadku obniżenie się wewnątrzchloroplastowego stężenia CO₂, spowodowane zmniejszeniem się przewodności szparkowej i przewodności komórek mezofilu.

1.3. Regulacja Rubisco w odpowiedzi na zmiany natężenia światła

1.3.1. Zmiany zawartości Rubisco

Jednym z najważniejszych czynników środowiskowych odbieranych przez rośliny jest światło. Powszechnie wiadomo, że zmiany natężenia światła uruchamiają mechanizmy regulujące Rubisco, zarówno wpływające na zawartość, jak i na aktywność enzymu. Mechanizmy te bada się stosując dwa modele eksperymentalne: model zazieleniania się etiolowanych siewek (= przejście ciemność: światło) oraz model zmiany natężenia światła, na które roślina jest ekspozycja w ciągu dnia – na wyższe lub niższe od dotychczasowego.

Wykazano, że po przeniesieniu rosnących w ciemności siewek do światła (zazielenianie), dochodzi do uruchomienia transkrypcji genów *rbcL* i *rbcS* w liściach, co prowadzi do wzrostu zawartości Rubisco. Obserwacji takich dokonano m.in. dla kukurydzy; w tym przypadku rozpoznano w promotorze genu *rbcL* miejsce wiązania dwóch czynników transkrypcyjnych (CDF1 i RPLB). Czynniki te, wiążąc się do specyficznego miejsca w promotorze genu, stymulują inicjację jego transkrypcji. Jednoznacznie stwierdzono, że powinowactwo czynników transkrypcyjnych do miejsca wiązania w promotorze znacznie wzrasta na skutek działania światła (Liere i in., 2011). Także w regionie promotorowym genu *rbcS* występują konserwatywne sekwencje DNA, które wymagają światłozależnej interakcji z czynnikiem transkrypcyjnym (HY5), aby uruchomić transkrypcję tego genu (Lopez-Ochoa i in., 2007). Dowiedziono, że w trakcie zazieleniania się roślin również wydarzenia translacyjne uczestniczą w zmianach zawartości Rubisco (np. Klein i in., 1988).

Zmiany natężenia światła, na jakie roślina jest eksponowana w ciągu dnia również prowadzą do uruchomienia procesów regulujących zawartość Rubisco, działając na poziomie transkrypcyjnym, translacyjnym i potranslacyjnym. Wykazano mianowicie, że zmiana natężenia światła z niskiego na wysokie, której poddawano połówki pojedynczych liści tytoniu, w skali 1-2 dni wywołuje wzrost akumulacji mRNA genu *rbcS* (efekt netto zmian intensywności transkrypcji oraz zmian stabilności mRNA) i związany z nim wzrost zawartości holokompleksu Rubisco (Prioul, Reyss, 1987). Jednakże kiedy komórki *Chlamydomonas reinhardtii* eksponowane na światło o niskim natężeniu traktowano światłem o natężeniu bardzo wysokim, zaobserwowano w czasie 1-4 godz. uruchomienie sekwencji wydarzeń translacyjnych i potranslacyjnych. Obejmowały one zahamowanie elongacji translacji mRNA genu *rbcL*, degradację wcześniej zsyntezowanych cząsteczek SS Rubisco, obniżenie zawartości tej podjednostki, a ostatecznie fragmentację i agregację LS Rubisco – pozostającej w nadmiarze w stosunku do swojego funkcjonalnego partnera (Cohen i in., 2005; Knopf, Shapira, 2005). Wydaje się, że uruchomienie takiego scenariusza inicjowane jest przez modyfikacje oksydacyjne obecnych na terenie stromy cząstek LS Rubisco, do których dochodzi na skutek działania światła o bardzo wysokim natężeniu.

Do niedawna bardzo niewiele wiedziano o mechanizmach regulujących zawartość Rubisco, które są uruchamiane w trakcie obniżania natężenia światła w ciągu dnia – z wysokiego na niskie, względnie z umiarkowanego na niskie, bądź z niskiego na bardzo niskie. Jedne z nielicznych informacji na ten temat wskazywały, że po upływie 1-2 dni po zmianie natężenia światła z niskiego na bardzo niskie dochodziło do istotnego obniżenia zawartości holokompleksu Rubisco tytoniu, wywołanego spadkiem poziomu mRNA genu *rbcS* (Prioul, Reyss, 1988). Stan wiedzy na ten temat został znacząco rozszerzony w bieżącym roku, dzięki wynikom uzyskanym przez nasz zespół badawczy. Ustaliliśmy, że długoterminowa zmiana natężenia światła z umiarkowanego na niskie prowadzi do odwracalnej eliminacji strukturalno-funkcjonalnej części puli Rubisco, poprzez stymulację modyfikacji oksydacyjnych prowadzących do powstawania agregatów międzybiałkowych z udziałem LS Rubisco. Pula ta jest prawdopodobnie nadmiarowa w zmienionych warunkach oświetleniowych. Większość agregatów ulega upłynnieniu, kiedy tylko dochodzi do ponownej ekspozycji na światło o umiarkowanym natężeniu. Odwracalna stymulacja akumulacji agregatów międzybiałkowych zawierających LS Rubisco – bez degradacji zagregowanych cząsteczek – może być traktowana jako nowa dla nauki strategia przetrwania umiarkowanego stresu, jakim jest ekspozycja na światło o niskim natężeniu (Grabsztunowicz i in., 2015).

1.3.2. Zmiany aktywności karboksylacyjnej Rubisco

W trakcie zazieleniania siewek pszenicy oraz rzodkiewnika obserwuje się wzrost aktywności karboksylacyjnej Rubisco, który najprawdopodobniej realizowany jest przez podwyższenie stanu aktywacji Rubisco (Salvucci i in., 1987). Wykazano także, że zmianie natężenia światła w ciągu dnia z niskiego lub umiarkowanego do bardzo wysokiego towarzyszą zmiany w aktywności karboksylacyjnej Rubisco, które polegają bądź na wzroście obu: początkowej i całkowitej aktywności karboksylacyjnej enzymu, bez zmiany stanu aktywacji enzymu (Prioul, Reyss, 1987), bądź jedynie aktywności początkowej, czemu towarzyszy wzrost stanu aktywacji (Brooks, Portis, 1988). Wyniki naszych badań (Grabsztunowicz i wsp., 2015) wskazują, że stymulowane przez zmianę natężenia światła z umiarkowanego na niskie powstawanie międzybiałkowych agregatów z udziałem podjednostki LS prowadzi do obniżenia obu aktywności karboksylacyjnych, bez zmiany stanu aktywacji enzymu. Ponowna ekspozycja na światło o umiarkowanym natężeniu w znacznym stopniu przywraca wyjściowe wartości obydwu aktywności.

Powyższy przegląd stanu wiedzy nie prowadzi do wskazania uniwersalnej sekwencji wydarzeń regulacyjnych, jakim miałyby podlegać Rubisco w odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych. Istnieje wiele mechanizmów regulacyjnych, a przebieg wydarzeń molekularnych różnić się może bardzo znacząco w zależności od gatunku i rodzaju czynnika środowiskowego, który podlega zmianie.

Literatura

- Andersson I., Backlund A. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.*, 46: 275-291.
- Andrews T.J., Ballment B. 1983. The function of the small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 258: 7514-7518.
- Bose A., Tiwari B.S., Chattopadhyay M.K., Gupta S., Ghosh B. 1999. Thermal stress induces differential degradation of Rubisco in heat-sensitive and heat-tolerant rice. *Physiol. Plant.*, 105: 89-94.
- Brooks A., Portis A.R. 1988. Protein-bound ribulose biphosphate correlates with deactivation of ribulose biphosphate carboxylase in leaves. *Plant Physiol.*, 87: 244-249.
- Cheng S.H., Moore B.D., Seemann J.R. 1998. Effects of short- and long term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Plant Physiol.*, 116: 715-723.
- Chollet R. 1977. The biochemistry of photorespiration. *Trends Biochem. Sci.*, 2: 155-159.

- Cohen I., Knopf J.A., Irihimovitch V., Shapira M. 2005. A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiol.*, 137: 738-746.
- Crafts-Brandner S.J., Salvucci M.E. 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 13429-13435.
- Dean C., Pichersky E., Dunsmuir P. 1989. Structure, evolution, and regulation of RbcS genes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 415-439.
- Desimone M., Henke A., Wagner E. 1996. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol.*, 111: 789-796.
- Ellis R.J. 1979. The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.*, 4: 241-244.
- Esquivel M.G., Genkov T., Nogueira A.S., Salvucci M.E., Spreitzer R.J. 2013. Substitutions at the opening of the Rubisco central solvent channel affect holoenzyme stability and CO₂/O₂ specificity but not activation by Rubisco activase. *Photosynth. Res.*, 118: 209-218.
- Esquivel M.G., Pinto T.S., Marin-Navarro J., Moreno J. 2006. Substitution of Tyrosine Residues at the Aromatic Cluster around the β A- β B Loop of Rubisco Small Subunit Affects the Structural Stability of the Enzyme and the in Vivo Degradation under Stress Conditions. *Biochemistry*, 45: 5745-5753.
- Galmes J., Ribas-Carbo M., Medrano H., Flexas J. 2011. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J. Exp. Bot.*, 62: 653-665.
- Garcia-Ferris C., Moreno J. 1994. Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta*, 193: 208-215.
- Grabsztunowicz M., Górski Z., Lucinski R., Jackowski G. 2015. A reversible decrease in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase carboxylation activity caused by the aggregation of the enzyme's large subunit is triggered in response to the exposure of moderate irradiance-grown plants to low irradiance. *Physiol. Plant.*, 154: 591-608.
- Gutteridge S., Gatenby A.A. 1995. Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation. *Plant Cell*, 7: 809-819.
- Irihimovitch V., Shapira M. 2000. Glutathione Redox Potential Modulated By Reactive Oxygen Species Regulates Translation of Rubisco Large Subunit in The Chloroplast. *J. Biol. Chem.*, 275: 6289-16295.
- Ishida H., Makino A., Mae T. 1999. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J. Biol. Chem.*, 274: 5222-5226.

- Ishikawa C., Hatanaka T., Misoo S., Miyake C., Fukayama H. 2011. Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of rubisco in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 156: 1603-1611.
- Klein R.R., Mason H.S., Mullet J.E. 1988. Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA* and *rbcl* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell Biol.*, 106: 289-301.
- Knopf J.A., Shapira M. 2005. Degradation of Rubisco SSU during oxidative stress triggers aggregation of Rubisco particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 222: 787-793.
- Liere K., Weihe A., Börner T. 2011. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J. Plant Physiol.*, 168: 1345-1360.
- Liu C., Young A.L., Starling-Windhof A., Bracher A., Saschenbrecker S., Rao B.V., Rao K.V., Berninghausen O., Mielke T., Hartl F.U., Beckmann R., Hayer-Hartl M. 2010. Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco. *Nature*, 463: 197-202.
- López-Ochoa L., Acevedo-Hernández G., Martínez-Hernández A., Argüello-Astorga G., Herrera-Estrella L. 2007. Structural relationships between diverse *cis*-acting elements are critical for the functional properties of a *rbcs* minimal light regulatory unit. *J. Exp. Bot.*, 58: 4397-4406.
- Lorimer G.H., Mizioro H.M. 1980. Carbamate formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebiphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistr*, 19: 5321-5328.
- Lorimer G.H. 1981. Ribulosebiphosphate carboxylase: amino acid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. *Biochemistry*, 20: 1236-1240.
- Luo S., Ishida H., Makino A., Mae T. 2002. Fe²⁺-catalyzed Site-specific Cleavage of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Close to the Active Site. *J. Biol. Chem.*, 277: 12382-12387.
- Mackerness S.A.H., Thomas B., Jordan B.R. 1997. The effect of supplementary ultraviolet-B radiation on mRNA transcripts, translation and stability of chloroplast proteins and pigment formation in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.*, 48: 729-738.
- Marin-Navarro J., Moreno J. 2006. Cysteines 449 and 459 modulate the reduction–oxidation conformational changes of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase and the translocation of the enzyme to membranes during stress. *Plant Cell Environ.*, 29: 898-908.
- Mehta R.A., Fawcett T.W., Porath D., Mattoo A.K. 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 267: 2810-2816.
- Parry M.A.J., Keys A.J., Madgwick P.J., Carmo-Silva A.E., Andralojc P.J. 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J. Exp. Bot.*, 59: 1569-1580.

- Pelloux J., Jolivet Y., Fontaine V., Banvoy J., Dizengremel P. 2001. Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant Cell Environ.*, 24: 123-131.
- Prioul J.L., Reyss A. 1987. Acclimation of ribulose-bisphosphate carboxylase and mRNAs to changing irradiance in adult tobacco leaves. Differential expression in LSU and SSU mRNA. *Plant Physiol.*, 84: 1238-1243.
- Salvucci M.E., Portis A.R.Jr., Heber U., Ogren W.L. 1987. Stimulation of thylakoid energization and ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in *Arabidopsis* leaves by methyl viologen. *FEBS Lett.*, 221: 215-220.
- Spreitzer R.J., Salvucci M.E. 2002. Rubisco: interactions, associations and the possibilities of a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 449-475.
- Tabita F.R. 1999. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynth. Res.*, 60: 1-28.
- Whitney S.M., Houtz R.L., Alonso H. 2011. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol.*, 155: 27-35.
- Williams J., Bulman M.P., Neill S.J. 1994. Wilt-induced ABA biosynthesis, gene-expression and down-regulation of *rbsS* messenger-RNA levels in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 91: 177-182.
- Yamori W., Suzuki K., Noguchi K., Nakai M., Terashima I. 2006. Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant Cell Environ.*, 29: 1659-1670.
- Zhang L.F., Rui Q., Xu L.L. 2005. Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Wheat Leaves. *J. Integr. Plant Biol.*, 47: 60-66.

2 Rola fotooddychania w kontroli odpowiedzi roślin na zmiany środowiskowe

Wioleta Wasilewska / Tomasz Krupnik / Maksymilian Zienkiewicz
Barbara Michalak / Elżbieta Romanowska*

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii, Instytut Botaniki
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
*e-mail: romanela@biol.uw.edu.pl

Streszczenie

Fotooddychanie jest procesem zachodzącym podczas fotosyntezy, w którym tlen jest pobierany, a dwutlenek węgla wydzielany. Fotooddychanie jest wynikiem oksygenacji rybulozo 1,5 bisfosforanu, reakcji katalizowanej przez enzym Rubisco. Szacuje się, że 30-50% zasymilowanego węgla jest uwalniane podczas jego przebiegu. Obecnie sądzi się, że proces ten stanowi ważną część odpowiedzi roślin na stres, gdyż prowadzi do optymalizacji fotosyntezy poprzez ograniczenie produkcji reaktywnych form tlenu. Fotooddychanie integruje też metabolizm chloroplastów, peroksyosomów, mitochondriów i cytozolu. Reakcje fotooddechowe mogą bezpośrednio lub pośrednio zużywać nadmiar czynników redukcyjnych oraz utrzymywać optymalne stężenie ATP, co warunkuje homeostazę komórek. Ponadto, poprzez wytwarzanie H_2O_2 , fotooddychanie uczestniczy w transdukcji sygnałów oraz moduluje ekspresję genów, co może być korzystne dla roślin w warunkach stresowych, np. wysokiego natężenia światła, suszy, zasolenia, chłodu, jak również przy niskim stężeniu CO_2 . Zużywanie nadmiaru siły redukcyjnej zapobiega też uszkodzeniu aparatu fotosyntetycznego przez stres oksydacyjny. Różnorodność funkcji peroksyosomów, w zależności od rodzaju tkanek roślin wyższych, mogła doprowadzić do powstania różnych grup metabolicznych takich jak rośliny C3, CAM i C4.

Słowa kluczowe: fotooddychanie, rośliny C3 i C4, reaktywne formy tlenu, stres

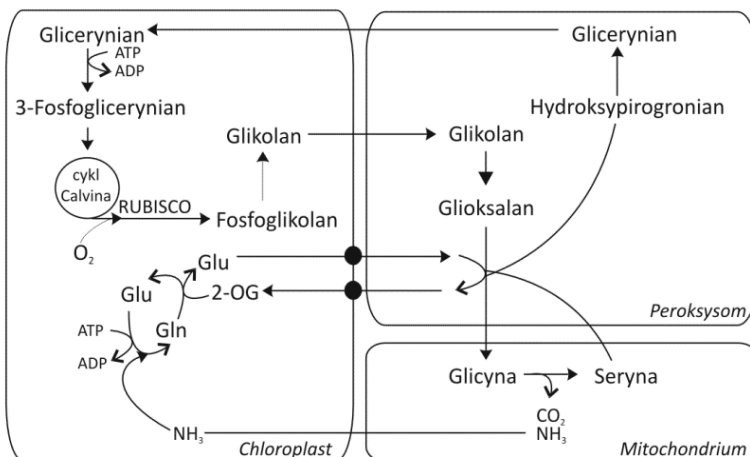
2.1. Fotooddychanie jako kluczowy proces metaboliczny

Fotooddychanie jest procesem, który zachodzi u wszystkich organizmów prowadzących fotosyntezę oksygeniczną, i jest jedną z głównych dróg przemian węgla w biosferze. Fotooddychanie sprzężone jest z fotosyntetycznym redukcyjnym cyklem węgla i jest wynikiem oksygenacji przeprowadzanej przez kluczowy chloroplastowy dwufunkcyjny enzym Rubisco, który może wiązać CO_2 lub O_2 . W fotooddychaniu, z dwóch cząsteczek powstającego toksycznego fosfoglikolanu, w wyniku wielu przemian, odtwarzany jest fosfoglicerynian, uwalniany jest CO_2 i tracona jest energia (Edwards, Walker 1983). Stosunek szybkości karboksylacji/oksygenacji rybulozobisfosforanu (RuBP) zależy od stężeń obu gazowych substratów (CO_2 i O_2) oraz kinetycznych parametrów Rubisco (Jorgan, Ogren 1984). Szacuje się, że w roślinach rosnących w atmosferze o normalnym składzie, intensywność reakcji karboksylacji przewyższa ok. 2,5-3-krotnie intensywność reakcji oksygenacji. Jeżeli natomiast stężenie obu gazów byłoby jednakowe, karboksylacja zachodziłaby ok. 80 razy szybciej niż reakcja utleniania. Fotooddychanie występuje u roślin wiążących dwutlenek węgla za pośrednictwem tylko cyklu Calvina (rośliny C3). Proces ten jest silnie obniżony lub nie zachodzi u roślin C4.

Rośliny wykształciły wiele mechanizmów ograniczających fotooddychanie poprzez zwiększenie stężenia CO_2 wokół Rubisco. Można wyróżnić ich trzy kategorie: (1) pompa CO_2 przy udziale PEP karboksylazy, występująca u roślin C4 i CAM; (2) zależne od energii pobieranie CO_2 , występujące u glonów, niektórych mszaków i wodnych roślin nasiennych; (3) lokalizacja fotooddychowego wydzielania CO_2 w takich częściach rośliny, aby jego stężenie wzrastało 3-4 razy w porównaniu z komórkami mezofilu (Sage 2013). W liściach roślin C4 występują dwa typy komórek uczestniczące w wiązaniu CO_2 : komórki mezofilu (M) i komórki otaczające wiązkę przewodzącą (BS), o chloroplastach różniących się od siebie cechami ultrastruktury, a także aktywnością biochemiczną i fizjologiczną. Tylko w chloroplastach komórek BS zachodzi cykl Calvina-Bensona i występuje Rubisco, zaś pierwotne wiązanie CO_2 odbywa się w komórkach mezofilu (Hatch 1992). Ehleringer i in. (1991) uważają, że szlak metaboliczny C4 powstał jako odpowiedź na obniżenie stężenia CO_2 w atmosferze. Dokonało się to przy udziale pompy biochemicznej C4, poprzez zwiększenie stężenia CO_2 (10-30 razy) w miejscu działania Rubisco (Sage 2013). Ponadto rozwinięty przez rośliny C4 mechanizm koncentracji dwutlenku węgla pozwala na wydajne przeprowadzanie fotosyntezy w warunkach niskiego stężenia CO_2 , wysokich natężeń światła, podwyższonej temperatury i suszy. Związane jest to z ograniczeniem oksygenazowej aktywności Rubisco (Jordan, Ogren 1984). Zatem metabolizm C4 jest kompleksową adaptacją drogi C3, prowa-

dzącą do zahamowania procesu fotooddychania (o ok. 90%). U roślin CAM, gdzie fotooddychanie jest znacznie obniżone, stężenie CO₂ może wzrastać w tkankach liścia od 0,8 do 2,5% – w fazie dekarboksylacji jabłczanu (Borland i in. 2000). Współczynnik powinowactwa substratowego (SF) jest podobny u roślin wyższych o różnych typach metabolizmu węgla, wartość SF jest szczególnie niska u fotosyntetyzujących bakterii, zaś u termofilnych krasnorostów jest bardzo wysoka. Różnice w SF wynikają z różnych form strukturalnych Rubisco. Ze względu na kluczową rolę tego białka w fotosyntezie, od wielu lat prowadzone są badania molekularne nad mechanizmami odpowiedzialnymi za regulację biosyntezy i aktywności oraz nad poprawą parametrów kinetycznych enzymu. Istnieje silny związek aktywności Rubisco z zawartością ATP/ADP, jak i ze stanem redoks chloroplastów, dlatego też zwiększenie asymilacji CO₂ poprzez modyfikację enzymu jest trudne. Stwierdzono, że mechanizm koncentrujący CO₂ ogranicza reakcję oksygenacji, jednak pozostaje bez większego wpływu zarówno na ilość, jak i aktywność enzymu. Ponadto, nadekspresja enzymów cyklu Calvina nie wpływa na zawartość i aktywność Rubisco. Dlatego, jak dotąd, nie udało się uzyskać rośliny transgenicznej posiadającej bardziej wydajny enzym. Fotosyntetyczna produktywność roślin C₄ jest 1,5-2 razy wyższa niż u roślin C₃, stąd też prowadzone są intensywne badania nad obniżeniem natężenia fotooddychania. Wykorzystuje się inżynierię genetyczną do uzyskania roślin typu C₄ z roślin C₃, np. z ryżu lub innych gatunków roślin C₃ ważnych gospodarczo, ze względu na produkcję żywności.

W pierwotnej atmosferze stężenie tlenu było bardzo niskie, natomiast dwutlenku węgla – przynajmniej 100 razy wyższe niż obecnie (Buick 2008). Od momentu, gdy ok. 2,6 mld lat p.n.e. – wyewoluowały pierwsze organizmy prowadzące fotosyntezę oksygeniczną, poziom O₂ w atmosferze stopniowo zwiększał się, natomiast stężenie CO₂ ulegało obniżeniu. Uważa się, że fotooddychanie jest adaptacją związaną z pojawieniem się tlenu. Proces ten sprzyjał zwiększeniu aktywności oksygenazowych Rubisco i miał wpływ na ewolucję procesu fotooddychania, który stał się kluczową drogą metaboliczną u roślin lądowych. Wysoka intensywność fotooddychania, związana z niskim stężeniem atmosferycznym CO₂, wysoką temperaturą, suszą czy zasoleniem była głównym czynnikiem sprzyjającym ewolucji roślin C₄. Fotooddychanie jest ściśle powiązane z wieloma szlakami metabolicznymi, szczególnie z cyklem Calvina-Bensona, metabolizmem azotowym czy oddychaniem mitochondrialnym (Bauwe i in. 2012). Fotooddychanie, poprzez transport intermediatów, łączy cztery kompartmenty komórkowe: chloroplasty, mitochondria, peroksosomy i cytozol (Ryc. 2.1).

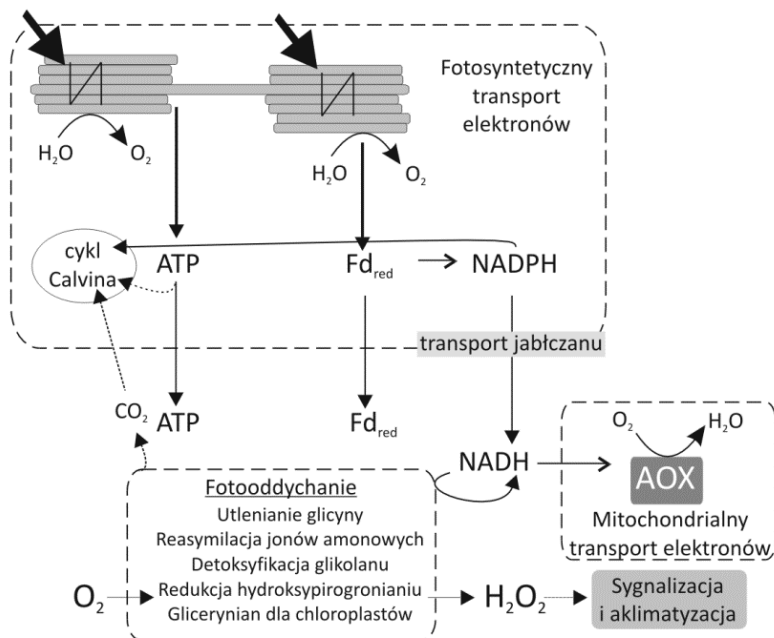


Rycina 2.1. Schemat ilustrujący reakcje zachodzące podczas fotooddychania

Objaśnienia:

Glu – glutaminian, Gln – glutamina, 2-OG – 2-oksoglutaran

Istnieje prawdopodobnie kilkanaście transporterów związanych z fotooddychaniem, choć do chwili obecnej nie zostały one szczegółowo opisane (Eisenhut i in. 2013). Transport do peroksysomów odbywa się przy udziale kanałów podobnych do poryn. Wcześniej uważano, że rola fotooddychania u roślin C4 ma charakter marginalny. Zelitch i in. 2009 pokazali, że mutanty oksydazy glikolanowej (*GO1*) kukurydzy są letalne w powietrzu, natomiast w warunkach wysokiego stężenia CO₂ wykazują prawidłowy wzrost. Fakt ten wskazuje na istotną rolę fotooddychania we wczesnych etapach rozwoju siewek, jako procesu usuwającego toksyczny glikolan, co potwierdza ważną rolę drogi utleniania węgla w tym procesie. Nie jest znane, jak wydajne jest fotooddychanie. Wydaje się, że jego intensywność zależy od gatunku rośliny, jej wieku, jak również typu komórek, w których proces ten przebiega. Współczesna nauka nie dysponuje wystarczającą wiedzą o tym, jaka jest rola fotooddychania w odpowiedzi na stres i w konsekwencji – na regulację metabolizmu komórki. Obecnie uważa się, że choć fotooddychanie powoduje straty CO₂, jest procesem korzystnym dla roślin.



Rycina 2.2. Schemat ilustrujący funkcjonowanie fotooddychania podczas stresu

Objaśnienia:

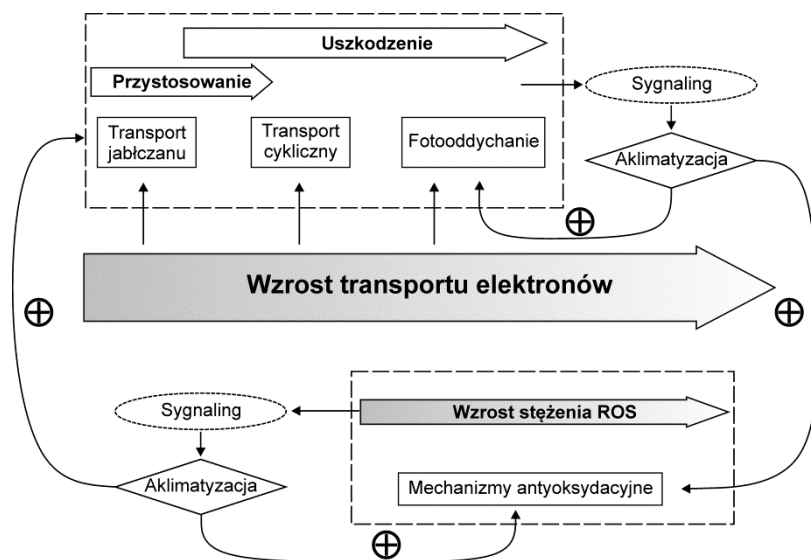
Fd – ferredoksyna, AOX – oksydaza alternatywna

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Voss i in. (2013).

W czasie suszy zamykanie aparatów szparkowych powoduje wzrost temperatury liścia i redukuje stężenie CO_2 , zwiększając fotooddychanie. W tych warunkach możliwe jest zachodzenie fotosyntezy z wykorzystaniem fotooddechowego CO_2 , ale wzrost roślin jest ograniczony. Stworzenie natomiast okoliczności hamujących fotooddychanie, stymuluje wzrost i akumulację biomasy roślin (Timm i in. 2012). Fotooddychanie jest źródłem dwóch aminokwasów: glicyny i seryny. Uważa się, że seryna w cytozolu jest głównym źródłem jednostek C1 niezbędnych do syntezy metioniny i 5-adenozylometioniny – AdoMet. AdoMet jest donorem grup metylo- wych we wszystkich znanych przekaźnikach, co ma znaczenie w wielu procesach komórkowych wymagających etapu metylacji, np. metylacja DNA i histonów, biosynteza ligniny i inne (Forni i in. 2012).

2.2. Rola fotooddychania w odpowiedzi na abiotyczne czynniki stresowe

W sytuacji, kiedy rośliny narażone są na stres, jednym z parametrów pozwalających ocenić zmiany wywołane stresem jest pojawienie się zwiększonych ilości reaktywnych form tlenu (ROS) (Ryc. 2.2) oraz kontrolujących ich poziom antyoksydantów. Reaktywne formy tlenu, generowane w komórkach i tkankach, są nie tylko produktem ubocznym wielu procesów metabolicznych, ale stanowią też ważne cząsteczki sygnałowe powstające w trakcie wzrostu i rozwoju rośliny. Wzrost stężenia ROS może prowadzić do uszkodzenia wielu elementów komórkowych. Rośliny wytwarzają szereg enzymów antyoksydacyjnych oraz antyoksydantów nieenzymatycznych zapewniających optymalne stężenie ROS w komórkach. Głównym źródłem ROS w komórkach roślinnych jest fotosyntetyczny (Ryc. 2.3) i oddechowy transport elektronów.



Rycina 2.3. Odpowiedzi stresowe związane z nadmiernym wzrostem transportu elektronów podczas fotosyntezy

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Voss i in. (2013).

W czasie fotosyntezy, ROS wytwarzane są przy ograniczonym dostępie CO_2 (np. podczas suszy i/lub wysokiego natężenia światła), a ich stężenie w komórce jest pod ścisłą kontrolą antyoksydantów. Do lepiej poznanych enzymów o funkcji przeciwutleniającej należą: dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy i peroksydazy. Do związków

ków nieenzymatycznych natomiast, zaliczamy: karotenoidy, tokoferole, glutation oraz askorbinian (Alscher i in. 1997). Oba typy związków współdziałają ze sobą w procesie usuwania reaktywnych form tlenu. Podczas fotooddychania powstaje H_2O_2 , który rozkładany jest przez katalazy. U sinic i glonów ograniczenie produkcji H_2O_2 zachodzi dzięki przemianie glikolanu do glioksalanu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glikolanową przy udziale NAD^+ . Nadtlenek wodoru syntetyzowany jest podczas fotooddychania, lecz jego rozkład przez katalazę ogranicza stres oksydacyjny będący następstwem stresów środowiskowych.

2.3. Fotooddychanie a zapobieganie nadmiernemu gromadzeniu ROS

Obniżenie stężenia CO_2 i brak $NADP^+$ lub innych akceptorów fotosystemu I (PSI) prowadzi do powstawania i gromadzenia ROS, które muszą być usunięte przez różne systemy, w tym cykl woda-woda (Asada 1999). Głównymi mechanizmami odpowiedzi fotosyntezy na stres jest: wzrost ilości akceptora elektronów, usuwanie nadmiaru ROS i/lub szybka aklimatyzacja komórki do wyższego ich stężenia (Ryc. 2.3). Przy znacznym ograniczeniu akceptora elektronów z PSI, $NADP^+$ oraz braku CO_2 wzrasta znaczenie cyklicznego transportu elektronów (CET). Jest to dobrze poznana zależność w odniesieniu do roślin C_3 (Munekage i in. 2004). CET zmniejsza wytwarzanie NADPH przy jednoczesnym zwiększaniu produkcji ATP. Zapobiega to niekontrolowanemu powstawaniu ROS, a zwiększony gradient protonów umożliwia rozpraszanie nadmiaru energii w postaci ciepła (Foyer i in. 2009). Wskazuje to na duże znaczenie CET w optymalizacji fotosyntezy w warunkach długotrwałego stresu. Natomiast przy zwiększonej produkcji NADPH powstawanie i transport jabłczanu działa jako system regulujący i modulujący stosunek NADPH/ATP, co nie ogranicza transportu elektronów i umożliwia transport czynników redukcyjnych do innych części komórki. Wykazano zależność pomiędzy fotooddychaniem a CET oraz między dekarboksylacją glicyny i aktywnością szlaku oksydazy alternatywnej (AOX) (Bykova i in. 2005). Wszystkie mechanizmy (pośrednie lub bezpośrednie) przyczyniają się do zoptymalizowanej odpowiedzi roślin na stres.

Przebieg fotosyntezy w warunkach stresowych możliwy jest dzięki usuwaniu ROS. Obok klasycznych mechanizmów usuwania ROS oraz systemu reduktaza NADPH-tioredoksyna (NTRC) (Serrato i in. 2004; Spinola i in. 2008), istnieją dowody na istnienie dynamicznego szlaku bezpośrednio usuwającego ROS w różnorodnych sytuacjach stresowych. ROS uczestniczą również w procesie sygnalizacji

komórkowej (Mittler i in. 2011), dostosowując metabolizm w zmieniających się warunkach środowiskowych.

2.4. Fotooddychanie w warunkach stresowych: podczas suszy, w warunkach zasolenia, chłodu oraz w obecności metali ciężkich

Stres wywołany suszą powoduje zamykanie się aparatów szparkowych, prowadząc do zaburzeń fotosyntetycznej asymilacji węgla oraz zmian metabolicznych (Marshall i in. 2012). W warunkach niedoboru wody, na skutek zamykania aparatów szparkowych, spada zawartość CO₂ w liściach, stymulując fotooddychanie nawet o 23-40%, które działa jako akceptor elektronów (Haupt-Herting, Fock 2002). Jest to ważny mechanizm rozpraszania nadmiaru energii, chroniący aparat fotosyntetyczny przed fotouszkodzeniem podczas suszy. Stwierdzono również, że fotooddychanie wpływa na wydajność PSII i, po ustąpieniu stresu, warunkuje szybką reaktywację fotosyntezy (Guan i in. 2004). O protekcyjnej roli fotooddychania w warunkach stresu świadczą wzrost zawartości kluczowych enzymów fotooddychowych, dekarboksylazy glicyny (GDC) i aminotransferazy seryna: glioksalan (SGAT), jak też zwiększenie stosunku Gly/Ser (Abogadallah 2011). Glicyna, syntetyzowana podczas fotooddychania, jest substratem do biosyntezy glutationu, kluczowego związku antyoksydacyjnego (Foyer, Noctor 2000). Interesujące jest, że u kukurydzy, pod wpływem suszy stwierdzono 2-3 krotny wzrost zawartości glicyny i seryny, co zwykle obserwuje się w warunkach fotooddychowych. Sicher i Barnaby (2012) sugerują, że susza zaburza działanie pompy CO₂ i aktywuje fotooddychanie nawet u roślin C₄. Konsekwencją suszy jest również wytwarzanie nadtlenu wodoru, który moduluje stan redoks (Beck i in. 2011). Zakłada się, że wówczas ponad 70% H₂O₂ produkowane jest przez fotooddychanie. H₂O₂ jest w tych warunkach główną cząsteczką sygnałową modulującą stan redoks puli antyoksydantów. Fotooddychanie staje się zatem sygnałem do adaptacji do suszy, wytwarzając nie tylko H₂O₂, ale również glicynę niezbędną do syntezy glutationu.

Zasolenie jest jednym z głównych czynników ograniczających wzrost i plonowanie roślin (Allakhverdiev i in. 2000). W takich warunkach, zarówno w roślinach C₃, jak i C₄ indukowane są mechanizmy odpowiedzialne za usuwanie soli z komórki i/lub prowadzące do zwiększenia tolerancji na stres, zwiększa się też zawartość ROS (Miller i in. 2010). Stres oksydacyjny indukowany zasoleniem prowadzi do zwiększonej peroksydacji lipidów i zmniejszonej syntezy askorbinianu i gluta-

tionu, hamuje fotosyntezę (Mittova i in. 2003). Jednocześnie obserwuje się zwiększenie zawartości glioksalanu oraz stosunku Gly/Ser, co jest wskaźnikiem stymulacji procesu fotooddychania (Parida, Das 2005). Wzrost aktywności oksydazy glikolanej (GOX) i katalazy wskazuje odpowiednio na utlenianie glikolanu i rozkład H_2O_2 . Zwiększona aktywność enzymów antyoksydacyjnych wydaje się odgrywać kluczową rolę w łagodzeniu stresu oksydacyjnego wywołanego dużym zasoleniem.

Niska temperatura, zwiększając rozpuszczalność tlenu, może stymulować proces fotooddychania (Flexas i in. 1999), powoduje wzrost zawartości ROS i indukuje enzymy antyoksydacyjne (Einset i in. 2007). Stwierdzono większą zawartość katalazy i indukcję ekspresji genów *Cat* (Cheng i in. 2007), jak też wzrost ilości GOX i reduktazy hydroksypirogronianowej (HPR) (Zhou i in. 2006).

Ekspozycja roślin na podwyższony poziom metali ciężkich powoduje zwiększenie akumulacji ROS w komórkach i stres oksydacyjny. Jeśli stężenie ROS nie jest toksyczne, może być indukowana sygnalizacja, która stymuluje proces aklimatyzacji. Wykazano, że kadm w wyższych stężeniach indukuje w peroksysomach stres oksydacyjny i przyspiesza proces starzenia (Sandalio i in. 2001). U tolerancyjnych na kadm roślin ryżu stwierdzono wzrost ekspresji genu reduktazy hydroksypirogronianowej (HPR), natomiast u roślin wrażliwych, ekspresja była obniżona (Cai i in. 2011). Wskazuje to na istotną rolę fotooddychania podczas stresu indukowanego metalami ciężkimi.

Zmiany natężenia fotooddychania podczas stresu pokazują, jaki jest udział tej drogi metabolicznej w odpowiedzi na niekorzystne czynniki środowiskowe oraz ukazują, że proces ten uczestniczy w sygnalizacji międzykomórkowej i odpowiedzi aklimatyzacyjnej roślin.

2.5. Regulacja procesu fotooddychania

Fotosynteza i fotooddychanie są najważniejszymi procesami odpowiedzialnymi za regulację stanu redoks w komórce. Fotooddychanie zaangażowane jest w produkcję NADH w mitochondriach i wykorzystanie w peroksysomach, przy jednoczesnej stymulacji eksportu NADPH i ATP z chloroplastów, ułatwiając tym samym rozpraszanie energii. To pokazuje, że fotooddychanie jest silnie sprzężone z innymi szlakami metabolicznymi (Foyer i in. 2009). Stwierdzono, wykorzystując mutanty pozbawione enzymów fotooddechowych – zarówno w chloroplastach i mitochondriach, jak i peroksysomach, że są one bardziej wrażliwe na stres (Mhamdi i in. 2010). Również zaburzenia w powstawaniu czynników redukcyjnych i ATP mogą zmieniać zawartość ROS oraz metabolizm. Zahamowanie cyklicznego

transportu elektronów stymuluje fotooddychanie poprzez obniżenie stosunku ATP/NADPH i zwiększenie stanu redoks w stromie chloroplastu. Powoduje to również obniżenie asymilacji CO₂ w warunkach wysokiego natężenia światła (Nandha i in. 2007). Stwierdzono, że mutanty oksydazy alternatywnej mają wzmożone fotooddychanie, a zahamowanie kompleksu cytochromowego bc1 hamuje utlenianie NADH w mitochondriach, obserwuje się wzrost stosunku Gly/Ser, co wskazuje na zmiany aktywności dekarboksylazy glicyny (GDC). Wynika stąd, że mutanty kompensują brak AOX wzrostem natężenia fotooddychania. Stwierdzono, że mutanty *Arabidopsis*, charakteryzujące się brakiem katalazy peroksyosomalnej (*cat2*), mają objawy stresu oksydacyjnego w warunkach normalnych, natomiast nie wykazują ich przy zwiększonym stężeniu CO₂. Wskazuje to na ważną rolę katalazy w utrzymaniu homeostazy redoks w warunkach fizjologicznych. Stwierdzono, że mutanty jęczmienia, pozbawione kompleksu GDC, charakteryzują się nadmiernym stanem redukcyjnym w chloroplastach w warunkach fotooddychanych. Fotooddychanie pełni zatem funkcję mechanizmu regulującego stan redoks w komórce (Igamberdiev i in. 2001).

2.6. Podsumowanie

Rośliny w warunkach stresowych wykorzystują wiele mechanizmów rozpraszających nadmiar energii i zapobiegających gromadzeniu się ROS (Hebbelmann i in. 2012). Fotooddychanie jest istotnym elementem systemu optymalizującego fotosyntezę w warunkach stresowych. Integrując funkcję chloroplastów, peroksyosomów, mitochondriów i cytoplazmy, uczestniczy w sygnalizacji komórkowej i wymianie metabolitów. Funkcja ta jest szczególnie ważna w warunkach zmian środowiskowych, wymagających specjalnych adaptacji i współdziałania różnorodnych systemów sygnalizacji komórkowej.

Podziękowania

Badania finansowane są z grantu NCN Opus 2012/07/B/NZ3/02917.

Literatura

Abogadallah G.M. 2011. Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Sci.*, 180: 540-547.

- Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Murata N. 2000. Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*: contribution of water channels. *Plant Physiol.*, 122: 1201-1208.
- Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.*, 100: 224-233.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygen's and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 601-639.
- Bauwe H., Hagemann M., Kern R., Timm S. 2012. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 269-275.
- Beck B., Holtgreffe S., Jung S., Wunrau C., Kandlbinder A., Baier M., Dietz K.-J., Backhausen J.E., Scheibe R. 2011. Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L (Heynh.) plants under long- and short day conditions. *Planta*, 224: 380-393.
- Borland A.M., Maxwell K., Griffiths H. 2000. Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism. [W:] Leegood R.C. Sharkey T.D., von Caemmerer S. (wyd.), *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands, 583-605.
- Buick R. 2008. When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philosoph. Transact. Royal Soc. London, ser. Biol.*, 363: 2731-2743.
- Bykova N.V., Keerberg O., Parnik T., Bauwe H., Gardeström P. 2005. Interaction between photorespiration and respiration in transgenic potato plants with antisense reduction in glycine decarboxylase. *Planta*, 222: 130-140.
- Cai Y., Cao F., Wei K., Zhang G., Wu F. 2011. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in proteins, ultrastructure and antioxidant defence enzymes in rice seedlings. *J. Hazard. Mat.*, 192: 1056-1066.
- Cheng C., Yun K.Y., Ransom H.W., Mohanty B., Bajic V.B., Jia Y., Yun S.J., Reyes B.G. 2007. An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice. *BMC Genom.*, 8: 175-192.
- Edwards G., Walker D. 1983. C3, C4: Mechanism, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell, Oxford, UK.
- Ehleringer J.R., Sage R.F., Flanagan L.B., Pearcy R.W. 1991. Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *Trends Ecol. Evol.*, 6: 95-99.
- Einset J., Winge P., Bones A. 2007. ROS signaling pathways in chilling stress. *Plant Signal. Behav.*, 2: 365-367.
- Eisenhut M., Pick T.R., Bordych C., Weber A.P. M. 2013. Towards closing the remaining gaps in photorespiration – the essential but unexplored role of transport proteins. *Plant Biol.* 15: 676-685.

- Ferni A.R., Bauwe H., Eisenhut M., Florian A., Hanson D.T., Hagemann M., Keech O., Mielewczik M., Nikoloski Z., Peterhansel C., Roje S., Sage R., Timm S., von Cammerer S., Weber A.P.M., Westhoff P. 2012. Perspectives on plant photorespiratory metabolism. *Plant Biol.* 15: 748-753.
- Flexas J., Badger M., Chow W.S., Medrano H., Osmond C.B. 1999. Analysis of the relative increase in photosynthetic O₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiol.*, 121: 675-684.
- Foyer C.H., Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.*, 146: 359-388.
- Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G. 2009. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetic, and redox signaling. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 60: 455-484.
- Guan X.Q., Zhao S.J., Li D.Q., Shu H.R. 2004. Photoprotective function of photorespiration in several grapevine cultivars under drought stress. *Photosynth.*, 42: 31-36.
- Hatch M.D. 1992. C₄ photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol.*, 33: 333-342.
- Haupt-Herting S., Fock H.P. 2002. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. *Ann. Bot.*, 89: 851-859.
- Hebbelmann I., Selinski J., Wehmeyer C., Goss T., Voss I., Mulo P., Kangasjärvi S., Aro E.M., Oelze M.L., Dietz K.J., Nunes-Nesi A., Do P.T., Fernie A.R., Talla S.K., Raghavendra A.S., Linke V., Scheibe R. 2012. Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *J. Exp. Bot.*, 63: 1445-1459.
- Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Lea P.J., Gardeström P. 2001. The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: a study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiol Plant.*, 111: 427-438.
- Jordan D.B., Ogren W.L. 1984. The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase – dependence on ribulose bisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta*, 161: 308-313.
- Marshall A., Aalen R.B., Audenaert D., Beeckman T., Broadley M.R., Butenko M., Caño-Delgado A.I., de Vries S., Dresselhaus T., Felix G., Graham N.S., Foulkes J., Granier C., Greb T., Grossniklaus U., Hammond J.P., Heidstra R., Hodgman C., Hothorn M., Inzé D., Stergaard L., Russinova E., Simon R., Skirycz A., Stahl Y., Zipfel C., De Smet I. 2012. Tackling Drought Stress: receptor-like kinases Present New Approaches. *Plant Cell*, 24: 2262-2278.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouh S., Vanderauwera S., Van Breusegen F., Noctor G. 2010. Catalases in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.*, 61: 4197-4220.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.*, 33: 453-467.

- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? Trends in Plant Sci., 16: 300-309.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. 2003. Upregulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell and Environ., 26: 845-856.
- Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. 2004. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. Nature, 429: 579-582.
- Nandha B., Finazzi G., Joliot P., Hald S., Johnson G.N. 2007. The role of PGR5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport. Biochem. Biophys. Acta, 1769: 1252-1259.
- Parida A.K., Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotox. Environ. Safety, 60: 324-349.
- Sage R.F. 2013. Photorespiratory compensation: a driver for biological diversity. Plant Biol. 15: 624-638.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C., Del Río L.A. 2001. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. J. Exp. Bot., 52: 2115-2126.
- Serrato A.J., Perez-Ruiz J.M., Spinola M.C., Cejudo F.J. 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem., 279: 43821-43827.
- Sicher R.C., Barnaby J.Y. 2012. Impact of carbon dioxide enrichment on the responses of maize leaf transcripts and metabolites to water stress. Physiol. Plant. 144: 238-253.
- Spinola M.C., Perez-Ruiz J.M., Pulido P., Kirchsteiger K., Guinea M., Gonzalez M., Cejudo F.J. 2008. NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. Physiol. Plant., 133: 516-524.
- Timm S., Mielewczik M., Florian A., Frankenbach S., Dreissen A., Hocken N., Fernie A.R., Walter A., Bauwe H. 2012. High-to-low CO₂ acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. PloS ONE, 7: e42809.
- Voss I., Sunil B., Scheibe R., Raghavendra A.S. 2012. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. Plant Biol., 15: 713-722.
- Zelitch I., Schultes N.P., Peterson R. B., Brown P., Brutnell t. P. 2009. High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. Plant Physiol., 149: 195-2204.
- Zhou S., Chen F.C., Nahashon S., Chen T. 2006. Cloning and characterization of glycolate oxidase and NADH-dependent hydroxypyruvate reductase genes in *Pachysandra terminalis*. Hort Sci., 41: 1226-1230.

3 Metabolizm cukrów w warunkach stresu zranienia

Edyta Łukaszuk* / Iwona Ciereszko**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Fizjologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
*e-mail: edyतालuk@uwb.edu.pl
**e-mail: icier@uwb.edu.pl

Streszczenie

Zranienie roślin jest czynnikiem stresowym, powstającym w wyniku zabiegów rolniczych, zgryzania przez zwierzęta i larwy owadów oraz przez czynniki abiotyczne, np. silny wiatr. W pracy przedstawiono zmiany występujące w metabolizmie węglowodanów, głównie sacharozy, w następstwie zranienia spowodowanego przez mechaniczne uszkodzenie tkanek lub żerowanie owadów i larw. Reakcja roślin na zranienie i odbudowa uszkodzonych tkanek jest skutkiem, między innymi, zwiększonej aktywności enzymów dostarczających produkty wykorzystywane do procesów naprawczych i sygnalizacji o stresie. Pod wpływem zranienia zaobserwowano znaczne zwiększenie aktywności inwertaz kwaśnych, przede wszystkim inwertazy związanej ze ścianami komórkowymi. Mechaniczne zranienie może powodować obniżenie ekspresji genów kodujących syntazę sacharozy (SuSy), indukcję genów UGPazy, natomiast aktywność enzymatyczna SuSy po zranieniu jest zmienna w zależności od badanego gatunku. Zawartość cukrów w następstwie zranienia jest zmienna, a modyfikacje metabolizmu węglowodanów wynikają prawdopodobnie ze zmian potranskrypcyjnych i potranslacyjnych białek enzymatycznych. Związki syntetyzowane z udziałem enzymów metabolizmu węglowodanów są niezbędne, między innymi, w syntezie sacharozy w cytozolu, jako związki sygnalizacyjne i energetyczne oraz donory węglowych grup glikozylowych podczas odbudowy uszkodzonych tkanek w reakcji na uszkodzenie mechaniczne lub uszkodzenia biotyczne powstałe przez zgryzanie.

Słowa kluczowe: sacharoza, inwertazy, syntaza sacharozy, uszkodzenia mechaniczne, węglowodany

3.1. Wstęp

Rośliny rosnące w naturalnym środowisku narażone są na działanie wielu niekorzystnych czynników środowiskowych. Zranienie roślin jest często spotykanym stresem, powodującym obniżenie produktywności roślin oraz redukcję jakości i ilości plonów. Uszkodzone tkanki stanowią także potencjalne miejsce ataku patogenów. Zranienia roślin powstają również na skutek działalności człowieka: zabiegów rolniczych, zbiorów, przechowywania roślin. Ponadto zgryzanie przez zwierzęta, owady, larwy i mechaniczne uszkodzenia (wiatr, deszcz, gradobicie) skutkują zranieniem roślin (León i in. 2001; Ślesak, Ślesak 2011; Łukaszuk, Ciereszko 2012a). Odpowiedź roślin na stres zranienia jest wciąż stosunkowo słabo poznana, zwłaszcza pod względem zmian w metabolizmie węglowodanów. W wyniku uszkodzenia roślin, dochodzi do uruchomienia odpowiednich reakcji zarówno w miejscu uszkodzenia (odpowiedź lokalna), jak i w miejscach oddalonych (odpowiedź systemiczna) (León i in. 2001; Łukaszuk, Ciereszko 2012a). Badania z użyciem mikromacierzy DNA wskazują, że najszybciej aktywowane są geny odpowiedzi systemicznej, związane z syntezą związków sygnalizujących o zranieniu (Roitsch 1999; Delessert i in. 2004). W dalszej kolejności ekspresji ulegają geny związane z odpowiedzią lokalną, głównie modyfikacjami ścian komórkowych dotyczącymi ich wzmocnienia poprzez lignifikację, zwiększenie wewnętrznego usieciowienia oraz syntezę metabolitów wtórnych, w tym związków fenolowych (Schwachtje, Baldwin 2008; Ślesak, Ślesak 2011). Zranienie bardzo szybko powoduje syntezę polisacharydu kalozy we floemie, natomiast nie zaobserwowano, aby było to skorelowane ze zwiększoną ekspresją genu kodującego syntazę kalozy, *CalS7* (Xie i in. 2011). Odpowiedź systemiczna roślin na uszkodzenia mechaniczne następuje poprzez syntezę reaktywnych form tlenu i fitohormonów takich jak kwasy: jasmonowy, abscysynowy, salicylowy, traumatynowy i etylen (Lafta, Fufate 2011; Piotrowska, Bajguz 2011; Mousavi i in. 2013). Fitohormony te biorą udział w szlaku sygnalizacyjnym o zranieniu aktywując kinazy MAP, prowadzą do zmiany ekspresji genów, podjęcia procesów naprawczych i syntezy białek obronnych, inhibitorów proteinaz, defensyn oraz aktywują alternatywne szlaki metaboliczne (León i in. 2001; Savatin i in. 2014).

3.2. Wpływ zranienia na aktywność fotosyntetyczną roślin

Przyswajany przez tkanki zielone CO₂ przekształcany jest w ufosforylowane monosacharydy w procesie fotosyntezy. Związki te następnie wykorzystywane są do budowy polisacharydów, białek i lipidów. Fotosynteza jest procesem wrażliwym na

działanie czynników stresowych, w tym zranienia. Po uszkodzeniu liści zaobserwowano zahamowanie ekspresji genów związanych z fotosyntezą, kodujących, między innymi, plastocyaninę, ferredoksynę, niektóre białka wchodzące w skład fotosystemu II, syntazę ATP (Delessert i in. 2004, Ralph i in. 2006). Obniżona ekspresja genów wpływa prawdopodobnie na to, że na skutek zranienia/zgryzania obniża się intensywność fotosyntezy, natomiast aparat fotosyntetyczny nie ulega uszkodzeniu (Quilliam i in. 2006; Schwachtje, Baldwin 2008). Produkcja i rozmieszczenie asymilatów zmienia się w zależności od wieku rośliny: młode liście dostarczają produktów odżywczych górnym częściom rośliny, natomiast starsze liście zasilają dolne części łodyg i korzenie (Rolland i in. 2006; Ciereszko 2009). Głównym związkiem eksportowanym z chloroplastów, z pomocą przENOŚNIKA fosforanów, jest fosfodihydroksyaceton, który zużywany jest do syntezy sacharozy (Patrick i in. 2013). Sacharoza jest podstawowym związkiem transportowanym we floemie, ponieważ jest cukrem mało reaktywnym chemicznie i łatwo rozpuszczalnym (Starck 2008; Patrick i in. 2013). W organach donorowych i akceptorowych sacharoza po przemianie w α -ketokwasy (podczas oddychania tlenowego) może zostać przekształcona w aminokwasy, a następnie w białka. Sacharoza jest również prekursorem w syntezie nukleotydokwadrów, potrzebnych do syntezy polisacharydów niezbędnych w procesach naprawczych po uszkodzeniu tkanek (np. celulozy, kalozy), a także glikoprotein, glikolipidów i glikozydów (Ciereszko 2009; Zielińska 2012). Produkty metabolizmu sacharozy mogą włączać się w syntezę lipidów, kwasów nukleinowych, alkaloidów, steroidów, witamin, fitohormonów (Rosa i in. 2009).

3.3. Dystrybucja asymilatów w warunkach stresowych

Transport asymilatów następuje z miejsc syntezy, głównie liści, do miejsc docelowych, np. korzeni, tkanek merystematycznych, endospermy dojrzewających nasion (Rolland i in. 2006; Starck 2008). Szybkość wykorzystywania sacharozy w miejscach jej zużycowania może wpływać na szybkość dostarczania potrzebnych substratów. W warunkach stresowych, cukry są prekursorami w syntezie związków organicznych oraz wpływają na ekspresję niektórych genów, odgrywają istotną rolę w percepcji i transdukcji sygnału (Ciereszko 2006; Rosa 2009). Mechanizm transportu i dystrybucja związków pokarmowych jest specyficzna dla gatunku, determinowana genetycznie, choć w znacznej mierze zależy od warunków środowiskowych (Ciereszko 2006). Badania przy użyciu radioizotopu ^{14}C wskazują, że pod wpływem zranienia, w połączeniu z podaniem jasmonianu metylu, następuje intensywniejsze wiązanie CO_2 przez liście i przejście zasymilowanego węgla z organów fotosyntety-

zujących do akceptorowych (np. korzeni i młodych liści), skorelowane ze zwiększoną aktywnością inwertaz kwaśnych w korzeniach (Schwachtje, Baldwin 2008; Ferrieri i in. 2013). Zranienie, podobnie jak inne czynniki stresowe, wpływa na rozdział zasymilowanego węgla pomiędzy skrobię a sacharozę i dystrybucję asymilatów (Starck 2008). Związane jest to, między innymi, z zatykaniem floemu przez kalozę, w celu uszczelnienia i ograniczenia penetracji patogenów (León i in. 2001; Xie i in. 2011).

3.4. Wpływ stresu zranienia na aktywność enzymów uczestniczących w metabolizmie sacharozy w organach donorowych

Donorami substancji pokarmowych są organy, w których przebiega fotosynteza. Produkty pierwotne fotosyntezy, fosfotriozy, transportowane są z chloroplastu do cytozolu komórki z udziałem translokatorów. Transport fosfotriozy prowadzi do syntezy sacharozy bezpośrednio związanej z zaopatrywaniem akceptorów. Regulacja syntezy sacharozy przebiega przy udziale syntazy sacharozy (SuSy, EC 2.4.1.13) oraz syntazy fosforanu sacharozy (SPS, EC 2.3.1.14). Szybkość syntezy sacharozy zależy od szybkości dostarczania cząstek fosfotriozy (Patrick i in. 2013). Uszkodzenie tkanek powoduje zmniejszenie zawartości triozofosforanów i fruktozo-1,6-bisfosforanu (Lafta, Fugate 2011). SPS jest enzymem pełniącym kluczową rolę w regulacji syntezy sacharozy w cytozolu oraz uczestniczy pośrednio w załadunku floemu w liściach, syntezie asymilatów w fotosyntezie (Ciereszko 2006). Enzym ten wykazuje zmienną aktywność w zależności od rodzaju tkanki, stadium rozwojowego rośliny i warunków środowiskowych. Zranienie wpływa na zahamowanie ekspresji genów kodujących SPS u *Musa acuminata*, ponadto przeprowadzone badania wskazują, że badany czynnik stresowy reguluje aktywność i zawartość SPS na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym (Roy Choudhury i in. 2008). Powoduje to zahamowanie konwersji skrobi w sacharozę. Zranienie zwiększa aktywność α -amylazy, enzymu hydrolizującego skrobię, w siewkach *Vigna radiata* (Koizuka i in. 1995). Zranienie korzeni *Petunia hybrida* spowodowało nagromadzenie skrobi (Ahkami i in. 2009). Z kolei u rośliny modelowej, stosowanej w badaniach biologicznych, *Arabidopsis thaliana*, zawartość skrobi zmniejszyła się u roślin w czwartym tygodniu wzrostu, natomiast w piątym i szóstym tygodniu, uszkodzenie liści rozetowych nie spowodowało istotnych różnic (badania własne, nieopublikowane).

SuSy wpływa na dystrybucję fotoasymilatów, występuje głównie w cytoplazmie, związany jest również z cytoszkieletem i błonami (Patrick i in. 2013). W zależności od pH, enzym ten przeprowadza reakcję hydrolizy sacharozy (pH 6,0) do fruktozy i urydynodifosforanu glukozy (UDP-glukozy) lub syntezę sacharozy w pH 8,0 (Ciereszko 2006). SuSy *in vivo* pełni raczej funkcję enzymu rozkładającego sacharozę niż rolę syntetyzującą, usprawniając tym samym rozładunek floemu (Ciereszko 2006). Mechaniczne zranienie nie wpływa znacząco na ekspresję genów i aktywność SuSy u *P. hybrida* i *A. thaliana*, natomiast u *Phaseolus vulgaris* aktywność SuSy zmniejszyła się (u roślin w pierwszym tygodniu wzrostu na pożywkach płynnych) (badania własne, nieopublikowane; Łukaszuk i in. 2010b; Ahkami i in. 2009). Zaobserwowano również obniżenie aktywności SuSy o 40% cztery godziny po zranieniu, a następnie wzrost aktywności po 12 godzinach i ponowne obniżenie w kolejnych godzinach po zranieniu (Ahkami i in. 2008).

Pirofosforylaza UDP-glukozy (UGPaza, EC 2.7.7.9) katalizuje odwracalną reakcję syntezy UDP-glukozy i P_i z glukozo-1-fosforanu i UTP (Łukaszuk i Ciereszko 2010a). Reakcja ta zachodzi w cytoplazmie komórek fotosyntetyzujących. Produkt reakcji: UDP-glukoza wykorzystywana jest w syntezach cukrów i połączeń cukrów z białkami w metabolizmie sacharozy, skrobi oraz kalozy. Istnieje niewiele doniesień badawczych dotyczących wpływu zranienia na aktywność tego enzymu, a istniejące sugerują zwiększoną ekspresję genów *Ugp* u *A. thaliana* pod wpływem zranienia (Ciereszko i in. 2001). Ponadto badania wskazują również na wzrost zawartości UDP-glukozy u *P. hybrida* (Ahkami i in. 2008). Zwiększona ekspresja genów *Ugp* może być związana z tym, że aktywność enzymatyczna UGPazy wzrasta podczas formowania ściany komórkowej, a podstawowym elementem odpowiedzi roślin na zranienie mechaniczne jest wzmocnienie ścian komórkowych. UDP-glukoza, jest prekursorem w syntezie np.: celulozy, pektyn, hemicelulozy, glikolipidów (Łukaszuk, Ciereszko 2010a).

W wyniku uszkodzenia tkanek, znaczna część cukrów kierowana jest do ich odbudowy. Po zranieniu, zaobserwowano wyraźnie podwyższoną ekspresję genów związanych z budową ściany komórkowej, np. genów *StExt1*, kodujących ekstensyny, *StPME*, kodujących metyloesterazę pektynową w bulwach *Solanum tuberosum* oraz zwiększoną syntezę korka (fellemu), tkanki korkotwórczej (fellogenu) oraz ligniny (Denness i in. 2011; Neubauer i in. 2012). Zaobserwowano ponadto, że do syntezy ligniny niezbędna jest obecność kwasu jasmonowego, a mutanty z obniżoną zawartością tego hormonu nie produkowały ligniny w wyniku zranienia (Denness i in. 2011).

3.5. Wpływ zranienia na zawartość węglowodanów w roślinie

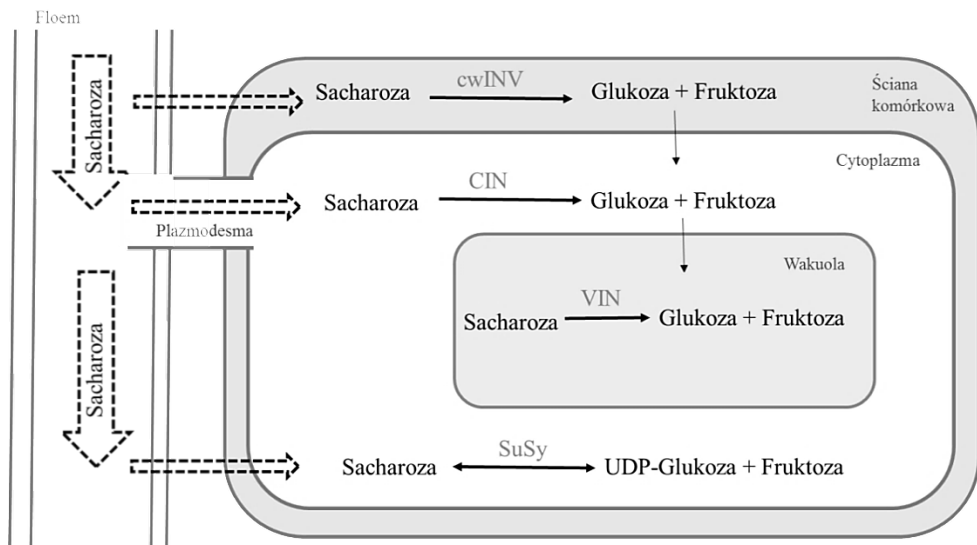
Inwazja patogenów lub zranienie skutkuje zmianami w metabolizmie węglowodanów i ich zawartości, jednakże zmiany te mogą być różne w zależności od rośliny-gospodarza, jak i od typu patogenu (Morkunas, Ratajczak 2014). W wyniku infekcji patogenów zaobserwowano zarówno zmniejszenie zawartości cukrów, jak i zwiększenie ich poziomu (Morkunas, Ratajczak 2014). Infekcja patogena *Botrytis cinerea* przyczyniła się do zmniejszenia zawartości glukozy, fruktozy i sacharozy dopiero 3 dni po uszkodzeniu biotycznym liści pomidora (Berger i in. 2004). U *Beta vulgaris* nie zaobserwowano zmian zawartości sacharozy nawet 3 dni po zranieniu, natomiast znacząco wzrosła zawartość glukozy i/lub fruktozy (Rosenkranz i in. 2001; Lafta, Fugate 2011). U *A. thaliana* zaobserwowano również, że w krótkim czasie (do 24 h) po zranieniu nie zmienia się zawartość sacharozy, glukozy oraz zawartość cukrów redukujących, natomiast u mutantów ze zmienioną percepcją hormonów stresowych, zawartość cukrów zwiększyła się (Łukaszuk, Ciereszko 2012b; Ferrieri i in. 2013). Podobne wyniki otrzymano w badaniach nad lucerną (Landgraf i in. 2012). Zranienie liści *Quercus ilex* spowodowało znaczący wzrost zawartości glukozy oraz metabolitów wtórnych bogatych w wiązania węglowe, np. kwasu chinowego (Sardans i in. 2014). Ostatnie badania wskazują na rolę trehalozy w organach akceptorowych w zwiększeniu tolerancji na stresse abiotyczne i biotyczne (Iordachescu, Imai 2008; Zielińska 2012). Trehaloza jest to, podobnie jak sacharoza, cukier nieredukujący, pełniący prawdopodobnie również funkcję sygnalizacyjną w warunkach stresów środowiskowych (Reignault i in. 2001; Iordachescu, Imai 2008; Fernandez i in. 2010; Zielińska 2012). Pod wpływem zranienia u *A. thaliana* nastąpiła wyższa ekspresja genów kodujących syntazę trehalozo-6-fosforanu i fosfatazę trehalozo-6-fosforanu (AtTPS3, AtPPI i AtPPG w pędzie oraz AtTPS4 w korzeniu) (Iordachescu, Imai 2008). Z kolei po infekcji patogenów zaobserwowano akumulację trehalozy u *A. thaliana* i *Pinus sylvestris* (Fernandez i in. 2010). Spryskiwanie *Triticum aestivum* roztworem trehalozy (15 g/L) spowodowało ograniczenie infekcji grzyba *Blumeria graminis* o 50-95% (Reignault i in. 2001).

Pod wpływem zranienia następuje indukcja ekspresji genów *A. thaliana* kodujących transportery sacharozy i białka zaangażowane w metabolizm cukrów (Delesert i in. 2004). Zaobserwowano wyraźną indukcję ekspresji transportera *AtSUC3* 1-6 godzin po uszkodzeniu tkanek (Meyer i in. 2004). Transporter ten znajduje się głównie we floemie, ale zwiększona ekspresja *AtSUC3* po zranieniu występowała w komórkach/tkankach akceptorowych np. komórkach towarzyszących rurek sito-

wych, pyłku, pylnikach, trichomach i przylistkach, kalusie (Meyer i in. 2004). Zaobserwowano również indukcję transportera *AtSTP4*, specyficznego dla tkanek donorowych, w następstwie zranienia oraz infekcji *Pseudomonas syringae* (Truernit i in. 1996). Wyniki te wskazują, że import węglowodanów z apoplastu po zranieniu lub infekcji może być istotnym elementem odpowiedzi roślin na stres biotyczny i abiotyczny. Transport cukrów jest niezbędny dla zaspokojenia wyższego zapotrzebowania energetycznego zainfekowanych/zranionych tkanek oraz w celu zahamowania rozprzestrzeniania się patogenów, które mogą wykorzystywać węglowodany do budowy własnych komórek (Truernit i in. 1996; Meyer i in. 2004).

3.6. Aktywność enzymów w organach akceptorowych w warunkach stresu zranienia

Rozładunek asymilatów (Ryc. 3.1) podlega kontroli hormonalnej i jest szczególnie wrażliwy na warunki środowiskowe (Rolland i in. 2006; Rosa i in. 2009). Hydroliza importowanej sacharozy przebiega przy udziale inwertazy (EC 3.2.1.26, fruktohydrolaza β -D-frukto-furanozydów) lub SuSy (Ciereszko 2006).

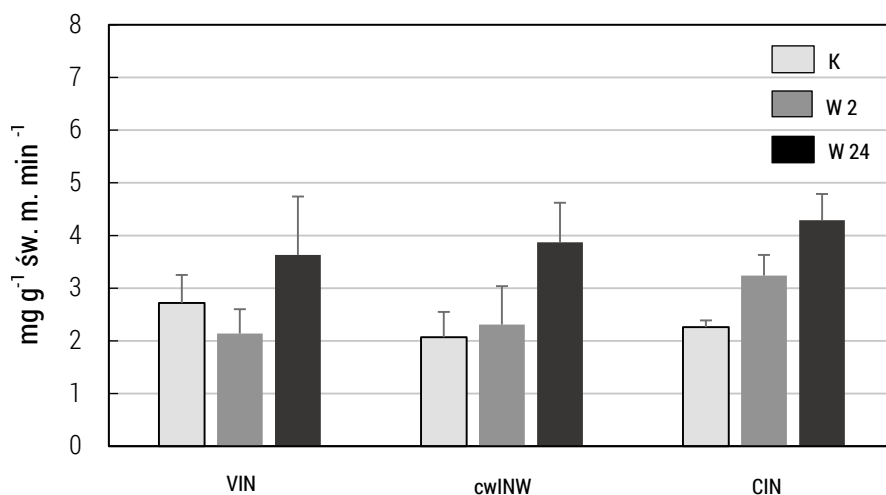


Rycina 3.1. Udział kluczowych enzymów metabolizmu węglowodanów w rozładunku floemu

Źródło: na podstawie: Ruan i in. 2010, zmienione.

W roślinach występują trzy typy inwertaz charakteryzujących się odmiennymi właściwościami, ponadto każdy typ reprezentowany jest przez różne izoenzymy (Roitsch i in 2003). Wyróżnia się inwertazy kwaśne (inwertaza związana ze ścianą komórkową, cwINV oraz występująca w wakuoli, VIN) i cytozolową inwertazę obojętną, CIN (Roitsch i in 2003). Inwertazy dzieli się również ze względu na rozpuszczalność, na: rozpuszczalne (VIN i CIN) oraz nierozpuszczalne (cwINV) (Ciereszko 2006).

Aktywność inwertaz regulowana jest specyficzną tkankowo ekspresją genów, fitohormonami i bodźcami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi, co wskazuje na zbieżność szlaków metabolizmu podstawowego, działania hormonów i aparatu molekularnego (Roitsch i in. 2003). Inwertazy kwaśne, zlokalizowane na powierzchni ściany komórkowej, w znacznej mierze decydują o sprawności zaopatrzenia w produkty fotosyntezy oraz uczestniczą pośrednio w transdukcji sygnałów poprzez ekspresję genów związanych z wrażliwością komórek na zmiany stężenia cukrów (Starck 2008; Ruan i in. 2010). Pod wpływem zranienia, zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów kodujących kwaśne inwertazy oraz akumulację cukrów (heksoz) u *B. vulgaris* (Rosenkranz i in. 2001). Ekspresja genów kodujących cwINV i VIN była najwyższa 2-5 dni po zranieniu. Zranienie *Medicago truncatula* spowodowało zwiększoną ekspresję genów kodujących inwertazy, zwłaszcza cwINV i CIN (Landgraf i in. 2012). Uważa się, że VIN hydrolizują sacharozę, powodują wzrost zawartości cukrów prostych uczestniczących w osmoregulacji, natomiast CIN włączają sacharozę w szlak reakcji katabolicznych (Ruan i in. 2010). Badania przeprowadzone przez Quilliam i in. (2006) wskazują, że najwyższa aktywność inwertaz kwaśnych występuje 24 h po uszkodzeniu liści *A. thaliana*. Aktywność cwINV była najwyższa w miejscu zranienia, co sugeruje udział tych enzymów w lokalnej reakcji odpornościowej roślin. Podobne wyniki otrzymano w badaniach własnych: aktywność inwertaz (24 h po uszkodzeniu liści rozetowych) była w przybliżeniu o 30% wyższa w stosunku do roślin nieuszkodzonych (Ryc. 3.2).



Rycina 3.2. Aktywność inwertaz po zranieniu liści rozetowych *A. thaliana* (6 tydzień wzrostu)

Objasnienia:

K – rośliny kontrolne, niezranione;

W 2 – rośliny 2 h po zranieniu;

W 24 – rośliny 24 h po zranieniu;

Średnia z 5 powtórzeń \pm SD.

Aktywność inwertaz oznaczona metodą wg Cierieszko i Barbachowska 2000.

Zranienie, podobnie jak infekcja patogenów, indukuje transkrypcję glikozylotransferaz, enzymów katalizujących reakcję przenoszenia reszty cukrowej (Sepúlveda-Jiménez i in. 2005). Glikozylacja jest jednym z mechanizmów utrzymujących homeostazę komórkową. Metabolity wtórne mogą ulegać glikozylacji, a następnie być akumulowane w wakuolach i plastydach. Przyłączenie reszty cukrowej powoduje zmiany właściwości fizyko-chemicznych związków biologicznie czynnych, powodując, między innymi, obniżanie poziomu aktywnego fitohormonu (np. auxyny, giberelin). Ponadto glikozydy uczestniczą w przechowywaniu energii, tworzeniu struktur ściany komórkowej, sygnalizacji i oddziaływaniach typu gospodarz-patogen (Ostrowski, Jakubowska 2013). Zaobserwowano, że pod wpływem infekcji *Agrobacterium tumefaciens* i po uszkodzeniu mechanicznym *Beta vulgaris*, następuje indukcja ekspresji genu *BvGT*, kodującego UDP-glikozylotransferazę. Skutkiem tego jest zwiększona synteza czerwonego barwnika, betacyjaniny (Sepúlveda-Jiménez i in. 2005). UDP-glikozylotransferaza kwasu salicylowego bierze udział w reakcji systemowej *Oryza sativa* w odpowiedzi na infekcję *Magnaporthe grisea*,

a wyciszenie ekspresji genu kodującego ten enzym – *OsSGT1*, powodowało obniżenie roślin na infekcję grzyba (Ostrowski, Jakubowska 2013).

3.7. Podsumowanie

Zwiększona aktywność niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów nie zawsze skutkuje kumulacją cukrów. W tkankach roślin, w wyniku zranienia, następuje zwiększona aktywność inwertazy apoplastycznej, *cwINV*, która dostarcza cukrów, między innymi, do procesów związanych ze wzmocnieniem ściany komórkowej. Również aktywacja transporterów sacharozy świadczy o intensyfikacji metabolizmu i transportu cukrów pod wpływem stresu zranienia. Badania wskazują na istotną rolę mechanizmów związanych z regulacją ekspresji genów, które decydują o podatności/odporności na czynniki stresowe, w tym uszkodzenie tkanek (Ciereszko 2006). Cukry prawdopodobnie są natychmiast wykorzystywane do procesów związanych z regeneracją i odbudową uszkodzonych komórek. W odpowiedzi na zranienie i infekcję patogenów, węglowodany wykorzystywane są intensywniej w lokalnej odbudowie uszkodzonych tkanek, stanowią donory węglowych grup do budowy związków organicznych i stanowią rezerwuar energetyczny, niezbędny do prawidłowego funkcjonowania roślin zaaklimatyzowanych do określonego czynnika stresowego.

Literatura

- Ahkami A.H., Lischewski S., Haensch K.T., Porfirova S., Hofmann J., Rolletschek H., Melzer M., Franken P., Hause B., Druege U., Hajirezaei M.R. 2009. Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytol.*, 181(3): 613-25.
- Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W., Roitsch, T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol. Plant.*, 122: 419-428.
- Ciereszko I. 2009. Sucrose metabolism in plant tissues under stress conditions: key enzymes, localization and function. [W:] Maksymiec W. (red.), *Compartmentation of responses to stresses in higher plants, true or false*. Transworld Research Network, Kerala, India, 193-218.
- Ciereszko I. 2006. Kontrola metabolizmu sacharozy u roślin w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska. *Kosmos*, 55(2-3): 229-241.

- Ciereszko I., Barbachowska A. 2000. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J. Plant. Physiol.*, 156: 640-644.
- Delessert C., Wilson I.W., Van Der Straeten D., Dennis E.S., Dolferus R. 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol. Biol.*, 55: 165-181.
- Denness L., McKenna J.F., Segonzac C., Wormit A., Madhou P., Bennett M., Mansfield J., Zipfel C., Hamann T. 2011. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 156(3): 1364-74.
- Fernandez O., Béthencourt L., Quero A., Sangwan R.S., Clément C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.*, 15: 409-417.
- Ferrieri A.P., Agtuca B., Appel H.M., Ferrieri R.A., Schultz J.C. 2013. Temporal changes in allocation and partitioning of new carbon as ¹¹C elicited by simulated herbivory suggest that roots shape aboveground responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 161(2): 692-704.
- Iordachescu M., Imai R. 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.*, 50: 1223-1229.
- Koizuka N., Tanaka Y., Morohashi Y. 1995. Expression of α -amylase in response to wounding in mung bean. *Planta*, 195(4): 530-534.
- Lafta A.M., Fugate K.K. 2011. Metabolic profile of wound-induced changes in primary carbon metabolism in sugarbeet root. *Phytochem.*, 72: 476-489.
- Landgraf R., Schaarschmidt S., Hause B. 2012. Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant Cell Environ.*, 35(7): 1344-57.
- León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J.J. 2001. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.*, 52(354): 1-9.
- Łukaszuk E., Ciereszko I. 2012a. Plant responses to wounding stress, [W:] Łaska B. (red.), *Biological diversity – from cell to ecosystem*. Polish Botanical Society, Białystok, 73-85.
- Łukaszuk E., Ciereszko I. 2012b. Sucrose synthase activity after wounding of *Arabidopsis* hormonal mutants. *Book of Abstracts, 9th International Conference “Plant Functioning in Stress Environment”, 12-15 September 2012, Cracow, Poland. Acta Physiol. Plant.*, 34 (Suppl 1): S58-59.
- Łukaszuk E., Ciereszko I. 2010a. Roślinna pirofosforylaza UDP-glukozy – enzym niedoceaniany. *Post. Biol. Kom.*, 2 (37): 1-17.
- Łukaszuk E., Wąsowicz E., Ciereszko I. 2010b. The influence of wound and phosphorus deficit on sugar metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Soc. Botan. Poloni. Vol. 79 Suppl. 1 Proceedings of the 55th Meeting of the Polish Botanical Society. Plant in vivo, in vitro et in silico*. September 6-12, 2010, Warsaw, pp. 90.

- Meyer S., Lauterbach C., Niedermeier M., Barth I., Sjolund R.D., Sauer N. 2004. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol.*, 134(2): 684-693.
- Morkunas I., Ratajczak L. 2014. The role of sugar signaling in plant defence responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.*, 36(7): 1607-1619.
- Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500: 422-426.
- Neubauer J.D., Lulai E.C., Thompson A.L., Suttle J.C., Bolton M.D. 2012. Wounding coordinately induces cell wall protein, cell cycle and pectin methyl esterase genes involved in tuber closing layer and wound periderm development. *J. Plant Physiol.*, 169: 586-595.
- Ostrowski M., Jakubowska A. 2013. UDP-glikozylotransferazy hormonów roślinnych. *Post. Biol. Kom.*, 40(1): 141-160.
- Patrick J.W., Botha F.C., Birch G.R. 2013. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnol. J.*, 11: 142-156.
- Piotrowska A., Bajguz A. 2011. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochem.*, 72: 2097-2112.
- Quilliam R., Swarbrick P.I., Scholes J.D., Rolfe S.A. 2006. Imaging photosynthesis in wounded leaves of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 57 (1): 55-69.
- Ralph S.G., Yueh H., Friedmann M., Aeschliman D., Zeznik J.A., Nelson C.C., Butterfield Y.S., Kirkpatrick R., Liu J., Jones S.J, Marra M.A., Douglas C.J., Ritland K., Bohlmann J. 2006. Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant Cell Environ.*, 29(8): 1545-70.
- Reignault P.H., Cogan A., Muchembled J., Lounes-Hadj Sahraoui A., Durand R., Sancholle M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytol.*, 149: 519-529.
- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E.E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 707-719.
- Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M., Proels R., Sinha A.K. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.*, 54(382): 513-24.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 675-709.
- Rosenkranz H., Vogel R., Greiner S., Rausch T. 2001. In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *J. Exp. Bot.*, 52(365): 2381-2385.

- Roy Choudhury S., Roy S., Das R., Sengupta D.N. 2008. Differential transcriptional regulation of banana sucrose phosphate synthase gene in response to ethylene, auxin, wounding, low temperature and different photoperiods during fruit ripening and functional analysis of banana SPS gene promoter. *Planta*, 229(1): 207-223.
- Ruan Y-L., Jin Y., Yang Y-J., Li G-J., Boyer J.S. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Mol. Plant*, 3(6): 942-955.
- Sardans J., Gargallo-Garriga A., Pérez-Trujillo M., Parella T.J., Seco R, Filella I., Penuelas J. 2014. Metabolic responses of *Quercus ilex* seedlings to wounding analyzed with nuclear magnetic resonance profiling. *Plant Biol.*, 16: 395-403.
- Savatin D.V., Gramegna G., Modesti V., Cervone F. 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. *Front. Plant Sci.*, 5: 470.
- Schwachtje J., Baldwin I.T. 2008. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol.*, 146: 845-851.
- Sepúlveda-Jiménez G., Rueda-Benítez P., Porta H., Rocha-Sosa M. 2005. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *J. Exp. Bot.*, 56 (412): 605-611.
- Ślesak H., Ślesak I. 2011. Odpowiedź roślin na zranienie. *Kosmos*, 60: 445-457.
- Starck Z. 2008. Funkcja tkanek przewodzących: zaopatrzenie w substancje pokarmowe i udział w koordynacji procesów w roślinach. *Kosmos*, 57(1-2): 67-83.
- Truernit E., Schmid J., Epple P., Illig J., Sauer N. 1996. The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell*, 8: 2169-2182.
- Xie B., Wang X., Zhu M., Zhang Z., Hong Z. 2011. *Cals7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J.*, 65: 1-14.
- Zielińska S. 2012. Metabolizm węglowodanów jako jeden ze składników mechanizmów tolerancji na stresy abiotyczne u roślin. *Kosmos*, 61(4): 613-623.

Roślinność spontanicznie zasiedlająca składowiska odpadów cynkowo- ołowiowych – różnorodność gatunkowa oraz mechanizmy adaptacji

Małgorzata Wójcik^{a*} / Sławomir Dresler^a / Piotr Sugier^b /
Grzegorz Stanisławski^a / Agnieszka Hanaka^a /
Zbigniew Krupa^a / Anna Tukiendorf^a

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii

^a Zakład Fizjologii Roślin

^b Zakład Ekologii

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

* email: mwojck@umcs.pl

Streszczenie

Składowiska odpadów z wydobycia i przetwórstwa rud cynku (Zn) i ołowiu (Pb) stanowią ekstremalnie niekorzystne siedliska dla wzrostu i rozwoju roślin. Wysokie stężenie metali ciężkich (Zn, Pb i kadmu, Cd), silne nasłonecznienie, deficyt wody i substancji odżywczych, zasolenie, zakwaszenie oraz nietypowe fizyczne właściwości podłoża sprawiają, że tylko nieliczne gatunki roślin wkraczają spontanicznie na takie tereny. Są to tzw. pseudometalofity, czyli rośliny zdolne do zasiedlania zarówno środowisk zanieczyszczonych, jak i niezanieczyszczonych metalami. Skład gatunkowy oraz pokrycie roślinności spontanicznie wkraczającej na hałdy są zdeterminowane rodzajem odpadu (jego właściwościami fizykochemicznymi, głównie zasobnością fosforu i wapnia) oraz wiekiem składowiska. W zbiorowiskach roślinnych badanych hałd najliczniej występują taksony reprezentujące rodziny: *Asteraceae*, *Poaceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae* i *Caryophyllaceae*.

Adaptacja roślin do wzrostu na podłożach zanieczyszczonych metalami zachodzi na drodze mikroewolucji i naturalnej selekcji. Jest możliwa dzięki wykształceniu mechanizmów unikania pobierania i translokacji metali w roślinach oraz tolerancji podwyższonych stężeń metali w tkankach. Przy silnej presji selekcyjnej, ekotypy tolerancyjne mogą powstać nawet w czasie 4-10 lat. Charakteryzują się one unikaniem pobierania lub/i translokacji metali do organów nadziemnych (tzw. strategia „metal excluder”), często wykazują wyraźne morfologiczne i fizjologiczne różnice w porównaniu do populacji tych samych gatunków zasiedlających tereny niezanieczyszczone. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy detoksyfikacji metali, takie jak chelatowanie przez peptydy tiolowe czy kwasy organiczne, mają drugorzędne znaczenie w procesach adaptacji.

Słowa kluczowe: hałdy galmanowe, kwasy organiczne, metale ciężkie, peptydy tiolowe, pseudo-metalofity

4.1. Wstęp

Podwyższone zawartości metali ciężkich w środowisku występują w wyniku procesów naturalnych (aktywność wulkaniczna, spontaniczne odkrywki na terenach rudonośnych), ale przede wszystkim w wyniku działalności antropogenicznej, a zwłaszcza procesów wydobywania i przetwórstwa rud metali (Kabata-Pendias, Mukherjee 2007). Problem ten jest szczególnie istotny w południowych rejonach Polski, w regionie śląsko-krakowskim. Wielowiekowe wydobywanie i przetwórstwo rud cynku (Zn) i ołowiu (Pb) na tych terenach przyczyniło się do szczególnie wysokiego, nawet w skali europejskiej, skażenia środowiska związkami tych metali, dodatkowo także kadmem (Cd) (Krzaklewski, Pietrzykowski 2002). Charakterystycznym elementem tych środowisk są składowiska odpadów górniczo-hutniczych (ze względu na wysokie stężenia cynku i ołowiu nazywane hałdami galmanowymi), często zdeponowane w sąsiedztwie zabudowań mieszkalnych, ogródków działkowych lub pośród użytków rolnych. Nieustabilizowane i pozbawione okrywy roślinnej składowiska odpadów, są źródłem wtórnego zanieczyszczania otaczających je terenów, na skutek migracji metali poprzez erozję wietrzną, zmywy powierzchniowe oraz przesiąkanie wód opadowych przez profil hałdy i przenoszenie zanieczyszczeń do wód gruntowych. Stanowią zatem realne zagrożenie dla zdrowia mieszkańców i funkcjonowania ekosystemów, jednocześnie są one trudne do zagospodarowania i rekultywacji.

Zawartości metali w górnych warstwach hałd metalonośnych są ekstremalnie wysokie: całkowite stężenia Zn wahają się w granicach 7300-171 790 mg kg⁻¹, Pb – 1390-22 265 mg kg⁻¹, a Cd – 66-1464 mg kg⁻¹ (Wójcik i in. 2014). Są to wartości przekraczające kilka, a nawet kilkaset razy dopuszczalne normy dla terenów przemysłowych (1000 mg kg⁻¹ – Zn, 600 mg kg⁻¹ – Pb oraz 15 mg kg⁻¹ – Cd), ustanowione Rozporządzeniem Ministra Środowiska (2002). Wysokie stężenia metali w podłożu są głównym, ale nie jedynym czynnikiem utrudniającym lub wręcz uniemożliwiającym osiedlanie roślinności na składowiskach odpadów. Panuje tam również silne nasłonecznienie, niska wilgotność, deficyt niezbędnych makro- i mikroelementów, zasolenie, zakwaszenie, nietypowe fizyczne właściwości podłoża, co stwarza ekstremalnie niekorzystne warunki dla rozwoju wegetacji roślin (Wierzbicka, Rostański 2002; Wong 2003). Mimo to, niektóre gatunki roślin przystosowały się do wzrostu w takich środowiskach na drodze ewolucji i naturalnej selekcji.

4.2. Szata roślinna hałd cynkowo-ołowiowych

Rośliny zasiedlające składowiska odpadów metalonośnych stanowiły przedmiot zainteresowań badaczy od dziesięcioleci (Grodzińska, Szarek-Łukaszewska 2002). Organizmy te tworzą zazwyczaj charakterystyczne zbiorowiska lub grupy roślin, złożone głównie z gatunków siedlisk ubogich i termofilnych, a także ruderalnych, segetalnych i łąkowych, o różnym stopniu tolerancji metali w podłożu (Grodzińska i in. 2000; Skubała 2011). Są to tzw. pseudometalofity, czyli rośliny zdolne do zasiedlania zarówno środowisk zanieczyszczonych, jak i niezanieczyszczonych metalami ciężkimi, w odróżnieniu od metalofitów, występujących wyłącznie na terenach wzbogaconych w metale.

Wbrew pozorom, szata roślinna składowisk odpadów cynkowo-ołowiowych, tzw. flora galmanowa, jest dosyć bogata i różnorodna. Stwierdzono w niej bowiem ponad 300 gatunków roślin naczyniowych należących do ponad 70 rodzin (Jędrzejczyk-Korycińska 2009). Najliczniej reprezentowane są rodziny: *Asteraceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae* i *Caryophyllaceae*. Najczęstszymi gatunkami występującymi masowo na wszystkich badanych hałdach są rośliny spotykane na terenie całej Polski, m.in.: *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Cardaminopsis arenosa* (L.) Hayek, *Lotus corniculatus* L., *Plantago lanceolata* L., *Daucus carota* L., *Festuca ovina* L., *Reseda lutea* L. Dosyć pospolite są również rodzime drzewa i krzewy, np.: *Betula pendula* Roth, *Populus tremula* L., *Pinus silvestris* L. Co ciekawe, na terenach tych spotyka się również gatunki należące do roślin rzadkich, zagrożonych wyginięciem i objętych różnymi formami ochrony prawnej. Należą do nich m.in.: *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Euphorbia exigua* L., *Iris sibirica* L., *Malaxis monophyllos* (L.) Sw., *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser. Niektóre gatunki należące do tej grupy występują czasami w dużych ilościach, np.: *Carlina acaulis* L., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz czy *Convallaria majalis* L. (Jędrzejczyk-Korycińska 2009). Na uwagę zasługuje również fakt występowania na hałdzie w Bolesławiu k. Olkusza jedyne go niżowego stanowiska górskiego gatunku *Biscutella laevigata* L., reliktu glacialnego. Ze względu na obecność, między innymi, tego gatunku, hałda ta została uznana jako obszar chroniony w formie użytku ekologicznego (Grodzińska, Szarek-Łukaszewska 2002). Analizując różnorodność szaty roślinnej należy wspomnieć, że oprócz bogactwa roślin naczyniowych, na hałdach metalonośnych występuje również ponad 20 gatunków mchów i ponad 70 gatunków porostów (Jędrzejczyk-Korycińska 2009).

Skład gatunkowy i pokrycie roślinności spontanicznie wkraczającej na składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych są silnie zdeterminowane przez rodzaj

odpadu (właściwości fizykochemiczne) oraz jego wiek. Starsze hałdy (np. ponad 130-letnia hałda w Bolesławiu k. Olkusza) charakteryzują się większym bogactwem gatunków i pokryciem warstwy zielonej niż hałdy, na których odpady górnicze czy hutnicze zostały zdeponowane kilkanaście-kilkadziesiąt lat temu (Wójcik 2012). Spośród parametrów fizykochemicznych podłoża, wbrew oczekiwaniom, nie zawartość metali ciężkich, ale przede wszystkim makroelementów – fosforu i wapnia mają główny wpływ na skład gatunkowy zbiorowisk roślinnych występujących na badanych składowiskach.

Dominującymi gatunkami roślin wyższych, uznawanych za metalolubne lub metalotolerancyjne, spontanicznie zasiedlające jedno z najstarszych i najlepiej przebadanych pod względem florystycznym składowisk odpadów cynkowo-ołowio- wych w Bolesławiu k. Olkusza, są: *Dianthus carthusianorum* L., *Silene vulgaris*, *Armeria maritima* Willd., *Cardaminopsis arenosa*, *Galium album* Mill., *Thymus pullegioides* L. i *Festuca ovina* (Grodzińska i in. 2000; Szarek-Łukaszewska 2009). W przypadku niektórych gatunków, a mianowicie: *Dianthus carthusianorum*, *Silene vulgaris*, *Armeria maritima*, *Cardaminopsis arenosa* i *Biscutella laevigata* stwierdzono wyraźne morfologiczne i fizjologiczne różnice pomiędzy populacjami zasiedlającymi hałdy metalonośne i tereny niezanieczyszczone (Wierzbicka, Rostański 2002; Załęcka, Wierzbicka 2002; Wierzbicka, Słysz 2005; Fiałkiewicz, Rostański 2006; Przedpeńska, Wierzbicka 2007; Wójcik i in. 2013). Rośliny populacji hałdowych cechuje karłowatość i kseromorfizm, redukcja biomasy części nadziemnych w stosunku do korzeni, przyspieszenie stadium rozwoju generatywnego, wytwarzanie większej ilości kwiatów i przedłużenie okresu kwitnienia (tzw. strategia życiowa typu „r”). Większość tych cech, podobnie jak zwiększona tolerancja na cynk czy ołów dodawane do środowiska wzrostu, utrzymywała się przez kolejne 2-3 pokolenia roślin uprawianych w optymalnych, kontrolowanych warunkach, co wskazuje, że zostały one utrwalone genetycznie. Badania markerów molekularnych potwierdziły wytworzenie odrębnych ekotypów, tzw. ekotypów galmanowych, w obrębie kilku gatunków roślin zasiedlających hałdy, takich jak: *Armeria maritima* (Abratowska i in. 2012), *Biscutella laevigata* (Babst-Kostecka i in. 2014; Wąsowicz i in. 2014), *Viola tricolor* L. (Słomka i in. 2011) oraz *Dianthus carthusianorum* (Wójcik i in. 2013).

4.3. Strategie akumulacji metali w roślinach łąkowych

Ze względu na pobieranie i dystrybucję pobranych metali, wyróżnia się 3 grupy roślin, tzw.: „excluders”, „indicators” i „accumulators” (Baker 1981). Do pierwszej grupy należą rośliny, które unikają pobierania lub zatrzymują większość pobranego metalu w korzeniach i ograniczają jego translokację do organów nadziemnych (stosunek zawartości metalu w liściach i glebie jest mniejszy od 1). Rośliny wskaźnikowe („indicators”) pobierają metale proporcjonalnie do ich zawartości w podłożu i gromadzą je dość równomiernie w tkankach korzeni i części nadziemnych. Natomiast tzw. akumulatory („accumulators”) pobierają duże ilości metali z podłoża i transportują je do organów nadziemnych (stosunek zawartości metalu w liściach i glebie jest większy od 1). Pośród akumulatorów, bardzo ciekawą grupę roślin stanowią tzw. hiperakumulatory (ok. 515 zidentyfikowanych dotąd gatunków), które rosnąc w warunkach naturalnych, akumulują ekstremalnie wysokie stężenia metali w organach nadziemnych (ponad 1% Zn lub Mn; 0,1% Ni, Pb, Cu, Co, Cr; 0,01% Cd w suchej masie liści) bez widocznych objawów toksyczności (Baker, Brooks 1989; Capa, Pilon-Smits 2014; Krzciuk, Gałuszka 2014). Poznanie strategii akumulacji metali w roślinach zasiedlających składowiska odpadów jest bardzo istotne ze względów praktycznych: „excluders” lub „accumulators” mogą być wykorzystywane odpowiednio do fitostabilizacji i fitoekstrakcji zanieczyszczonych terenów, natomiast rośliny wskaźnikowe mogą posłużyć jako biogeochemiczne indykatory poziomu zanieczyszczenia środowiska.

W roślinach spontanicznie zasiedlających łąki cynkowo-ołowiowe w Polsce dominuje strategia unikania pobierania i translokacji metali do części nadziemnych (Wójcik i in. 2014). Świadczą o tym stosunkowo niewielkie ilości metali akumulowane w liściach roślin, bardzo niskie współczynniki bioakumulacji (stosunek stężenia metalu w organach nadziemnych do jego stężenia w glebie) oraz brak istotnych korelacji między zawartością metali w roślinach i w glebie. Cechy te są pożądane w roślinach odpowiednich do fitostabilizacji, dlatego gatunki charakteryzujące się najniższą akumulacją metali w częściach nadziemnych i dodatkowo tworzące zwarłą pokrywę roślinną, np.: *Calamagrostis epigejos* (L.) Roth, *Carex hirta* L., *Festuca rubra* L., *Festuca tenuifolia* Sibth., *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv, *Thymus pulegioides* czy *Dianthus carthusianorum* mogą być potencjalnie użyteczne do rekultywacji obszarów zanieczyszczonych metalami (Skubała 2011; Wójcik i in. 2014). Wśród roślinności łąkowej nie stwierdzono obecności hiperakumulatorów ani roślin o dużej biomacie i jednocześnie akumulujących istotnie podwyższone ilości metali, dlatego żaden gatunek nie może być użyteczny w procesie fitoekstrakcji. Nie zidentyfikowano również gatunków, w których akumulacja metali w czę-

ściach nadziemnych w pełni odzwierciedlałyby zawartości metali w podłożu, czyli gatunków wskaźnikowych, użytecznych do oceny stanu zanieczyszczenia środowiska metalami i oceny ryzyka ekologicznego. Co interesujące jednak, określenie średniego stężenia metali w organach nadziemnych wszystkich roślin tworzących zbiorowiska na danym terenie, bardzo dobrze oddawało zawartości metali w podłożu, niezależnie od wieku i rodzaju odpadu, dlatego może być przydatne w biomonitoringu terenów skażonych metalami (Wójcik i in. 2014).

4.4. Mechanizmy tolerancji metali

Wykształcenie mechanizmów tolerancji w roślinach zasiedlających gleby o naturalnie wysokich zawartościach metali, zachodzi w ciągu 40-150 lat, a nawet 1000 lat (Bone, Farres 2001; Ernst 2006). Jednak na obszarach zanieczyszczonych w ekstremalnym stopniu metalami (np. w rejonach wydobywania i przetwórstwa rud metali), silna presja selekcyjna może doprowadzić do powstania ekotypów tolerancyjnych już w czasie 4-10 lat (Whitting i in. 2004; Ernst 2006). Występowanie ekotypów metalo-tolerancyjnych nie jest cechą taksonomiczną, obserwuje się duże zróżnicowanie w tolerancji między gatunkami, a nawet populacjami/ekotypami tego samego gatunku, czy nawet osobnikami w obrębie tej samej populacji. Dlatego uważa się, że kolonizowanie przez rośliny terenów w znacznym stopniu zanieczyszczonych metalami jest możliwe przez ewolucję tolerancji zachodzącej *de novo* i *in situ*.

Adaptacja roślin do wzrostu na podłożach wzbogaconych w metale ciężkie jest możliwa dzięki występowaniu różnorodnych mechanizmów unikania pobierania i translokacji metali w roślinach oraz tolerancji podwyższonych stężeń metali w tkankach (Siedlecka i in. 2001).

Ograniczanie pobierania metali z gleby następuje na skutek obniżenia biodostępności metali poprzez wydzieliny korzeniowe, gromadzenia warstwy mukopolisacharydów wiążących metale na powierzchni korzeni, zatrzymywania metali w ścianie komórkowej komórek epiblemy, wytwarzania kalozy czy zmian przepuszczalności błony komórkowej. Barierą dla wnikania jonów metali do korzeni może też być grzybnia mikoryzowa. Zatrzymywanie jonów na powierzchni lub w wewnątrzkomórkowych przedziałach komórek korzeni (ściana komórkowa, wakuola) oraz utrudniony transport jonów do ksylemu skutecznie ograniczają przemieszczanie metali do nadziemnych części roślin. Unikanie toksyczności metali zachodzi również poprzez ich odkładanie w starszych, okresowo zrzuconych liściach lub w trichomach na powierzchni liści (Siedlecka i in. 2001).

Do najważniejszych mechanizmów tolerancji należy eliminacja wolnych jonów metali z protoplastu poprzez ich wiązanie w ścianie komórkowej, chelatowanie w cytoplazmie oraz sekwestrację w specyficznych przedziałach komórkowych, głównie w wakuoli (Wójcik 2009; Maestri i in. 2010; Bajguz, Piotrowska-Nicyporuk 2012; Viehweger 2014). Mechanizmy te wzajemnie uzupełniają się, a znaczenie poszczególnych procesów zależy od gatunku rośliny, jej stadium rozwojowego (wieku), rodzaju i stężenia metalu oraz czasu jego działania. Wśród ligandów cytoplazmatycznych, zaangażowanych w chelatowanie i detoksyfikację metali ciężkich, najważniejszą rolę przypisuje się adaptacyjnym peptydom tiolowym (tzw. γ -Glu-Cys peptydom), glutationowi (GSH), kwasom organicznym, a w mniejszym stopniu aminokwasom (głównie prolinie oraz histydyinie) i fitynie (Rauser 1999). Spośród sześciu zidentyfikowanych dotychczas rodzin niskocząsteczkowych γ -Glu-Cys peptydów, najważniejszą rolę w detoksyfikacji metali pełnią fitochelatyny (PC), o wzorze: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=2-11$, syntetyzowane enzymatycznie z GSH. Peptydy te kompleksują jony metali przez grupy tiolowe cysteiny, a następnie uczestniczą w ich transporcie do wakuoli (Yadav 2010). Również GSH ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) może uczestniczyć w chelatowaniu metali (Cd, Zn, Pb) w cytoplazmie i transporcie takich kompleksów do wakuoli. Kwasy organiczne, głównie cytrynowy i jabłkowy, stanowią ważne ligandy cytoplazmatyczne i wakuolarnie dla Zn, Cd i Ni, pośredniczą również w długodystansowym transporcie metali w roślinach (López-Bucio i in. 2000; Rascio, Navari-Izzo 2011).

4.5. Tolerancja metali w wybranych gatunkach roślin hałdowych

Fizjologiczne i molekularne mechanizmy adaptacji roślinności spontanicznie zasiedlającej składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych nie są dokładnie poznane. Brak w literaturze doniesień dotyczących wewnątrzkomórkowych mechanizmów detoksyfikacji metali w roślinach występujących naturalnie na hałdach metalonośnych. W nieopublikowanych dotychczas badaniach, analizowano kilka gatunków roślin (*Daucus carota*, *Reseda lutea*, *Silene vulgaris*, *Echium vulgare* L., *Dianthus carthusianorum*, *Armeria maritima*), występujących w wyniku naturalnej sukcesji na trzech składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych w południowej Polsce, jak również populacje tych gatunków z terenów niezanieczyszczonych w okolicach Lublina (Wójcik 2012). Wykazano brak istotnych różnic w akumulacji kwasów organicznych (jabłkowego i cytrynowego) pomiędzy hałdowymi i referencyj-

nymi populacjami: *Daucus carota*, *Reseda lutea*, *Silene vulgaris*, *Echium vulgare* i *Dianthus carthusianorum* lub nawet większą zawartość tych związków w roślinach populacji referencyjnych, szczególnie w przypadku *Armeria maritima*. Wyniki te sugerują, że kwasy organiczne nie są zaangażowane w adaptację tych gatunków do zasiedlania składowisk odpadów cynkowo-ołowiowych. W częściach nadziemnych żadnego spośród badanych gatunków nie stwierdzono akumulacji fitochelatyn, zatem peptydy te nie pełnią roli w adaptacji tych roślin do wzrostu i rozwoju na składowiskach odpadów. Natomiast istotnie wyższa zawartość GSH w populacjach hałdowych wskazuje na jego potencjalną rolę w przystosowaniu roślin do wzrostu w obecności ekstremalnie wysokich zawartości metali w środowisku, albo przez bezpośrednie wiązanie jonów metali, albo przez udział w łagodzeniu stresu oksydacyjnego.

Nieliczne badania wewnątrzkomórkowych ligandów uczestniczących w detoksyfikacji metali w roślinach *Armeria maritima* (Olko i in. 2008) oraz *Echium vulgare* (Dresler i in. 2014), uprawianych hydroponicznie w obecności Cd lub Zn, dały niejednoznaczne wyniki. Najdokładniej przebadanym pod tym względem gatunkiem jest goździk kartuzek – *Dianthus carthusianorum* (Wójcik, Tukiendorf 2014; Wójcik i in. 2015a, b). Doświadczenia hydroponiczne wykazały, że ani fitochelatyny, ani kwasy organiczne nie są odpowiedzialne za zwiększoną tolerancję na Zn, Pb i Cd roślin hałdowych tego gatunku, mimo większej akumulacji metali w tkankach, w porównaniu z roślinami populacji referencyjnej, pochodzącej z terenów niezanieczyszczonych. Poziom kwasów organicznych był zbliżony w obu populacjach i nie ulegał istotnym zmianom w roślinach traktowanych badanymi metalami, natomiast zawartość fitochelatyn była wyższa w populacji referencyjnej, eksponowanej na Cd lub Pb.

Doświadczenia hydroponiczne umożliwiają zazwyczaj badanie reakcji roślin na stres ostry, czyli stosunkowo krótkotrwałe (kilka-kilkanaście godzin lub dni) działanie stosunkowo wysokich, rzadko spotykanych lub niespotykanych w warunkach naturalnych, stężeń metali. Odmienne wyniki badań uzyskano w przypadku roślin obu populacji *Dianthus carthusianorum*, uprawianych w warunkach stresu chronicznego (kilkutygodniowa ekspozycja na stosunkowo niskie, subletalne stężenia metali), na glebie pozyskanej z hałdy galmanowej w Bolesławiu k. Olkusza (Wójcik i in. 2015b). W tym przypadku, zwiększona tolerancja roślin hałdowych na metale obecne w podłożu była uwarunkowana ograniczeniem pobierania metali i ich translokacji do części nadziemnych, w porównaniu do roślin referencyjnych, oraz zwiększoną zawartością kwasów organicznych w liściach. Brak akumulacji fitochelatyn w obu populacjach potwierdza, że peptydy te nie są zaangażowane

w detoksyfikację metali w warunkach stresu chronicznego, ani w adaptację roślin łańdowych do wzrostu w obecności wysokich stężeń metali w środowisku.

4.6. Podsumowanie

Roślinność spontanicznie zasiedlająca składowiska odpadów z wydobycia i przetwórstwa rud cynku i ołowiu, mimo skrajnie niekorzystnych warunków dla wzrostu i rozwoju, charakteryzuje się dużym bogactwem gatunkowym i różnorodnością form. Dlatego jest znakomitym obiektem do badania mechanizmów tolerancji na metale oraz ich mikroewolucji, a także poszukiwania ekotypów/form najlepiej przystosowanych do niekorzystnych warunków środowiska, a zatem potencjalnie użytecznych w fitoremediacji czy rekultywacji zdegradowanych terenów. Badania mechanizmów tolerancji w roślinach uprawianych w warunkach stresu ostrego (większość badań laboratoryjnych) i chronicznego (imitującego warunki naturalne) dają odmienne wyniki, dlatego, aby w pełni poznać i zrozumieć mechanizmy adaptacji roślin do podwyższonych stężeń metali w środowisku, niezbędne jest prowadzenie badań na roślinach w ich naturalnych środowiskach (*in situ*).

Podziękowania

Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Narodowe Centrum Nauki, grant nr N N305 185737.

Literatura

- Abratowska A., Wasowicz P., Bednarek P., Telka J., Wierzbicka M. 2012. Morphological and genetic distinctiveness of the metallicolous and non-metallicolous populations of *Armeria maritima* s.l. (*Plumbaginaceae*) in Poland. *Plant Biol.*, 14: 586-95.
- Babst-Kostecka A.A., Parisod C., Godé C., Vollenweider P., Pauwels M. 2014. Patterns of genetic divergence among populations of the pseudometallophyte *Biscutella laevigata* from southern Poland. *Plant Soil*, 383: 245-256.
- Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. 2012. Mechanisms of heavy metals detoxification in plants. [W:] Łaska G. (red.), *Biological diversity – from cell to ecosystem*. Polish Botanical Society – Branch in Bałystok, Białystok, 57-71.
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, 3: 643-654.

- Baker A.J.M., Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126.
- Bone E., Farres A. 2001. Trends and rates of microevolution in plants. *Genetica*, 112-113: 165-182.
- Capa J.J., Pilon-Smits E.A.H. 2014. Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. *Planta*, 239: 267-275.
- Dresler S., Bednarek W., Wójcik M. 2014. Effect of cadmium on selected physiological and morphological parameters in metallicolous and non-metallicolous populations of *Echium vulgare*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 104: 332-338.
- Ernst W.H.O. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow Landsc. Res.*, 80: 251-274.
- Fiałkiewicz B., Rostański A. 2006. Morphological variability of *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek from selected habitats in the Silesian Upland (Southern Poland). *Biodiv. Res. Conserv.*, 1-2: 37-44.
- Grodzińska K., Korzeniak U., Szarek-Łukaszewska G., Godzik B. 2000. Colonization of zinc mine spoils in southern Poland – preliminary studies on vegetation, seed rain and seed bank. *Fragm. Flor. Geobot.*, 45: 123-145.
- Grodzińska K., Szarek-Łukaszewska G. 2002. Hałdy cynkowo-ołowiowe w okolicach Olkusa – przeszłość, teraźniejszość i przyszłość. *Kosmos*, 51: 127-138.
- Jędrzejczyk-Korycińska M. 2009. Obszary dawnej eksploatacji złóż cynkowo-ołowiowych – ich bogactwo florystyczne a możliwości ochrony. *Prob. Ekol. Kraj.*, 24: 71-80.
- Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. 2007. Trace elements from soil to human. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Krzaklewski W., Pietrzykowski M. 2002. Selected physico-chemical properties of zinc and lead ore tailings and their biological stabilisation. *Water Air Soil Pollut.*, 141: 125-142.
- Krzciuk K., Gałuszka A. 2014. Prospecting for hyperaccumulators of trace elements: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 18: 1-11.
- López-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramírez-Rodríguez V., Herrere-Estrella L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.*, 160: 1-13.
- Maestri E., Marmiroli M., Visioli G., Marmiroli N. 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.*, 68: 1-13.
- Olko A., Abratowska A., Żyłkowska J., Wierzbicka M., Tukiendorf A. 2008. *Armeria maritima* from a calamine heap – Initial studies on physiologic-metabolic adaptations to metal enriched soil. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 69: 209-218.

- Przedpeńska E., Wierzbička M. 2007. *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from a lead-zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil*, 299: 43-53.
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.*, 180: 169-181.
- Rausser W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell. Biochem. Biophys.*, 31: 19-48.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi z dn. 09.09.2002, Dz. U. Nr 165, poz. 1359, Warszawa, 2002.
- Siedlecka A., Tukendorf A., Skórzyńska-Polit E., Maksymiec W., Wójcik M., Baszyński T., Krupa Z. 2001. *Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae)*. [W:] Prasad M.N.V. (red.), *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker, Inc., 171-217.
- Skubała K. 2011. Vascular flora of sites contaminated with heavy metals on the example of two post-industrial spoil heaps connected with manufacturing of zinc and lead products in Upper Silesia. *Arch. Environ. Prot.*, 37: 57-74.
- Słomka A., Sutkowska A., Szczepaniak M., Malec P., Mitka J., Kuta E. 2011. Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. (Violaceae) in metal-polluted environments. *Chemosphere*, 83: 435-442.
- Szarek-Łukaszewska G. 2009. Vegetation of reclaimed and spontaneously vegetated Zn-Pb mine wastes in southern Poland. *Polish J. Environ. Stud.*, 18: 717-733.
- Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.*, 55: 35.
- Wąsowicz P., Pielichowska M., Przedpeńska-Wasowicz E., Bednarek P., Szarek-Łukaszewska G., Abratowska A., Wierzbička M. 2014. Physiological and genetic differentiation between metalcolous and non-metalcolous diploid populations of an alpine species *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) from the Tatra Mts. and the Northern Carpathian Foreland. *Ann. Bot. Fenn.*, 51: 227-239.
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J., Baker A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restor. Ecol.*, 12: 106-116.
- Wierzbička M., Rostański A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 44: 7-19.
- Wierzbička M., Słysz A. 2005. Does *Armeria maritima* subsp. *halleri* an endemic metallophyte of calamine spoils, occur in Poland? *Pol. Bot. Stud.*, 19: 105-117.
- Wong M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50: 775-780.

- Wójcik M. 2009. Vacuole as a multifunctional compartment in plant responses to stress factors. [W:] Maksymiec W. (red.), Compartmentation of responses to stresses in higher plants, true or false. Transworld Research Network, Kerala, India, 91-123.
- Wójcik M. 2012. Sprawozdanie merytoryczne do raportu końcowego z realizacji projektu badawczego własnego nr N N305 185737 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mechanizmy adaptacji u roślin zasiedlających składowiska odpadów z przetwórstwa rud cynku i ołowiu – badania ekologiczne, florystyczne i fizjologiczne”, okres realizacji: 2009-2012.
- Wójcik M., Dresler S., Jawor E., Kowalczyk K., Tukiendorf A. 2013. Morphological, physiological, and genetic variation between metalicolous and nonmetallicolous populations of *Dianthus carthusianorum*. *Chemosphere*, 90: 1249-1257.
- Wójcik M., Dresler S., Plak A., Tukiendorf A. 2015 a. Naturally evolved enhanced Cd-tolerance of *Dianthus carthusianorum* L. is not related to accumulation of thiol peptides and organic acids. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 22: 7906-7917.
- Wójcik M., Dresler S., Tukiendorf A. 2015 b. Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit – the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. *Plant Soil*, 390: 237-250.
- Wójcik M., Sugier P., Siebielec G. 2014. Metal accumulation strategies in plants spontaneously inhabiting Zn-Pb waste deposits. *Sci. Tot. Environ.*, 487: 313-322.
- Wójcik M., Tukiendorf A. 2014. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*, *Phytochemistry*, 100: 60-65.
- Yadav S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.*, 76: 167-179.
- Załęcka R., Wierzbicka M. 2002. The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (*Caryophyllaceae*) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland. *Plant Soil*, 246: 249-257.

5 Roślinność terenów wzbogaconych w metaliczne pierwiastki śladowe jako unikatowe źródło bioróżnorodności

Ewa Muszyńska* / Alina Wiszniewska / Ewa Hanus-Fajerska**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii
Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin

e-mail: *emuszynska@ogr.ur.krakow.pl
**e.hanus@ogr.ur.krakow.pl

Streszczenie

W pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczącej badań roślinności oraz wybranych gatunków porastających tereny o podwyższonym tle metalicznym. Omówiono strategie adaptacyjne pozwalające na wytworzenie genotypów tolerancyjnych na pierwiastki metaliczne. Zaprezentowano ważniejsze prace naukowe ukierunkowane na zachowanie aktualnie istniejącej bioróżnorodności florystycznej tej cennej grupy roślin naczyniowych, a także te, które pozwalają na wykorzystanie poszczególnych gatunków w trakcie remediacji środowiska. Podkreślono zalety techniki kulturywacji *in vitro* cennych gatunków metalofitów.

Słowa kluczowe: bioróżnorodność florystyczna, metalofity, mikrorozmnażanie, tolerancja

5.1. Wstęp

Do metali ciężkich zalicza się pierwiastki o liczbie atomowej powyżej 20 i gęstości wynoszącej ponad 4,5 lub 5,0 g·cm⁻³, w zależności od doniesień literaturowych (Gwóźdź, Kopyra 2003; Jamal i in. 2013). Pierwiastki te występują naturalnie w ekosystemach w efekcie erupcji wulkanicznych, wietrzenia skał czy pożarów roślinności. Tym niemniej, gospodarcza i bytowa działalność człowieka jest zaliczana do istotnych czynników, które warunkują podwyższoną koncentrację metali ciężkich w środowisku. Do antropogenicznych źródeł tego typu zanieczyszczeń zalicza się: hutnictwo metali nieżelaznych i przemysł metalurgiczny, intensywne technologie rolnicze polegające na stosowaniu dużej ilości nawozów sztucznych oraz chemicznych środków ochrony roślin, a także stałe zagęszczanie sieci i wzrost intensywności użytkowania szlaków komunikacyjnych (Polkowska i in. 2007; Jamal i in. 2013; Bolan i in. 2014).

Na terenach, gdzie zalegają rudy metali oraz na siedliskach o antropogenicznie podwyższonej zawartości metalicznych pierwiastków śladowych, występują gatunki, które, na drodze ewolucji, wykształciły przystosowania umożliwiające przetrwanie i reprodukcję w tym specyficznym środowisku. Poszczególne taksony bądź ekotypy roślin porastających takie siedliska stanowią ogromnie ważne, unikatowe źródło różnorodności biologicznej, przydatne i stosowane zarówno w badaniach o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym (Whiting i in. 2004; Ciarkowska, Hanus-Fajerska 2008; Jędrzejczyk-Korycińska 2009; Baker i in. 2010; Hanus-Fajerska 2011; Rascio, Navari-Izzo 2011; Nadgórska-Socha i in. 2015).

5.2. Badania roślin terenów wzbogaconych w pierwiastki metaliczne

Na siedliskach wzbogaconych w metale, na przestrzeni lat dochodzi do wykształcenia wyspecjalizowanych zbiorowisk, a liczne populacje roślin wykazują cały szereg przystosowań biochemicznych, fizjologicznych, morfologicznych i ekologicznych, dzięki którym osiągają sukces kolonizacyjny (Alford i in. 2010; Epelde i in. 2010; Pollard i in. 2014). Niemniej jednak, dla poszczególnych grup taksonomicznych tempo zmian ewolucyjnych prowadzących do wykształcenia genotypów tolerancyjnych, a tym samym zdolnych do wzrostu, reprodukcji i samorzutnego rozprzestrzeniania się na tych terenach jest ogromnie zróżnicowane i uważa się, że może trwać od zaledwie czterdziestu do nawet tysięcy lat (Bone, Farres 2001).

Taksony porastające podłoża o podwyższonym stężeniu metali ciężkich zwykle dzieli się na tak zwane metalofity obligatoryjne, czyli taksony zdolne do wzrostu jedynie na siedliskach metalonośnych, oraz na metalofity fakultatywne (pseudometalofity) – taksony, które występują zarówno na stanowiskach z wysoką zawartością metali, jak i na terenach niewykazujących podwyższonego tła metalicznego. W grupie metalofitów obligatoryjnych można wymienić m.in.: *Viola calaminaria* (Ging.) Lej i *Armeria maritima* (Mill.) Willd ssp. *halleri* Löve et Löve, zaś wśród pseudometalofitów – *Silene vulgaris* (Moench) Garcke i *Dianthus carthusianorum* L. (Wójcik i in. 2013; Pollard i in. 2014). Natomiast ze względu na rodzaj złoża mineralnego, wyróżnia się roślinność serpentynitową, porastającą gleby o wysokim odczynie, niskiej zawartości fosforu, potasu i wapnia oraz wysokiej koncentracji niklu, żelaza i chromu; gleby takie występują na dużych przestrzeniach w południowej Afryce, Nowej Zelandii czy Kalifornii (Brady i in. 2005; Ho i in. 2013). Na terenie Europy najwięcej gleb serpentynitowych spotyka się na Półwyspie Bałkańskim, głównie w Grecji, Serbii, Chorwacji i Albanii (Bani i in. 2010; Słomka i in. 2015); w Polsce gleby serpentynitowe są charakterystyczne przede wszystkim dla obszaru Dolnego Śląska (Żołnierz 2007). Z kolei na obszarach zalegania rud cynkowo-ołowiowych, obecnych na wszystkich kontynentach, a w Europie – na terenie Wielkiej Brytanii, Niemiec, Belgii, Francji i Polski, doszło do wykształcenia gleb porośniętych roślinnością galmanową. Zbiorowiska te tolerują suche podłoże, ubogie w azot i jednocześnie ponadnormatywnie zasobne w cynk, ołów, kadm, domieszki talu, arsenu i szeregu innych pierwiastków (Baker, Brooks 1989; Szarek-Łukaszewska, Grodzińska 2008; Cabała 2009). Przykładem naturalnych procesów sukcesji jest samorzutnie powstała murawa galmanowa (na składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych) w Bolesławiu k. Olkusza. Pierwsze publikowane źródła dotyczące tego zbiorowiska stanowią opracowania z początku dwudziestego wieku (Wóycicki 1913; Pax 1918; Zalewski 1986). Po drugiej wojnie światowej dr Jadwiga Dobrzańska z Katedry Botaniki ówczesnej Wyższej Szkoły Rolniczej, w pracy opublikowanej za namową profesora W. Szafera, dokonała spisu ponad 260 gatunków roślin nasiennych i ponad 20 gatunków mchów występujących na terenach galmanowych rejonu olkuskiego (Dobrzańska 1955). Po tych pionierskich badaniach, już od lat osiemdziesiątych dwudziestego wieku roślinność galmanowa tego terenu stała się przedmiotem wszechstronnych badań ekologicznych, florystycznych, fizjologicznych oraz genetycznych (Wierzbicka, Rostański 2002; Szarek-Łukaszewska 2009; Szarek-Łukaszewska, Grodzińska 2008, 2011; Jędrzejczyk-Korycińska 2009; Nowak i in. 2011; Słomka i in. 2012; Muszyńska 2013, 2014; Muszyńska i in. 2013, 2015; Muszyńska, Kołton 2013; Jędrzejczyk-Korycińska i in. 2014; Wójcik i in. 2013, 2015; Wójcik, Tukiendorf 2014). Prace florystyczne i ekologiczne dały nau-

kową podstawę niezbędną do utworzenia użytku ekologicznego „Pleszczotka” oraz obszaru chronionego „Sasanka – Stary Olkusz”, które stanowią miejsce występowania wielu cennych i coraz rzadziej występujących na terenie Polski roślin (Kapuśta i in. 2010; Kowolik i in. 2010). W odniesieniu do stanowisk znajdujących się na terenach zalegania rud cynkowo-ołowiowych stwierdzono, iż zostały one skolonizowane nie tylko przez gatunki występujące sporadycznie na terenie Europy i jedynie na nielicznych stanowiskach, lecz także przez gatunki, podgatunki i ekotypy gatunków pospolitych, które w wyniku adaptacji, nabyły tolerancję na wysokie stężenia jonów cynku i ołowiu, a także podstawowego pierwiastka towarzyszącego złożom rud Zn-Pb, czyli kadmu. Na szczególną uwagę zasługują: *Biscutella laevigata* L., galmanowy ekotyp *Dianthus carthusianorum*, *Armeria maritima* ssp. *halerii* (Wierzbicka, Potocka 2002; Wierzbicka, Rostański 2002; Szarek-Łukaszewska, Grodzińska 2008; Kowolik i in. 2010; Wójcik, Tukiendorf 2014). Dowiedziono, iż różnią się one znacznie od osobników rosnących na terenach nieskażonych. Populacje hałdowe przeważnie cechuje wysoka biomasa organów podziemnych, szereg przystosowań kseromorficznych i szybkie osiągnięcie fazy generatywnej (Wierzbicka, Panufnik 1998; Wierzbicka, Potocka 2002; Przedpeńska, Wierzbicka 2007). Trudne warunki siedliskowe, a zwłaszcza silne nasłonecznienie i duża przepuszczalność podłoża, skutkująca niską pojemnością wodną, są przyczyną sporego udziału gatunków termofilnych, takich jak: *Achillea millefolium* L., *Alyssum montanum* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Arenaria serpyllifolia* L., *Dianthus carthusianorum*, *Gypsophila fastigiata* L., *Helianthemum nummularium* (L.) Mill., *Potentilla arenaria* Borkh., *Reseda lutea* L., *Thymus pulegioides* L., *Thymus serpyllum* L. Na nieużytkach pokopalnianych, w wyniku spontanicznej i bardzo powolnej kolonizacji, pojawiają się również gatunki siedlisk ubogich, reprezentowane przykładowo przez *Silene vulgaris* czy *Festuca ovina* L., jak również inne liczne, przeważnie reprezentujące rodziny: Caryophyllaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Poaceae, które doskonale tolerują lokalnie występujące warunki siedliskowe. Występują tu również rośliny drzewiaste, takie jak: *Betula pendula* Roth., *Pinus silvestris* L., czy *Juniperus communis* L. (Jędrzejczyk-Korycińska 2009; Szarek-Łukaszewska 2009; Oleńska 2014). Murawa najstarszych hałd jest barwna niemal przez całe lato. W porze kwitnienia, *Biscutella laevigata*, *Alyssum montanum*, *Anthyllis vulneraria* czy *Scabiosa ochroleuca* L. nadają występującym tu zbiorowiskom żółtą barwę, natomiast różową – *Dianthus carthusianorum* i *Armeria maritima*. Fioletowo kwitną gatunki z rodzaju: *Thymus*, *Gentianatella*, *Veronica*, zaś na biało *Arabidopsis*, *Silene*, *Gypsophila*, *Galium* (Hanus-Fajerska i in. 2011; Szarek-Łukaszewska, Grodzińska 2011).

5.3. Strategie przystosowania do wzrostu na podłożu o podwyższonym tle metalicznym i możliwe mechanizmy tolerancji

Populacje gatunków porastających gleby zasobne w jony metali wykształciły różnorodne strategie przystosowawcze. Często u genotypów tolerancyjnych funkcjonuje mechanizm wykluczania, który pozwala na utrzymanie niskiego poziomu metalu w roślinie, mimo jego dużej zawartości w podłożu. Przy czym zauważono, że powyżej krytycznego stężenia metalu w środowisku, systemy odpowiedzialne za jego pobieranie zwykle przestają być skuteczne i w efekcie dochodzi do niekontrolowanego transportu jonów, co może być letalne (Viehweger 2014). Natomiast mechanizm akumulacji polega na gromadzeniu w tkankach wysokich stężeń jonów metali, co jest możliwe dzięki odpowiednim adaptacjom metabolicznym. Rośliny mogą gromadzić metale w korzeniach, zachowując tym samym ich niski poziom w pędach (wykluczanie z pędów; ang. *shoot excluders*). Strategię tego typu obserwowano w populacjach: *Plantago lanceolata* L., *Armeria maritima* (Szarek-Łukaszevska i in. 2004), *Silene vulgaris* (Wierzbička i in. 2004) i *Dianthus carthusianorum* (Baranowska-Morek, Wierzbička 2004; Wójcik, Tukiendorf 2014). Rośliny mogą również akumulować metale ciężkie w pędach, w stężeniach znacznie przekraczających ich zawartość w korzeniach (ang. *accumulators*). Istnieją gatunki zwane hyperakumulatorami, zdolne do gromadzenia metali w bardzo wysokich stężeniach. Termin „hyperakumulator” został zastosowany przez Brooksa i in. (1977) w odniesieniu do roślin akumulujących nikiel w organach nadziemnych, w ilości przekraczającej 1 000 mg kg⁻¹ suchej masy. Obecnie znanych jest ponad 400 gatunków tego typu i ich lista stale się powiększa. Według Bakera i Brooksa (1989), minimalna zawartość metalu zgromadzonego w tkankach hyperakumulatora powinna wynosić: dla kadmu – 100 mg kg⁻¹ s. m., dla ołowiu, niklu, kobaltu, chromu i miedzi – 1000 mg kg⁻¹ s. m., a dla cynku i manganu – 10 000 mg kg⁻¹ s. m. Nieco zmienione kryteria hyperakumulacji podaje van der Ent i in. (2013), zgodnie z którymi stężenia dla poszczególnych metali, oznaczone w suchej masie pędów, powinny wynosić: 100 mg kg⁻¹ dla kadmu, 300 mg kg⁻¹ dla miedzi, chromu i kobaltu, 1000 mg kg⁻¹ suchej masy dla ołowiu i niklu, 3 000 mg kg⁻¹ dla cynku oraz 10 000 mg kg⁻¹ dla manganu. Biorąc pod uwagę tę klasyfikację, ponad 500 gatunków roślin wykazuje właściwości hyperakumulacyjne względem jednego lub kilku pierwiastków (Bazzanti i in. 2011). Najczęściej wśród nich występują przedstawiciele następujących rodzin: Brassicaceae, Caryophyllaceae, Violaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Poaceae, Cunouniaceae, Flacourtiaceae. Spośród

pierwiastków, najbardziej efektywnie gromadzony jest nikiel, miedź, kobalt, selen, ołów, cynk i mangan (van der Ent i in. 2013). Istnieją również gatunki, zwane bioindykatorami, które pasywnie pobierają metale ze środowiska, a ich stężenie w tkankach jest proporcjonalne do zawartości metali w glebie. Na podstawie składu gatunkowego roślin wskaźnikowych na danym obszarze można rozpoznać typ skażenia gleby. Do bioindykatorów metali ciężkich należą między innymi: *Cardaminopsis arenosa* (L.) Hayek, *Vicia faba* L., *Plantago major* L., *Taraxacum officinale* F. H. Wigg (Capecka, Gawęda 2002; Wierzbicka, Rostański 2002; Markert 2008; Epelde i in. 2010). Tolerancja może być indukowana, zatem pojawiająca się, z perspektywy ewolucji, w stosunkowo krótkim czasie na skutek kontaktu roślin z wysokimi stężeniami metali ciężkich (przykładowo na bardzo silnie zanieczyszczonych glebach) lub konstytutywna, występująca u roślin, które nigdy wcześniej w środowisku naturalnym nie zetknęły się ze stężeniem metali mogącym wywołać presję selekcyjną (Wierzbicka, Potocka 2002; Roosens i in. 2008). Wykształcenie tolerancji wiąże się z koniecznością uruchomienia wydajnych wewnątrzkomórkowych mechanizmów walki ze stresem, a koszt energetyczny wytworzenia takiej odporności jest bardzo duży (Küpper i in. 2004; Jabeen i in. 2009), więc rośliny tolerancyjne charakteryzuje słabsze tempo wzrostu w porównaniu do populacji analogicznych gatunków, które występują na terenach nieskażonych (Maestri i in. 2010; Wójcik i in. 2013, 2015). Przykładowo, do cech adaptacyjnych galmanowego ekotypu *Dianthus carthusianorum* należą przystosowania kserotermiczne: ograniczenie wzrostu części nadziemnych, krótsze i węższe liście, redukcja ich liczby, wskutek czego powierzchnia transpiracji tych roślin jest mniejsza o około 25% względem powierzchni określonej dla roślin porastających stanowiska nieskażone. Ponadto, u osobników galmanowych obserwuje się silniejszy wzrost systemu korzeniowego i obfite tworzenie włośników. Liczne rośliny terenów przemysłowych cechuje wczesne wchodzenie w fazę generatywną, obfite kwitnienie i owocowanie. Strategia zwiększonej płodności kosztem przyrostu biomasy jest uzasadniona, gdyż zwiększa szansę zachowania gatunku w trudnych warunkach siedliskowych (Załęcka, Wierzbicka 2002). Konsekwencją funkcjonowania mechanizmów tolerancji jest zróżnicowana odpowiedź poszczególnych populacji na pojawiający się stres. Oznacza to, że gatunki, podgatunki bądź ekotypy tolerancyjne są mniej narażone na wzrastające stężenie jonów metali w podłożu niż populacje nietolerancyjne (Wójcik i in. 2015). Dla przykładu, podwyższony poziom cynku okazał się bardziej toksyczny dla uprawianych hydroponicznie osobników *Arabidopsis halleri* (L.) O’Kane&Al Shehbaz, reprezentujących populacje z terenów nieskażonych metalami ciężkimi (Meyer i in. 2010). Podobnie, rośliny *Dianthus carthusianorum*, uzyskane z nasion pobranych z osobników porastających obszary nieskażone oraz tereny o podwyż-

szonym tle metalicznym, odmiennie reagowały na traktowanie jonami ołowiu (Wójcik, Tukiendorf 2014).

5.4. Badania w zakresie zachowania bioróżnorodności metalofitów

Zachowanie aktualnie istniejącej bioróżnorodności metalofitów stanowi jeden z kluczowych elementów całokształtu działań, mających na celu poprawę stanu środowiska, gdyż rośliny te mogą być wykorzystane w trakcie rekultywacji terenów skażonych do poziomu toksycznego dla innych gatunków. Z inicjatywy środowisk naukowych rozpoczęto prace nad tworzeniem i utrzymaniem kolekcji metalofitów, zarówno o zasięgu lokalnym, jak i globalnym (Whiting i in. 2004; Rostański i in. 2014). Wśród nich warto wymienić Herbarium Uniwersytetu Śląskiego (KTU-HMP), w którym zgromadzono ponad 2 000 okazów roślin naczyniowych, reprezentujących metalotolerancyjne populacje terenów o podwyższonej zawartości pierwiastków śladowych, występujące na obszarze południowej Polski (monokliny Śląsko-Krakowskiej), Niemiec (góry Harz, Nadrenia Północna – Westfalia) oraz Belgii (La Calamine, Moresnet i Plombières). Kolekcja ta obejmuje: metalofity oraz hyperakumulatory porastające tereny historycznego wydobywania rud; gatunki siedlisk antropogenicznie wzbogaconych w metale ciężkie, o oznaczonej zawartości pierwiastków śladowych w podłożu, gatunki reprezentujące tereny przemysłowe o nieznanym poziomie zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi oraz okazy pochodzące z eksperymentów, uprawiane na podłożu wzbogaconym w określone stężenia toksycznych jonów. Kolekcję uzupełniają bazy danych, zawierające informacje na temat morfo- i genotypów poszczególnych metalofitów, miejsc ich występowania oraz krótki opis wykonanych obserwacji lub przeprowadzonych eksperymentów (Rostański i in. 2014; Tokarska-Guzik i in. 2014). Podobnie, wartość ekologiczną i biotechnologiczną metalofitów i ich siedlisk dokumentuje baza danych BioRem, która jest dostępna po adresie internetowym: <http://www.univie.ac.at/biorem>. Jest to platforma umożliwiająca wymianę oraz gromadzenie informacji, między innymi, z zakresu bioróżnorodności czy ekofizjologii roślin pochodzących z terenów o podwyższonej zawartości metali ciężkich w podłożu (Nebel i in. 2013). Prowadzone są również badania nad efektywnością zastosowania metod biotechnologicznych w remediacji oraz w ochronie zasobów genowych poszczególnych populacji metalofitów, a wykorzystanie do tego celu technik kultur *in vitro* ciągle stanowi nowatorskie podejście. Opracowanie protokołów rozmnażania materiału roślin-

nego w warunkach aseptycznych jest cenne w przypadku unikatowych przedstawicieli flory poszczególnych nisz ekologicznych. Niemniej jednak publikacje dokumentujące zastosowanie tego typu metod, w odniesieniu do roślin metalotolerancyjnych, są dość nieliczne (Bidwell i in. 2001; Jack i in. 2005; Zhao i in. 2009; Hanus-Fajerska i in. 2012; Wiszniewska i in. 2015). Dobry przykład stanowią próby opracowania wydajnego protokołu regeneracji *Thlaspi caerulescens* J. Presl et C. Presl – najbardziej znanego hyperakumulatora cynku i kadmu (Xu i in. 2008) lub *Pteris vittata* L. – hyperakumulatora arsenu (Zheng i in. 2008; Shukla, Khare 2014). Również w Zakładzie Botaniki i Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie od lat prowadzone są badania z wykorzystaniem roślinnych kultur tkankowych. Dotychczas opracowano metody efektywnego mikrorozmnażania następujących taksonów, reprezentujących populacje galmanowe Olkuskiego Rejonu Rudnego: *Anthyllis vulneraria* (Fabaceae), *Armeria maritima* ssp. *halleri* (Plumbaginaceae), *Alyssum montanum*, *Biscutella laevigata* (Brassicaceae), *Dianthus carthusianorum*, *Gypsophila fastigiata*, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae), *Scabiosa ochroleuca* (Dipsacaceae) (Hanus-Fajerska, Czura 2009; Hanus-Fajerska 2011; Hanus-Fajerska i in. 2012; Muszyńska, Hanus-Fajerska 2012; Koźmińska, Muszyńska 2014; Muszyńska i in. 2014). Podejmowane w Zakładzie zagadnienia dotyczą również wykorzystania technik kultur *in vitro* do oceny morfologicznej, anatomicznej i fizjologicznej odpowiedzi roślin na stres metaliczny oraz selekcji linii o podwyższonej odporności na metale ciężkie (Muszyńska 2013; Muszyńska, Kołton 2013; Muszyńska 2014; Wiszniewska i in. 2015). Ponadto, testuje się przydatność galmanowych ekotypów roślin, uzyskanych zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i szklarniowych do remediacji podłoża skażonych metalami ciężkimi (Ciarkowska, Hanus-Fajerska 2008; Hanus-Fajerska 2011; Muszyńska i in. 2013, 2015). Nad wyraz pożądane są również szerokie działania edukacyjne, mające na celu upowszechnianie wiedzy na temat tych unikalnych roślin i ich zbiorowisk, a także walorów geologicznych oraz krajobrazowych obiektów górniczych, hutniczych i przemysłowych.

Podziękowania

Autorzy wyrażają wdzięczność za dotację statutową Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego na rzecz Zakładu Botaniki i Fizjologii Roślin IBRiB Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Literatura

- Alford E.R., Pilon-Smits E.A.H., Paschke M.W. 2010. Metallophytes – a view from the rhizosphere. *Plant Soil*, 337: 33-50.
- Baker A.J.M., Ernst W.H.O. van der Ent A., Malaisse S., Ginocchio R. 2010. Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America. *Ecology of Industrial Pollution [W:] Batty L.C., Hallberg K.B. Ecology of industrial pollution. Published by Cambridge University Press. British Ecological Society.*
- Baker A.J.M., Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126.
- Bani A., Pavlova D., Guillaume Echevarria G. Mullaj A., Reeves R.D., Morel J.L., Sulçe S. 2010. Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (Brassicaceae) from the ultramafic soils of the Balkans. *Bot. Serbica*, 34 (1): 3-14.
- Baranowska-Morek A., Wierzbicka M. 2004. Localization of lead in root tip of *Dianthus carthusianorum*. *Acta Biol. Crac. Bot.*, 46: 45-56.
- Barzanti R., Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Pignattelli S., Gabbriellini R., Gonnelli C. 2011. Cadmium phytoextraction potential of different *Alyssum* species. *J. Hazard. Mat.*, 196: 66-72.
- Bidwell S.D., Pederick J.W., Somer-Knudsen J., Woodrow J.E. 2001. Micropropagation of the nickel hyperaccumulator *Hybanthus floribundus* (Family Violaceae). *Plant Cell Tiss. Org.*, 67: 88-92.
- Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M.B., Scheckel K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – to mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mat.*, 266: 141-166.
- Bone E., Farres A. 2001. Trends and rates of microevolution in plants. *Genet.* 112-113: 165-182.
- Brady K.U., Kruckeberg A., Bradshaw Jr. 2005. Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.*, 36: 243-66.
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffré T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *J. Geochem. Explor.*, 7: 49-57.
- Cabała J. 2009. Metale ciężkie w środowisku glebowym olkuskiego rejonu eksploatacji rud Zn-Pb. *Prace Nauk. UŚ, Rozpraw, Z.* 2729.
- Capecka E., Gawęda M. 2002. The content of some metals in dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) plants from natural sites in Małopolska. *Herba Pol.*, 42 (3): 209-217.
- Ciarkowska K., Hanus-Fajerska E. 2008. Remediation of soil-free grounds contaminated by zinc, lead and cadmium with the use of metallophytes. *Pol. J. Environ. Stud.*, (5): 707-712.
- Dobrzańska J. 1955. Badania florystyczno-ekologiczne nad roślinnością galmanową okolic Bolesławia i Olkusza. *Acta Soc. Bot. Pol.*, XXIV(2): 357-408.

- Epelde L., Becerril J.M., Barrutia O., González-Oreja J.A., Garbisu C. 2010. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environ. Pollut.*, 158: 1576-1583.
- Gwóźdź E.A., Kopyra M. 2003. Reakcje komórek roślinnych na metale ciężkie – aspekty biotechnologiczne. *BioTechnologia*, 3: 107-123.
- Hanus-Fajerska E. 2011. Opracowanie metodyki mikrorozmnażania wybranych metalofitów w celu remediacji podłoża zanieczyszczonych kadmem, ołowiem i cynkiem. *Zesz. Nauk. UR*, 471, Rozprawy, Z. 348.
- Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K., Karczewska I., Kowalska I. 2011. Local flora representatives of areas highly polluted with heavy metals as a suitable plant material for naturalistic gardens of that region. *Ochr. Środ. i Zasob. Nat.*, 49: 71-83.
- Hanus-Fajerska E., Czura A. 2009. Mikrorozmnażanie *Silene vulgaris*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 539: 57-63.
- Hanus-Fajerska E., Wiszniewska A., Muszyńska E. 2012. *In vitro* multiplication and acclimatization of *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) to cultivation in greenhouse conditions. *BioTechnol.*, 93 (2): 97-101.
- Ho C.P., Hseu Z.Y., Chen N.-C., Tsai C.C. 2013. Evaluating heavy metal concentration of plants on a serpentine site for phytoremediation application. *Environ. Earth Sci.*, 70: 191-199.
- Jabeen R., Ahmad A., Iqbal M. 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Bot. Rev.*, 75: 339-364.
- Jack E., Atanosova S., Verkleij J.A. 2005. Callus induction and plant regeneration in the metallophyte *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *Plant Cell Tiss. Org.*, 80: 25-31.
- Jamal Q., Durani P., Khan K., Munir S., Hussain S., Munir K., Anees M. 2013. Heavy metals accumulation and their toxic effects: review. *JBMS*, 1(1-2): 27-36.
- Jędrzejczyk-Korycińska M. 2009. Obszary dawnej eksploatacji złóż cynkowo-ołowiowych – ich bogactwo florystyczne a możliwości ochrony. *Probl. Ekol. Krajobr.* XXIV: 71-80.
- Jędrzejczyk-Korycińska M., Woźnica P., Folcik Ł., Rostański A., Bzdęga K., Nowak T., Urbisz A., Urbisz A., Szotek M. 2014. Upper Silesia heavy-metal sites – the characteristic of nature. *Acta Biol. Crac. Bot.*, suppl. 2:61.
- Kapusta P., Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K., Godzik B. 2010. Murawy galmanowe okolic Olkusza (południowa Polska) i problemy ich ochrony. *Chr. Przyr. Ojcz.*, 66 (1): 27-33.
- Kowolik M., Szarek-Łukaszewska G., Jędrzejczyk-Korycińska M. 2010. Użytek ekologiczny „Pleszczotka górską” w cynkowo-ołowiowym terenie pogórnym – potrzeba aktywnej ochrony *Chr. Przyr. Ojcz.*, 66: 35-38.
- Koźmińska A., Muszyńska E. 2014. Wpływ jonów ołowiu na *Alyssum montanum* w kulturze *in vitro*. *Episteme*, 22 (III): 67-74.

- Küpper H., Mijovilovich A., Meyer-Klaucke W., Kroneck P.M.H. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-Ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol.*, 134: 748-757.
- Maestri H., Marmiroli M., Visoli G., Marmiroli N. 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation. Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.*, 68: 1-13.
- Markert B. 2008. From biomonitoring to integrated observation of the environment – the multi-markered bioindication concept. *Ecol. Chem. Eng.*, 15 (3): 315-333.
- Meyer C.L., A. Kostecka A.A., Saumitou-Laprade P., Créach A., Castric V., Pauwels M., Frérot H. 2010. Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phyt.*, 185: 130-142.
- Muszyńska E. 2013. Wpływ kwasu giberelinowego oraz światła na kiełkowanie nasion i wzrost siewek *Gypsophilla fastigiata* i *Scabiosa ochroleuca*. *Episteme*, 18 (II): 311-318.
- Muszyńska E. 2014. Ocena zdolności do zmiatania rodnika DPPH oraz zawartości związków fenolowych w pędach *Dianthus carthusianorum* poddanych działaniu jonów kadmu. [W:] Walińska K. (red.), *Od Biotechnologii do Ochrony Środowiska*. Wyd. UZ, Zielona Góra, 2: 81-93.
- Muszyńska E., Kołton A. 2013. Zawartość fenoli w pędach *Gypsophilla fastigiata* pod wpływem wzrastającego stężenia jonów ołowiu. *Logistyka*, 4: 376-381.
- Muszyńska E., Hanus-Fajerska E. 2012. Ocena możliwości otrzymania siewek pleszczotki górskiej w warunkach *in vitro*. *Episteme*, 15: 437-445.
- Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K. 2015. Studies on *Gypsophilla fastigiata* parameters verifying its suitability to reclamation of post-flotation Zn-Pb wastes. *Geol. Geoph. Envir.*, 41 (1): 17-24.
- Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K. 2013. Evaluation of seed germination ability of native calamine plant species on different substrata. *Pol. J. Environ. Stud.*, 22 (6): 1775-1780.
- Muszyńska E., Piwowarczyk B., Hanus-Fajerska E., Wiszniewska E. 2014. *In vitro* cultures of *Biscutella laevigata*. *Acta Biol. Crac. Bot.*, suppl. 2: 68.
- Nadgórska-Socha A., Kandziora-Ciupa M., Ciepał R. 2015. Element accumulation, distribution, and phytoremediation potential in selected metallophytes growing in a contaminated area. *Environ. Mon. Assess.*, 187: 441-456.
- Nebel L., Kreitner G., Horak O., Adlassing W., Eder G., Palomino E., Leyva M., Lichtscheidl I. 2013. BioRem – database for remediation of heavy metal rich habitats and protection of their biodiversity. *Am. J. Plant Sci.*, 4: 1938-1940.
- Nowak T., Kapusta P., Jędrzejczyk-Korycińska M., Szarek-Łukaszewska G., Godzik B. 2011. The vascular plants of the Olkusz Ore-bearing Region. *Drukarnia Kolejowa Kraków Sp. z o.o., Kraków*.

- Oleńska E. 2014. Bobowate różnowiekowych hałd cynkowo-ołowiowych w Polsce. [W:] Łaska G. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów. Wyd. Pol. Tow. Bot., Białystok, 227-239.
- Pax F. 1918. Die Pflanzenwelt Polens (Handbuch von Polen). Berlin Verlag V. D. Reimer
- Polkowska Ż., Dubiella-Jackowska A., Zabiegała B., Namieśnik J. 2007. Skład zanieczyszczeń wprowadzanych do środowiska wzdłuż dróg o różnym natężeniu ruchu pojazdów mechanicznych, *Eco. Chem. Eng.*, 14/S3: 59-83.
- Pollard A.J., Reeves R.D., Baker A.J.M. 2014. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Sci.*, 217-218: 8-17.
- Przedpeńska E., Wierzbicka M. 2007. *Arabidopsis arenosa* (*Brassicaceae*) from lead – zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil*, 299: 43-53.
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.*, 180: 169-181.
- Roosens N.H.C.J., Willems G., Saumitou-Laprade P. 2008. Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Tren. Plant. Sci.*, 13 (5): 208-215.
- Rostański A., Jędrzejczyk-Korycińska M., Gerold-Śmietańska I. 2014. The collection of metallophytes in Scientific Herbarium of the University of Silesia (KTU-HMP). *Acta Biol. Crac. Bot.*, suppl., 2:38.
- Shukla S.P., Khare P.B. 2014. *In vitro* conservation of some threatened and economically important ferns belonging to the Indian subcontinent. *J. Bot.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/949028>.
- Słomka A., Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., Karcz J., Kawalec P., Kuta E. 2012. Heavy metals in soil affect reproductive processes more than morphological characters in *Viola tricolor*. *Environ. Exp. Bot.*, 75: 204-211.
- Słomka A., Godzik B., Szarek-Łukaszewska G., Shuka L., Hoef-Emden K., Bothe H. 2015. Albanian violets of the section *Melanium*, their morphological variability, genetic similarity and their adaptations to serpentine or chalk soils. *Plant Physiol.*, 174: 110-123.
- Szarek-Łukaszewska G. 2009. Vegetation of reclaimed and spontaneously vegetated Zn-Pb mine wastes in Southern Poland. *Pol. J. Environ. Stud.*, 18 (4): 717-733.
- Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K. 2008. Naturalna roślinność w rejonach starych zwalów odpadów po górnictwie rud Zn-Pb w okolicy Bolesławia i Bukowna (region śląsko-krakowski; południowa Polska). *Przegl. Geol.*, 56: 528-531.
- Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K. 2011. Grasslands of a Zn-Pb post-mining area (Olkusz Ore-Bearing Region, S. Poland). *Pol. Bot. J.*, 56 (2): 245-260.
- Szarek-Łukaszewska G., Słysz A., Wierzbicka M. 2004. Response of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. to Cd, Zn and Pb. *Acta Biol. Crac. Bot.*, 46: 19-24.

- Tokarska-Guzik B., Woźniak G., Rostański A., Jędrzejczyk-Korycińska M. 2014. The application potential of metallophyte plant species collected in the BIOGEO-SILESIA ORSIP database. *Acta Biol. Crac. Bot.*, suppl., 2:79.
- van der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil*, 362: 319-334.
- Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.*, 55: 35-47.
- Whiting S.N. Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginnochio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schaat H., Zhao F.J., Baker A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restor. Ecol.*, 12: 106-116.
- Wierzbicka M., Panufnik D. 1998. The adaptation of *Silene vulgaris* to growth on a calamine waste heap (S. Poland). *Environ. Pollut.*, 101: 415-426.
- Wierzbicka M., Potocka A. 2002. Lead tolerance in plants growing on dry and moist soils. *Acta Biol. Crac. Bot.*, 44: 21-28.
- Wierzbicka M., Rostański A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz Poland: a review. *Acta Biol. Crac. Bot.*, 44: 7-19.
- Wierzbicka M., Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K. 2004. Highly toxic thallium in plants from the vicinity of Olkusz (Poland). *Ecotox. Environ. Safe.*, 59: 84-88.
- Wiszniewska A., Hanus-Fajerska E., Smoleń S., Muszyńska E. 2015. *In vitro* selection for lead tolerance in shoot culture of *Daphne* species. *Acta Sci. Pol. H. Cul, Hort.* 14 (1): 129-142.
- Wójcik M., Dresler S., Jawor E., Kowalczyk K., Tukiendorf A. 2013. Morphological, physiological, and genetic variation between metallicolous and nonmetallicolous population of *Dianthus carthusianorum*. *Chemosph.*, 90: 1249-1257.
- Wójcik M., Dresler S., Tukiendorf A. 2015. Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit – the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-015-2396-6.
- Wójcik A., Tukiendorf A. 2014. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*. *Phytochemistry*, 100: 60-65.
- Wóycicki Z. 1913. Obrazy roślinności Królestwa Polskiego. IV. Roślinność terenów galmanowych Bolesławia i Olkusza. Kasa Mianowskiego. Warszawa.
- Xu J., Zhang Y.X., Chai T.Y., Guan Z.Q. Wei W., Han L., Cong L. 2008. *In vitro* multiplication of heavy metals hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Biol. Plant.*, 52 (1): 97-100.
- Zalewski A. 1986. Zapiski roślinoznawcze z Królestwa Polskiego i z Karpat. Sprawozdania z Komisji Fizjograficznej Akademii Umiejętności w Krakowie. Tom 20: 171-190.
- Załęcka R., Wierzbicka M. 2002. The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland. *Plant Soil*, 246: 249-257.

- Zhao S.J., Zhang Z.C., Gao X., Tohsun G., Qiu B.S. 2009. Plant regeneration of the mining ecotype *Sedum alfredii* and cadmium hyperaccumulation in regenerated plants. *Plant Cell Tiss. Org.*, 99: 9-16.
- Zheng Y., Xu W., He Z., Ma M. 2008. Plant regeneration of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from spores and identification of its tolerance and accumulation of arsenic and copper. *Acta Physiol. Plant.*, 30: 249-255.
- Żołnierz L. 2007. Zbiorowiska trawiaste występujące na dolnośląskich serpentynitach – wybrane aspekty ekologii. *Zesz. Nauk. UP, Wrocław*, 555: 2-18.

Rośliny mięsożerne jako przykład adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego

Urszula Krasuska* / Anna Dzierżyńska / Katarzyna Ciąćka /
Olga Andrzejczak / Paweł Staszek / Agnieszka Gniazdowska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Fizjologii Roślin

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

*e-mail: urszula_krasuska@sggw.pl

Streszczenie

Niekorzystne dla wzrostu roślin warunki środowiska naturalnego powodują wprowadzanie zmian przystosowawczych, które niekiedy bywają zdumiewające. Interesującym przykładem adaptacji do środowiska ubogiego w łatwo dostępne składniki mineralne było wykształcenie mięsożerności u autotrofów. Ograniczona dostępność składników mineralnych w podłożu, zmusiła rośliny wyższe do fizjologicznego „przeprogramowania”, umożliwiającego pozyskiwanie pokarmu zwierzęcego. W toku ewolucji, mięsożerność powstawała wielokrotnie i niezależnie – na odseparowanych geograficznie obszarach. Szacuje się, że obecnie istnieje ok. 700 gatunków roślin mięsożernych, aczkolwiek liczba ta stale ulega zmianom. Z jednej strony, są odkrywane nowe gatunki, z drugiej, ingerencja człowieka w środowisko naturalne powoduje, że rośliny te giną. Szansą na przetrwanie roślin mięsożernych jest wzrost zainteresowania tymi organizmami, nie tylko ze względu na ich specyficzny sposób pozyskiwania pokarmu czy wygląd, ale również na potencjalną możliwość wykorzystania różnych związków organicznych znajdujących się w ich cieczy trawiennej. Sugeruje się, że substancje te mogłyby zastąpić antybiotyki czy powszechnie stosowane repelenty.

Za pobieranie składników pokarmowych u „typowych” roślin odpowiada głównie korzeń. Niektóre funkcje słabo wykształconego systemu korzeniowego roślin mięsożernych przejęła pułapka. Ma to miejsce u rosiczek (*Drosera*), muchołówek (*Dionaea*), kapturnic (*Sarracenia*) i dzbaneczników (*Nepenthes*). Niektóre z tych roślin w ogóle nie wykształcają systemu korzeniowego, jak ma to miejsce u aldrowand (*Aldrovanda*), części pływaczy (*Utricularia*) i żenlisei (*Gentlisea*). Z drugiej strony, istnieją wyjątki posiadające dobrze rozwinięty system korzeniowy, jak u rosolistników (*Drosophyllum*) czy byblis (*Byblis*). Celem pracy jest przedstawienie wybranych zmian adaptacyjnych roślin mięsożernych, które to zmiany umożliwiają im zasiedlanie środowiska naturalnego, niekorzystnego dla „typowych” autotrofów.

Słowa kluczowe: NO, ciecz trawienna

6.1. Wstęp

W zależności od typu środowiska naturalnego, rośliny wyższe mogą dostosowywać się do panujących warunków zewnętrznych, np. poprzez modyfikację niektórych organów, w tym liści. Podstawową funkcją fizjologiczną liści jest przeprowadzanie fotosyntezy, która zachodzi w chloroplastach. Przekształcając energię świetlną w energię wiązań chemicznych, rośliny produkują organiczne związki węgla. Na tej podstawie wykształciło się przeświadczenie o roślinach jako nieszkodliwych organizmach, które raczej służą zwierzętom jako pokarm, a nie odwrotnie. Pojęcie drapieżnictwa jest zarezerwowane głównie dla zwierząt. Niemniej jednak funkcjonowanie organizmu roślinnego jako „drapieżnika” co jakiś czas pojawia się w ludzkiej wyobraźni. Odzwierciedleniem tego faktu we współczesnych czasach jest literatura i film, w których występują rośliny przedstawiane jako krwiożercze potwory. Ciekawy przykład stanowią Tryfidy, rośliny polujące na ludzi – stwory wymyślone przez Johna Wyndhama. Skąd się bierze wizja roślin, które łakną krwi zwierząt, a może i nawet samego człowieka? Sama aktywność fotosyntetyczna nie wystarcza do tego, by organizm roślinny mógł prawidłowo funkcjonować. Większość roślin lądowych wykształciła korzenie, które nie tylko mocują cały organizm do podłoża, ale umożliwiają pozyskiwanie składników mineralnych. Korzenie charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną, związaną nie tylko z absorpcją, ale i wydzielaniem szeregu substancji organicznych do otoczenia. Powszechnie akceptowana jest teoria mówiąca o tym, że korzenie pełnią rolę mózgu rośliny, zapewniając jej ciągłą wymianę informacji z otoczeniem (Baluška i in. 2010). Presja selekcyjna środowiska naturalnego o deficytowym zaopatrzeniu w składniki mineralne wyznaczyła kierunek zmian adaptacyjnych prowadzących, między innymi do mięsożerności u roślin. Charakterystyczna modyfikacja roślin mięsożernych dotyczy liści, które z typowych organów asymilacyjnych zostały przekształcone w pułapki. Jednakże, wyniki licznych badań wykazały, że proces fotosyntezy pułapek roślin mięsożernych nie pokrywa ich potrzeb na asymilaty, jak ma to miejsce w przypadku liści „typowych” roślin (Adlassnig i in. 2009). Pośród roślin mięsożernych występują również te, które w dużym stopniu lub nawet całkowicie są pozbawione chlorofilu i schwyte ofiary stanowią źródło zarówno składników mineralnych, jak i zredukowanych związków węgla (Król i in. 2012). Kolejną cechą adaptacyjną roślin mięsożernych jest modyfikacja systemu korzeniowego, w zależności od warunków środowiska. Szczególnie ma to znaczenie u tych gatunków, których korzenie muszą funkcjonować w otoczeniu charakteryzującym się niską zawartością tlenu oraz pH ok. 3.

U licznych gatunków funkcje związane z pozyskiwaniem składników pokarmowych zostały przejęte przez pułapki (Adlassnig i in. 2005). Rośliny mięsożerne absorbują z ciał schwytanych ofiar głównie azot, fosfor i siarkę, a także potas, wapń czy cynk (Adlassnig i in. 2009). Ponadto pierwiastki takie jak: magnez, mangan, a nawet węgiel są łatwo uwalniane z trawionych ofiar i absorbowane przez roślinę (Adlassnig i in. 2009; Król i in. 2012). Wykazano, że ilość pobieranych pierwiastków z ofiar nie jest jednakowa dla każdej pułapki danej rośliny. Pułapki zatem, tworzą odrębne, fizjologiczne jednostki „trawienne” (Adlassnig i in. 2009). Mineralne odżywianie roślin mięsożernych zostało opisane w j. polskim w pracy przeglądowej Krasuskiej i in. (2012).

Jak wspomniano, duża część roślin mięsożernych posiada słabo wykształcony system korzeniowy lub korzenie, które występują jedynie tymczasowo. Ponadto niektóre gatunki roślin, zwłaszcza zasiedlające środowisko wodne, w ogóle nie wytwarzają korzeni (Adlassnig i in. 2005), jak ma to miejsce w przypadku ok. 50 gatunków pływaczy (Adamec 2010). Wygląda na to, że roślinny „system trawienny” został połączony z niektórymi funkcjami roślinnego „mózgu”.

Dotychczas opisano ok. 700 gatunków roślin mięsożernych, jednak liczba ta ulega zmianom. Z jednej strony, są wciąż odkrywane nowe gatunki; niestety, postępująca degradacja naturalnych siedlisk powoduje, że roślin tych z roku na rok ubywa (Król i in. 2012). W toku ewolucji roślin okrytozalążkowych mięsożerność rozwinęła się wielokrotnie i niezależnie. Rośliny mięsożerne można odnaleźć zarówno pośród jednoliściennych, jak i dwuliściennych. Rozwój strategii wabienia i „chwytania” ofiary zależy od danego środowiska, tym czynnikiem w głównej mierze należy tłumaczyć taką różnorodność cech analizowanych organizmów, podobnie jak rozmaitość typów pułapek (Ellison, Gotelli 2001; 2009).

6.2. Mięsożerność – adaptacja roślin do warunków ograniczonej dostępności składników mineralnych

Pierwszy, naukowy opis dotyczący roślin, które „zjadają” owady (zwierzęta) można znaleźć w książce Karola Darwina zatytułowanej „Rośliny owadożerne” (Król i in. 2012). Rośliny te występują na terenach podmokłych, bagiennych, torfowiskach, w stojących zbiornikach wodnych, w okolicach strumieni terenów górzyskich czy w lasach tropikalnych. Wspólną cechą tych nisz ekologicznych jest słaba dostępność składników mineralnych dla „typowych” roślin (Adamec 2002). Ciekawym wyjątkiem jest *Drosophyllum lusitanicum*, który rośnie na glebach piaszczys-

tych południowych terenów Hiszpanii i Portugalii. Roślina ta jest w stanie przetrzymać nawet do 5 miesięcy bezdeszczowych, intensywnie pobierając wodę dzięki dobrze rozwiniętemu systemowi korzeniowemu (Adlassnig i in. 2005). W Polsce również można odnaleźć rośliny mięsożerne, które należą do grup: pływaczy, aldrowand, rosiczek i tłustoszy (*Pinguicula*) (Mazik 2012). Rosiczki stanowią najbardziej rozpoznawalną grupę roślin mięsożernych. Zgubne dla tej rośliny jest jej występowanie na torfowiskach, terenach eksploatowanych przez człowieka i masowo osuszanych (Mazik 2012). Kosmopolityczne rośliny mięsożerne to pływacze, które występują w Australii, Ameryce Południowej, jak i w większej części Europy, także w Polsce (Płachno, Jankun 2003). Pływacze charakteryzują się wytworzeniem szczególnie skomplikowanej i bardzo szybkiej – w reakcji na ofiarę – pułapki (Płachno, Jankun 2003).

Wykazano, że mięsożerność w świecie roślin jest niezwykle kosztowna energetycznie, zwłaszcza w procesie wytwarzania pułapek i utrzymania ich aktywności fizjologicznej (Pavlovič i in. 2009). Wyniki badań prowadzonych, między innymi, nad aktywnością fotosyntetyczną roślin mięsożernych pozwoliły ustalić bilans zysków-strat, który wykazuje, że adaptacja ta jest możliwa przeważnie w środowiskach ubogich w składniki pokarmowe, które dodatkowo są oświetlone i jednocześnie wilgotne (Givinish i in. 1984; Adlassnig i in. 2009). Uważa się, że mięsożerność wskazująca na heterotrofię może w pewien sposób uzupełniać niedobory pokarmowe odżywiających się autotroficznie roślin (Givinish i in. 1984). Pomimo przeprowadzania fotosyntezy, dzbaneczniki mogą pobierać i wykorzystywać węgiel pozyskany z trawionych ciał do syntezy własnych związków organicznych, co sugeruje częściową heterotrofię. Ponadto, wzrost niektórych gatunków roślin mięsożernych zależy od ilości węgla pobranego drogą cudzożywności (Pavlovič i in. 2009). W skład podstawowego „jadłospisu” roślin mięsożernych zalicza się przede wszystkim mrówki, termity, muchy, komary i pająki, drobne organizmy wodne, lecz także ślimaki (Płachno, Jankun 2003; Bennett, Ellison 2009; Adlassnig i in. 2011).

Mięsożerność, jako adaptacja, mogła powstać dzięki wykształceniu tzw. syndromu mięsożerności, który jest definiowany jako zdolność rośliny do wabienia ofiary, schwytania jej, uśmiercenia i strawienia – w celu absorpcji składników odżywczych. Nie wszystkie rośliny wykształciły w pełni ten syndrom. Kapturnice korzystają z „pomocy” mikroorganizmów zasiedlających wnętrze pułapki (Król i in. 2012). Niektóre pływacze jako pokarm wykorzystują również algi, detrytus i bakterie (Adamec 2010). Istnieją też i inne współzależności o charakterze symbiotycznym pomiędzy roślinami mięsożernymi a zwierzętami. Wyniki obserwacji sposobu pozyskiwania azotu przez dzbanecznika lowii (*N. lowii*), zasiedlającego lasy Malezji, wykazały specyficzną zależność tej rośliny od ryjówki nadrzewnej (*Tupaia montana*).

Podstawowym źródłem azotu tego dzbanecznika są fekalia pozostawione przez drobne ssaki; szacuje się, że od 57% do nawet 100% pozyskiwanego azotu pochodzi z ich odchodów (Clarke i in. 2009). Ten sposób odżywiania rośliny określa się terminem koprofagii, który zarezerwowany jest głównie dla zwierząt. Ciekawy przypadek stanowi również dzbanecznik bukietnicowaty (*N. rafflesiana*), występujący w lasach Borneo, który pobiera pokarm z odchodów pozostawianych przez niewielkiego nietoperza (*Kerivoula hardwickii hardwickii*). Ssak ten traktuje dzbanki jako schronienie i gniazdo, a w zamian „dokarmia” roślinę poprzez regularne oddawanie tam kału i moczu. Sama pułapka również została dostosowana do tej symbiozy, m.in. poprzez zredukowanie ilości wydzielanej cieczy trawiennej (Grafe i in. 2011). W tym przypadku dzbanecznik wabi zwierzę nie po to, by je zabić, ale by otrzymywać stałe źródło azotu. Opisano także przykłady roślin mięsożernych, które korzystają z pokarmu roślinnego (Krasuska i in. 2012). Dzbanecznik beczułkowaty (*N. ampullaria*) trawi martwe części roślin, które wpadły do pułapki. Wykazano, że nawet do 35% pobieranego przez tę roślinę azotu może być pochodzenia roślinnego (Moran i in. 2003). Wyżej wymienione przykłady wskazują, że rośliny mięsożerne, mając „okazję” zdobywania pokarmu w sposób mniej „drapieżniczy”, dostosowują się do tego typu warunków.

Zatem wśród roślin mięsożernych wyróżniono organizmy: (1) mięsożerne *sensu stricto*, które w pełni wykształciły syndrom mięsożerności oraz (2) protomięsożerne, które korzystają z różnych mutualistycznych powiązań ekologicznych (Adlassnig i in. 2011). Typ pułapki zależy od „strategii” polowania realizowanej przez roślinę mięsożerną. Pułapki dzieli się na: aktywne i pasywne. Pasywne pułapki o charakterze dzbanka lub rozet liściowych (ang. *pitfall traps*), występują u dzbaneczników, heliamfor (*Heliamphora*), kapturonic, darlingtonii (*Darlingtonia*), cefalotusów (*Cephalotus*) i brokinii (*Brocchinia*). Pułapki adhezyjne mające charakter lepów występują u tłustoszy, rosiczek, rosolistników i triphyophyllum (*Triphyophyllum*). Aktywne pułapki zatraskowe wytwarzane są przez muchołówki i aldrowandy; ofiary, drażniąc włoski czuciowe, powodują zatrzaśnięcie pułapki. Pułapki aktywne o charakterze pęcherzyków z zamykaną klapką występują u pływaczy, w tym przypadku ofiara jest „zasysana” poprzez zmianę ciśnienia we wnętrzu pułapki. Pułapki typu koszy łownych można zaobserwować u żenlisei (Gorb i in. 2004; Hatano, Hamada 2012).

Zwabienie ofiary jest możliwe dzięki produkowaniu różnych atraktantów, takich jak: kolor, zapach czy nektar. Rośliny mięsożerne wabiają również poprzez tworzenie wzorów widocznych zwłaszcza w świetle UV (Scholz i in. 2010; Bauer i in. 2011).

W zależności od stopnia zdolności do pozyskiwania składników mineralnych przez korzenie lub liście (pułapki), rośliny mięsożerne dzieli się na trzy ekofizjologiczne grupy: (1) gatunki charakteryzujące się wysokim zapotrzebowaniem na składniki mineralne, (2) gatunki, u których występuje współzawodnictwo w pobieraniu składników mineralnych pomiędzy korzeniem a liśćmi oraz (3) gatunki, które są uzależnione od absorpcji substancji pokarmowych przez liście (Adamec 2002).

6.3. Dzbaneczniki – rośliny z zewnętrznym żołądkiem

Pośród wszystkich roślin mięsożernych wyróżnia się ok. 120 gatunków dzbaneczników (Mithöfer 2011). Dzbaneczniki występują głównie w rejonie południowo-wschodniej Azji, ale również na Madagaskarze, Seszelach, Nowej Kaledonii i Australii (Pavlovič i in. 2009). Liście pułapkowe dzbaneczników pełnią podwójną rolę. Błazka liściowa została przekształcona w pasywną pułpkę, a wydłużony i spłaszczony ogonek liściowy przejął funkcje fotosyntetyczne (Pavlovič i in. 2009; Mithöfer 2011). Aktywność fotosyntetyczna dzbanka jest zdecydowanie niższa w porównaniu z innymi fragmentami liścia, aczkolwiek może wzrastać po schwytaniu ofiary w pułpkę (He, Zain 2012). Ponadto dzbanki charakteryzuje obniżona zawartość chlorofilu, brak miękiszu palisadowego i obniżona ilość aparatów szparkowych (Mithöfer 2011). Pułapki dzbaneczników mają wyspecjalizowaną budowę. Od góry znajduje się wieczko o kształcie liścia, pokryte gruczołami wydzielającymi nektar. Wieczko ma za zadanie zabezpieczenie cieczy trawiennej przed nadmiernym rozcieńczeniem, które może powodować woda deszczowa. Kolorowy perystom stanowi brzeg dzbanka, a zarazem jest śmiertelną pułapką dla owadów (Bauer i in. 2011). Wnętrze pułapki jest podzielone na strefy: strefę ześlizgu i strefę trawienną, bogatą w gruczoły wydzielnicze. Strefę ześlizgu pokrywają epikutylarne kryształki wosku, nadając powierzchni szorstką strukturę. Utrudnia to owadom wspinanie się do góry w celu ucieczki, a wosk dodatkowo przykleja się do odnóży ofiar (Gorb i in. 2004; Scholz i in. 2010). Jedną z istotnych strategii zapobiegania ucieczce schwytanych owadów są właściwości fizykochemiczne cieczy trawiennej. Ma ona mniejsze napięcie powierzchniowe w stosunku do wody i wysoką lepkość (Gaume, Forterre 2007).

Wewnątrz pułapki wydzielana jest ciecz trawienna, za co odpowiadają gruczoły trawienne pochodzenia epidermalnego. W gruczołach wydzielniczych liczbowo przeważają mitochondria nad plastydami, co dowodzi przewagi oddychania mitochondrialnego nad fotosyntezą (Owen i in. 1999; Schulze i in. 1999). Ilość cieczy trawiennej może osiągnąć objętość nawet do 1,5 litra (Moran i in. 2010; Adlassnig

i in. 2011). Płyn trawienny stanowi specyficzne środowisko, w którym również mogą rozwijać się różne mikroorganizmy (Morohoshi i in. 2011). Niektóre z nich produkują enzymy takie jak np. lipazy umożliwiające trawienie schwytanej przez gospodarza ofiary w niskim pH (Morohoshi i in. 2011). Trawienie ofiary, jak wspomniano uprzednio, zachodzi w środowisku o obniżonym pH, które jest osiągnięte dzięki pompowaniu protonów do cieczy trawiennej. Jest to proces, który wymaga aktywności błonowych pomp protonowych (H^+ -ATPaz). Z drugiej strony, w celu regulowania kwasowości płynu, protony mogą być z niego absorbowane (Moran i in. 2010; Mithöfer 2011).

Sygnalem do rozpoczęcia trawienia jest obecność ofiary w cieczy trawiennej (Hatano, Hamada 2012). Do wnętrza pułapki są wydzielane wówczas różne białka, które mają za zadanie strawić pokarm. W cieczy trawiennej roślin mięsożernych udało się zidentyfikować takie białka, jak: proteazy cysteinowe, proteazy aspartylowe, peptydazy, rybonukleazy, amylazy, chitynazy, fosfatazy kwaśne i alkaliczne, fosfoamidazy, esterazy, lipazy, β -1,3-glukanazy oraz peroksydazy klasy III (Mithöfer 2011; Morohoshi i in. 2011; Hatano, Hamada 2012). Ostatnio opublikowane wyniki wskazują, że rośliny mięsożerne również pobierają glukozę, która jest uwalniana ze związków zawierających sacharozę, w wyniku aktywności β -1,3-glukanazy, co z kolei podkreśla zdolność do heterotrofii roślin mięsożernych (Michalko i in. 2013). Wykazano również, że podczas trawienia do cieczy trawiennej są wydzielane reaktywne formy tlenu (ROS), które sprzyjają temu procesowi (Chia i in. 2004).

Wchłanianie pozyskanych składników pokarmowych zachodzi aktywnie przez gruczoły wydzielnicze, które pełnią podwójną rolę. Jak wykazano uprzednio, azot może być pobierany w postaci jonów amonowych, ale również aminokwasów, a nawet polipeptydów o niewielkiej masie cząsteczkowej. Zdolność do absorpcji peptydów ponownie świadczy o heterotrofii roślin mięsożernych (Schulze i in. 1999). Również wykazano, że pobieranie składników pokarmowych z dzbanka może zachodzić drogą endocytozy. Rozkład związków odbywa się wtedy przynajmniej częściowo wewnątrz komórek (np. w lizosomach), co jest mniej energochłonne (Adlassnig i in. 2012). Biorąc pod uwagę dzbanek jako wyspecjalizowany organ umożliwiający strawienie ofiary i wchłanianie substancji pokarmowych, może on stanowić odpowiednik układu pokarmowego zwierząt.

6.4. Udział reaktywnych form azotu w procesie trawienia

Tlenek azotu (NO), zaliczany do reaktywnych form azotu (RNS) stanowi cząsteczkę o charakterze bimodalnym. W zależności od stężenia, pełni funkcję sygna-

łową lub cytotoksyczną, co opisuje model tzw. drzwi nitrozacyjnych. Ponadto RNS charakteryzują się krótkim okresem półtrwania w różnych układach biologicznych i łatwym przenikaniem przez błony biologiczne (Gupta i in. 2011; Krasuska, Gniazdowska 2012; Yu i in. 2014). Do RNS zalicza się: NO w formie wolnorodnikowej ($\cdot\text{NO}$), postać kationową (NO^+), anionową (NO^-) oraz nadtlenoazotyn (ONOO^-). Ostatni z wymienionych związków powstaje w wyniku reakcji NO z ROS, i jako silny utleniacz modyfikuje strukturę białek, lipidów i kwasów nukleinowych oraz stanowi znacznik stresu nitrooksydacyjnego (Vandelle, Delledonne 2011; Yu i in. 2014).

NO bierze udział w większości poznanych procesów fizjologicznych, w tym reakcjach roślin na czynniki stresowe biotyczne bądź abiotyczne (Arasimowicz, Floryszak-Wieczorek 2007; Yu i in. 2014). Szczególnie dużo ONOO^- powstaje w reakcjach roślin na mikroorganizmy o charakterze patogennym (Vandelle, Delledonne 2011). Biorąc pod uwagę fakt, że wewnątrz pułapek występują również organizmy patogenne, można przypuszczać, że w cieczy trawiennej jest produkowany ten związek. Jednakże na dzień dzisiejszy, w dostępnej literaturze nie ma informacji na ten temat.

Wykazano, że u organizmów żywych, NO może powstawać na drodze enzymatycznej bądź/i nieenzymatycznej. Cząsteczka ta jest syntetyzowana nieenzymatycznie, głównie z jonów azotynowych w kwaśnym środowisku i w obecności reduktantów, takich jak np. kwas askorbinowy (Yamasaki 2000; Yu i in. 2014). Enzymatyczna synteza NO u roślin jest stosunkowo słabo poznana. Wykazano jednak niezbicie, że NO powstaje przede wszystkim w wyniku aktywności reduktazy azotanowej, ale w warunkach hipoksji (Foresi i in. 2010). U zwierząt NO jest wytwarzany głównie enzymatycznie, w wyniku aktywności syntazy NO (NOS). W przypadku roślin wyższych, na poziomie molekularnym nie udało się wykazać obecności tego enzymu, jedynie wyniki nielicznych prac wskazują możliwość przeprowadzania NOS-podobnej reakcji w różnych tkankach. Obecność genu kodującego NOS homologiczną do ssaczyh enzymów potwierdzono tylko u zielenicy *Ostreococcus tauri* (Corpas i in. 2009; Foresi i in. 2010).

Ze względu na niskie pH i wysokie stężenie azotynów, żołądek człowieka stanowi główne miejsce nieenzymatycznego wytwarzania NO. W obecności reduktantów takich jak kwas askorbinowy czy tiocyjaniany, azotyny są przekształcane w dużej mierze do NO. Wzrastająca wiedza dotycząca metabolizmu NO pozwoliła zmienić status azotynów ze związków typowo toksycznych, na cząsteczki również o znaczeniu fizjologicznym (Rocha i in. 2009). Podstawowym źródłem azotynów są azotany pochodzące z diety (głównie zielonych części roślin) (Rocha i in. 2009). Wykazano obecność NO m.in. w: śliniankach, żołądku, wątrobie, jelicie cienkim

i grubym. Ponadto potwierdzono, że NO występuje jako cząsteczka funkcjonalna w układzie trawiennym innych zwierząt kręgowych oraz bezkręgowców (Schleiffer, Raul 1997). NO, jako neurotransmitter, reguluje przepływ krwi w śliniankach oraz samo wydzielanie śliny, działa cytotoksycznie w stosunku do mikroorganizmów patogennych. NO wpływa na relaksację mięśni gładkich przewodu pokarmowego. Uczestniczy w przemieszczaniu treści pokarmowej podczas trawienia oraz wydalenia resztek niestrawionego pokarmu. W żołądku, NO pełni też rolę ochronną przed działaniem czynników stresotwórczych, takich jak kwas solny, etanol czy kwas octowy (Schleiffer, Raul 1997). Ponadto związek ten moduluje wydzielanie kwasu żołądkowego i pepsynogenu poprzez oddziaływanie na cyklazę guanylanową i cykliczny guanidynomonofosforan (Ito i in. 2008). Obecnie prowadzone są badania nad udziałem związków nitrowanych (znaczniki NO) w reakcjach fizjologicznych i patofizjologicznych żołądka. Prawdopodobnie produkty nitracji mają charakter sygnału o charakterze lokalnym i systemicznym (Rocha i in. 2012).

W przypadku pułapek dzbaneczników, nie istnieje żadna publikacja naukowa dotycząca udziału NO w procesie trawienia. Wyniki ostatnich badań prowadzonych w Katedrze Fizjologii Roślin SGGW wykazały obecność RNS w cieczy trawiennej dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes ventrata*) podczas trawienia pokarmu (Dzierżyńska i in. 2014). Mogą one sugerować modulacyjną funkcję NO w tym procesie.

6.5. Podsumowanie

Adaptacje roślin do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego mogą być zaskakujące, czego przykładem są rośliny mięsożerne. Biorąc pod uwagę fakt, że mięsożerność wykształciła się w toku ewolucji niejednokrotnie i niezależnie na różnych kontynentach, potencjalnie każda roślina może stać się „drapieżcą”, potrzebuje tylko do tego odpowiedniego bodźca. Przystosowaniem do mięsożerności u roślin było wykształcenie specyficznej „strategii” polowania na ofiarę oraz rozwój syndromu mięsożerności. Organizmy zwierzęce służą jako pokarm tym roślinom, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że aktywność fotosyntetyczna jest u nich niższa w stosunku do „typowych” autotrofów i fakultatywna heterotrofia musi ją uzupełniać. Ciekawą adaptacją do specyficznych warunków naturalnych obserwuje się u dzbaneczników, które posiadają pułapki pasywne. Wygląd i spełniane funkcje fizjologiczne upodabniają je do zewnętrznego układu pokarmowego. Regulacja procesu trawienia ofiar przez dzbaneczniki również nasuwa skojarzenia z żołądkiem ssaków.

Literatura

- Adamec L. 2002. Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. *New Phytol.*, 155: 89-100.
- Adamec L. 2010. Enzyme production in the traps of aquatic *Utricularia* species. *Biologia*, 65: 273-278.
- Adlassing W., Peroutka M., Lambers H., Lichtscheidl I.K. 2005. The roots of carnivorous plants. *Plant Soil*, 2: 201-203.
- Adlassing W., Koller-Peroutka M., Bauer S., Koshkin E., Lendl T., Lichtscheidl I.K. 2012. Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *Plant J.*, 71: 303-313.
- Adlassing W., Peroutka M., Lendl T. 2011. Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Ann. Bot.*, 107: 181-194.
- Adlassing W., Steinhauser G., Peroutka M., Musilek A., Sterba J.H., Lichtscheidl I.K., Bichler M. 2009. Expanding the menu for carnivorous plants: uptake of potassium, iron and manganese by carnivorous pitcher plants. *Appl. Radiat. Isot.*, 67: 2117-2122.
- Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.*, 172: 876-887.
- Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P. W. 2010. Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci.*, 15: 402-408.
- Bauer U., Grafe T.U., Federle W. 2011. Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *J. Exp. Bot.*, 62: 3683-3692.
- Bennett F.B., Ellison A.M. 2009. Nectar, not colour, may lure insects to their death. *Biol. Lett.*, 5: 469-472.
- Chia T.F., Aung H.H., Osipov A.N., Goh N.K., Chia L. S. 2004. Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Rep.*, 9: 225-261.
- Clarke C.M., Bauer U., Lee C.C., Tuen A.A., Rembold K., Moran J.A. 2009. Tree shrew lavatories: a novel nitrogen sequestration strategy in a tropical pitcher plant. *Biol. Lett.*, 5: 632-635.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B. 2009. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.*, 184: 9-14.
- Dzierżyńska A., Gniazdowska A., Urbański D., Krasuska U. 2014. Modification of RNS content in pitcher plant (*Nepenthes ventrata*) fluid during digestion. 5th Plant NO Club International Meeting, Monachium, Niemcy, Książka abstraktów, s. 63.
- Ellison A.M., Gotelli N.J. 2001. Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 623-628.
- Ellison A.M., Gotelli N.J. 2009. Energetics and the evolution of carnivorous plants-Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *J. Exp. Bot.*, 60: 19-42.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G. 2010. Characterization of a nitric oxide from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell*, 22: 3816-3830.

- Gaume L., Forterre Y. 2007. A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *PLoS ONE*, 2: e1185.
- Givnish T.J., Burkhardt E.L., Happel R.E., Weintraub J.D. 1984. Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta* with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient poor habitats. *Am. Nat.*, 124: 479-497.
- Gorb E., Kastner V., Peressadko A., Arzt E., Gaume L., Rowe N., Gorb S. 2004. Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *J. Exp. Biol.*, 207: 2947-2963.
- Grafe T.U., Schöner C.R., Kerth G., Junaidi A., Schöner M.G. 2011. A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. *Biol. Lett.*, 7: 436-439.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., Dongen J.T. 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.*, 16: 160-168.
- Hatano N., Hamada T. 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteomics*, 75: 4844-4852.
- He J., Zain A. 2012. Photosynthesis and nitrogen metabolism of *Nepenthes alata* in response to inorganic NO_3^- and organic prey N in the greenhouse. *International Scholarly Research Network*, 263270: 8.
- Ito Y., Okuda S., Ohkawa F., Kato S., Mitsufuji S., Yoshikawa T., Takeuchi K. 2008. Dual role of nitric oxide in gastric hypersecretion in the distended stomach: inhibition of acid secretion and stimulation of pepsinogen secretion. *Life Sci.*, 83: 886-892.
- Krasuska U., Glinka A., Gniazdowska A. 2012. Menu roślin mięsożernych. *Kosmos*, 61: 635-646.
- Krasuska U., Gniazdowska A. 2012. Nitric oxide and hydrogen cyanide as regulating factors of enzymatic antioxidant system in germination apple embryos. *Acta Physiol. Plant.*, 34: 683-692.
- Król E., Płachno B.J., Adamec L., Stolarz M., Dziubińska M., Trębacz K. 2012. Quite a few reasons for calling carnivores „the most wonderful plants in the world”. *Ann. Bot.*, 109: 47-64.
- Mazik M. 2012. Rośliny owadożerne Polski – rzadkie cuda natury. *Przyroda Polska*, 3: 16-17.
- Michalko J., Socha P., Mészáros P., Blehová A., Libantová J., Moravčíková J., Matušíková I. 2013. Glucan-rich diet is digested and taken up by the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.): implication for a novel role of plant β -1,3-glucanases. *Planta*, 238: 715-725.
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochem.*, 72: 1678-1682.
- Moran J.A., Clarke C.M., Hawkins B.J. 2003. From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf litter utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Int. J. Plant Sci.*, 164: 635-639.

- Moran J.A., Hawkins B.J., Gowen B.E., Robbins S.L. 2010. Ion fluxes across the pitcher walls of three Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: flux rates and gland distribution patterns reflect nitrogen sequestration strategies. *J. Exp. Bot.*, 61: 1365-1374.
- Morohoshi T., Oikawa M., Sato S., Noriko Kikuchi N., Kato N., Ikeda T. 2011. Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes* hybrid. *J. Biosci. Bioeng.*, 112: 315-320.
- Owen T.P., Lennon K.A., Santo M.J., Anderson A.N. 1999. Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Ann. Bot.*, 84: 459-466.
- Pavlovič A., Singerová L., Demko V., Hudák D. 2009. Feeding enhances photosynthetic efficiency in the carnivorous pitcher plant *Nepenthes talangensis*. *Ann. Bot.*, 104: 307-314.
- Płachno B., Jankun A. 2003. Pływacze-interesujące rośliny mięsożerne. *Wszechświat*, 104: 270-274.
- Rocha B.S., Gago B., Barbosa R.M., Laranjinha J. 2009. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *Toxicol.*, 265: 41-48.
- Rocha B.S., Gago B., Barbosa R.M., Lundberg J.O., Radi R., Laranjinha J. 2012. Intra-gastric nitration by dietary nitrite: Implications for modulation of protein and lipid signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 52: 693-698.
- Schleiffer R., Raul F. 1997. Nitric oxide and the digestive system in mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 118: 965-974.
- Scholz I., Bückins M., Dolge L., Erlinghagen T., Weth A., Hischen F., Mayer J., Hoffmann S., Riederer M., Riedel M., Baumgartner W. 2010. Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* wax crystals minimize insect attachment *via* microscopic surface roughness. *J. Exp. Biol.*, 213: 1115-1125.
- Schulze W., Frommer W.B., Ward J.M. 1999. Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J.*, 17: 637-646.
- Vandelle E., Delledonne M. 2011. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.*, 181: 534-539.
- Yamasaki H. 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355: 1477-1488.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. 2014. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol.*, 202: 1142-1156.

7 Różnorodność biologiczna i walory przyrodnicze zbiorowisk roślinnych w dolinie Słoi w Puszczy Knyszyńskiej

Grażyna Łaska

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok
e-mail: g.laska@pb.edu.pl

Streszczenie

Celem pracy jest określenie zróżnicowania fitosocjologicznego i florystycznego zbiorowisk roślinnych w dolinie Słoi oraz ocena ich walorów przyrodniczych. Badania terenowe prowadzono w latach 2011-2012, w miejscowości Lipowy Most, w Puszczy Knyszyńskiej. W badaniach zbiorowisk roślinnych wykonano 146 zdjęć fitosocjologicznych z punktowym kartowaniem techniką GPS. Waloryzację przyrodniczą wykonano na płaszczyźnie przyrodniczej, estetycznej i rekreacyjnej – metodą Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszewskiej i Wysockiego (2009).

W badaniach szaty roślinnej doliny Słoi zidentyfikowano 20 zbiorowisk roślinnych (łąki świeże, wilgotne i mokre, ziołorośla połąkowe, zbiorowiska łąkowo-pastwiskowe, zbiorowiska szuwarów turzycowych, trzcinowych i mozgowych, agrocenozy segetalne i zbiorowiska ruderalne, zarośla łożowe, zbiorowiska leśne), należących do 8 klas syntaksonomicznych. Badania wykazały obecność zbiorowiska łąkowego Piceo-Alnetum Sokoł. 1980 o znaczeniu wspólnotowym (kod 91E0) z Załącznika I Dyrektywy Rady 92/43/EWG oraz stanowiska 9. chronionych gatunków roślin, w tym 1 pod ochroną ścisłą i 8 pod ochroną częściową (2 gatunków roślin naczyniowych i 6 gatunków mchów).

W badaniach stwierdzono, że zaprzestanie użytkowania rolniczego wielu płątów łąk i niekorzystne zmiany warunków hydrologicznych, wynikające z rozbudowy sieci kanałów i rowów melioracyjnych, w procesie sukcesji wtórnej, prowadzą do widocznych zmian w strukturze zespołów roślinnych w dolinie Słoi. Wskazuje na to, w głównej mierze, duży udział kształtujących się ziołorośli połąkowych i inicjalnych faz zarośli łożowych, a następnie leśnych zespołów łąkowych. Dokonana waloryzacja przyrodnicza szaty roślinnej w dolinie Słoi w Lipowym Moście, wskazuje jednak na najwyższą – I rangę, oceny jej walorów przyrodniczych na płaszczyźnie przyrodniczej, estetycznej i rekreacyjnej.

Słowa kluczowe: syntaksonomia zbiorowisk roślinnych, ochrona gatunkowa roślin, waloryzacja fitocenoz, synantropizacja, ruderalizacja

7.1. Wstęp

Dolina Słoi na terenie Lipowego Mostu leży w centrum Puszczy Knyszyńskiej, która należy do sieci obszarów Natura 2000 i stanowi Obszar Specjalnej Ochrony Ptaków (OSO) „Puszcza Knyszyńska” PLB200003 (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/147/WE) i Specjalny Obszar Ochrony Siedlisk (SOO) „Ostoja Knyszyńska” PLH200006 (Dyrektywa Rady 92/43/EWG). Dolina Słoi na tym terenie jest jednak w znacznym stopniu przekształcona antropogenicznie, co przejawia się w ruderalizacji i synantropizacji siedlisk oraz w silnym rozczłonkowaniu doliny rzecznej szczególnie rozwiniętą siecią rowów melioracyjnych i kanałów oraz sztucznych zbiorników wodnych. Liczne badania wykazują, że rozbudowa sieci kanałów i rowów melioracyjnych w dolinach rzecznych, jak i regulacja koryt rzek, poprzez ich poszerzanie, pogłębianie i prostowanie powoduje obniżenie stanu wody w rzekach, zmniejszenie zalewów powierzchniowych i obniżenie stanu wód gruntowych w dolinach, czego wynikiem jest znaczne przesuszenie siedlisk hydrogenicznych (Dembek 2002; Grzelak i in. 2008; Gamrat i in. 2010). Konsekwencją tego procesu są przemiany wilgotnych łąk, w procesie sukcesji wtórnej, w ziołorośla połąkowe, zarośla wierzbowe i leśne zbiorowiska łąkowe (Łaska 2008; 2009; 2012). W dolinie Słoi skupiają się one głównie po wschodniej stronie koryta rzeki, w mozaice przestrzennej z parkiem golfowym i nowoczesnym kompleksem hotelowo-rekreacyjnym, który otaczają grunty leśne. Zbiorowiska leśne w Lipowym Moście są również przekształcone antropogenicznie w wyniku gospodarki człowieka, gdzie znaczna ich część ma charakter leśnych zbiorowisk zastępczych (Łaska 2006). Na badanym terenie reprezentują one sztuczne monokultury drzew iglastych, głównie drągowiny i młodniki sosnowe, a ich skład florystyczny wskazuje, że w przeszłości były one również wypasane (Łaska i in. 2013).

Zaburzenia antropogeniczne i zmiany w sposobie użytkowania terenów dolinowych istotnie wpływają na kształtowanie się ich szaty roślinnej (Piórkowski 2002; Kryszak i in. 2004; Kryszak, Grynia 2005; Matysiak, Dembek 2006; Kryszak, Kryszak 2007; Grzelak i in. 2008). Działania antropogeniczne mają istotny wpływ na kierunek przemian zbiorowisk roślinnych w dolinach rzecznych, gdyż ich wynikiem są zmiany reżimu hydrologicznego w całej zlewni (Kozłowska 2005; Kryszak i in. 2006; Kamiński 2008). Ze względu na obecność doliny Słoi, zarówno w otoczeniu zespołu hotelowego, pola golfowego i kompleksu stawów, jak i jej występowania w centrum chronionego obszaru Ostoi Knyszyńskiej, ważnym problemem badawczym jest określenie zróżnicowania fitosocjologicznego i florystycznego zbiorowisk roślinnych analizowanego fragmentu terenu oraz ocena ich walorów przyrodniczych.

7.2. Teren i obiekt badań

Badany fragment doliny Słoi zlokalizowany jest w Lipowym Moście, w gminie Szudziałowo, miejscowości położonej na południowy wschód od drogi Białystok-Krynki, w odległości 6 km od osady i Arboretum w Kopnej Górze, na terenie Puszczy Knyszyńskiej. Otaczają go grunty leśne, wchodzące w skład Nadleśnictwa Supraśl i obrębu Sokółka (po zachodniej stronie doliny Słoi) oraz Nadleśnictwa i Obrębu Krynki (po wschodniej stronie doliny rzecznej).

Dolina Słoi tworzy poligenetyczny system obniżeń, połączony z doliną rzeki Supraśl. Rzeka Słoja wykorzystwała najniżej położone w terenie obniżenia wytopiskowe, łącząc je odcinkami w jeden ciąg dolinny, który we fragmencie zlokalizowanym od miejscowości Grodzisk do Lipowego Mostu budują głównie piaski humusowe i namuły den dolinnych, powstałe w wyniku akumulacyjnej działalności wód rzecznych (Centralne Archiwum Państwowego Instytutu Geologicznego w Warszawie, arkusz Wierzchlesie (302) w skali 1:25000). Utwory te, w bliższym położeniu od cieku rzecznego, w północno-zachodniej oraz w południowo-wschodniej części przechodzą w piaski deluwialne, a od wschodniej strony – w piaski i żwiry wytopiskowe. Północna, północno-wschodnia i zachodnia część doliny Słoi, od mostu w Lipowym Moście, aż do ujścia rzeki Dereżina przechodzi stopniowo w piaski i żwiry wodnolodowcowe równin sandrowych, a od południowego-zachodu – w piaski i żwiry tarasów kemowych. Piaski i żwiry wodnolodowcowe otaczają dolinę na większości rozpatrywanego odcinka. Są to zdenudowane formy akumulacji rzeczno-lodowcowej z okresu zlodowacenia środkowopolskiego (Starkel 1980).

Badany fragment doliny Słoi zlokalizowany jest w jej dolnym odcinku, oddalonym o ok. 4,5 km od ujścia rzeki Słoi do rzeki Supraśl. Rzeka Słoja, o długości 23 km i powierzchni zlewni 225 km², stanowi jeden z dwunastu większych cieków kompleksu puszczańskiego (Górniak 1999). Mokradła w dolnej części doliny Słoi, na terenie Lipowego Mostu, mają fluwiogeniczny charakter i wypełnione są torfami olesowymi na utworach mułowo-namułowych.

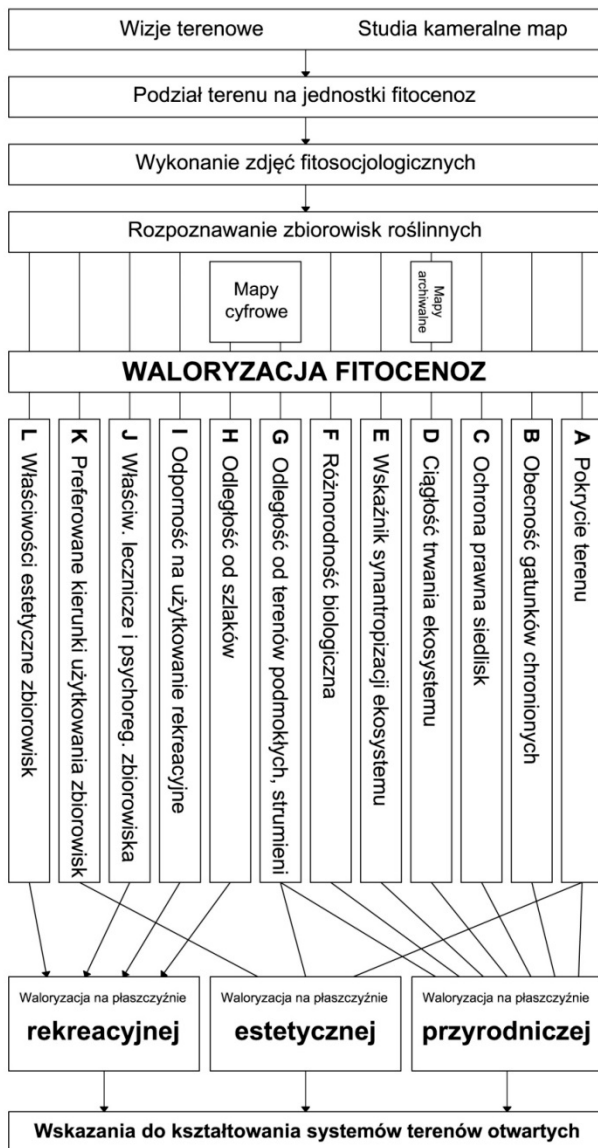
7.3. Materiały i metody

Metody badawcze analizowanych w pracy badań obejmowały kilka etapów prac, w tym szczegółową analizę materiałów źródłowych, następnie ich konfrontację i weryfikację w trakcie badań terenowych oraz przetworzenie informacji środowiskowej na informację komputerową. Wśród licznych materiałów źródłowych,

analizowano 2 arkusze mapy topograficznej: „Ostrów” (246.11) w skali 1:25000 i „Lipowy Most” (246.113) w skali 1:10000, 3 arkusze map roślinności: naturalnej, rzeczywistej i antropogenicznie zniekształconej Puszczy Knyszyńskiej w skali 1:100000 (Łaska 2006) oraz arkusze map geomorfologicznych i geologicznych: arkusz „Przeglądowej Mapy Geomorfologicznej Polski” w skali 1:500000 (Starkel 1980) oraz arkusz „Szczegółowej Mapy Geologicznej Polski” w skali 1:25000 – Wiechrzylesie (302) (Centralne Archiwum Państwowe Instytutu Geologicznego, Warszawa). Na podstawie analizy danych analogowych, dokonano rozpoznania typologii rzeźby, głównych jednostek geomorfologicznych i utworów geologicznych, oraz identyfikacji siedliskowej w konfrontacji z typami dzisiejszej potencjalnej roślinności naturalnej w terenie.

Badania terenowe prowadzono w sierpniu i wrześniu w 2011 roku oraz w maju 2012 roku, z uwzględnieniem wczesnowiosennego pojawu geofitów. Prace terenowe obejmowały badania kartograficzne i fitosocjologiczne zbiorowisk roślinnych oraz identyfikację siedliskową badanych płatów roślinnych. W badaniach zastosowano dwie metody: topograficzną oraz metodę punktów rozproszonych z wykorzystaniem zdjęć fitosocjologicznych (Faliński 1990). Na tej podstawie dokonano identyfikacji i delimitacji zbiorowisk roślinnych oraz oceny stopnia ich zachowania i walorów przyrodniczych. W badaniach wykonano 146 zdjęć fitosocjologicznych z punktowym kartowaniem (lokalizacja techniką GPS). W zbiorowiskach leśnych zdjęcia wykonywano na powierzchniach o wielkości 200 m² (10×20 m), w zbiorowiskach nieleśnych – na powierzchni 100 m² (10×10 m), 50 m² (5×10 m) i 25 m² (5×5 m), co było uzależnione od wielkości i różnorodności biologicznej badanych płatów. Wszystkie zdjęcia fitosocjologiczne zbiorowisk roślinnych opracowano w postaci analitycznych tabel zbiorowisk. Syntaksonomię jednostek roślinności naturalnej przyjęto za Matuszkiewiczem (2001) i Czerwińskim (1995), a do kodowania siedlisk przyrodniczych oraz gatunków roślin wymienionych w Załącznikach I i II Dyrektywy Siedliskowej zastosowano ujęcie Herbicha (2004).

Waloryzację przyrodniczą wykonano metodą waloryzacji fitocenoz Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszewskiej i Wysockiego (2009). Uwzględnia ona 14 kryteriów oceny walorów na płaszczyźnie przyrodniczej, estetycznej i rekreacyjnej (Tab. 7.1). Są to: pokrycie terenu roślinnością, obecność chronionych gatunków i zbiorowisk roślinnych, ciągłość trwania ekosystemu, obecność starych i okazałych drzew, wskaźnik synantropizacji (liczono za Chmielem 2006), wielkość powierzchni, odległość od bagien i terenów podmokłych oraz strumieni i rzek, odległość od szlaków, odporność na użytkowanie rekreacyjne, właściwości lecznicze i psychoregulacyjne zbiorowisk oraz preferowane ich kierunki użytkowania (Ryc. 7.1).



Rycina 7.1. Metoda waloryzacji fitocenozy Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszczyńskiej i Wysockiego (2009)

7.4. Wyniki i dyskusja

W badaniach szaty roślinnej doliny Słoi, na powierzchni 10 ha, zidentyfikowano 20 zbiorowisk roślinnych z 8 klas syntaksonomicznych, w tym obecność jednego zbiorowiska łągowego *Piceo-Alnetum* Sokoł. 1980 o znaczeniu wspólnotowym (kod 91E0) z Załącznika I Dyrektywy Rady 92/43/EWG.

Tabela 7.1. Obliczenie sumarycznej rangi walorów

| Ocena walorów na płaszczyźnie | | | Wartość średnia | | Ranga |
|---|---|---|-----------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Przyrodniczej (P) | Estetycznej (E) | Rekreacyjnej (R) | | | |
| $\frac{\text{suma walorów}}{60}$ * 100 | $\frac{\text{suma walorów}}{41}$ * 100 | $\frac{\text{suma walorów}}{20}$ * 100 | $\frac{P + E + R}{3}$ | (75-100) (50-75) (25-50) <25 | I II III IV |

Źródło: Łukaszewska, Wysocki 2009.

7.4.1. Syntaksonomia zbiorowisk roślinnych

Uwzględniając badane jednostki roślinności leśnej i nieleśnej, poszczególne syntaksony zidentyfikowano następująco (Ryc. 7.2):

Klasa: *Querc-Fagetea* Br.-Bl. et Vlieg. 1937

Rząd: *Fagetalia sylvaticae* Pawł. in Pawł., Sokoł. et Wall. 1928

Związek: *Alno-Ulmion* Br.-Bl. et R.Tx. 1943

Podzwiązek: *Alnenion glutinoso-incanae* Oberd. 1953

Zbiorowiska łągów niżowych

Zespół: *Piceo-Alnetum* Sokoł. 1980

Klasa: *Vaccinio-Piceetea* Br.-Bl. 1939

Rząd: *Cladonio-Vaccinietalia* Kielc.-Lund 1967

Związek: *Dicrano-Pinion* Libb. 1933

Podzwiązek: *Dicrano-Pinenion* Seibert in Oberd. (ed.) 1992

Grupa borów sosnowych na glebach mineralnych

Zespół: *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973

Rząd: *Vaccinio-Piceetalia* Br.-Bl. 1939

Związek: *Piceion abietis* Pawł. et all. 1928 (= *Vaccinio-Piceion* Br.-Bl. 1938)

Podzwiązek: *Vaccinio-Piceenion* Oberd. 1957

Grupa borealnych zespołów niżowych

Zespół: *Serratulo-Piceetum* Sokoł. 1968

Zespół: *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978

Klasa: *Alnetea glutinosae* Br.-Bl. et R.Tx.1943

Rząd: *Alnetalia glutinosae* R. Tx.1937

Związek: *Alnion glutinosae* (Malc. 1929) Meijer Drees 1936

Grupa zbiorowisk zaroślowych

Zespół: *Salicetum pentandro-cinereae* (Almq. 1929) Pass. 1961

Klasa: *Molinio-Arrhenatheretea* R. Tx. 1937

Rząd: *Arrhenatheretalia elatioris* Pawł. 1928

Zb. intensywnie użytkowane łąki z *Dactylis glomerata*

Zb. zdegenerowane *Poa trivialis-Festuca rubra*

Rząd: *Molinietalia caeruleae* W. Koch 1926

Związek: *Filipendulion ulmariae* Segal 1966

Zespół: *Lythro-Filipenduletum ulmariae* Hadać et all. 1997

Związek: *Calthion palustris* R. Tx. 1936 em. Oberd. 1957

Grupa eutroficznych łąk wilgotnych

Zespół: *Angelico-Cirsietum oleracei* R. Tx. 1937 em, Oberd. 1967

Grupa mokrych łąk, częściowo zabagnionych

Zb. *Deschampsia caespitosa*

Grupa zbiorowisk łąkowo-pastwiskowych

Zespół: *Junco-Cynosuretum* Sougnez 1957

Związek: *Alopecurion pratensis* Pass. 1964

Zespół: *Alopecuretum pratensis* (Regel 1925) Steffen 1931

Klasa: *Phragmitetea* R.Tx. et Prsg 1942

Rząd: *Phragmitetalia* W. Koch 1926

Związek: *Phragmition* W. Koch 1926

Grupa szuwarów typowych

Zespół: *Phragmitetum australis* (Gams 1927) Schmale 1939

Związek: *Magnocaricion* W. Koch 1926

Zbiorowiska o charakterze łąk turzycowych

Zespół: *Caricetum gracilis* (Graebn. et Hueck 1931) R.Tx. 1973

Nietorfotwórcze szuwały trawiaste terenów zalewowych

Zespół: *Phalaridetum arundinaceae* (Koch 1926 n.n.) Libb. 1931

Klasa: *Artemisietea vulgaris* Lohm., Prsg et R.Tx. in R.Tx. 1950

Podklasa: *Artemisienea vulgaris*

Rząd: *Onopordetalia acanthii* Br.-Bl. et R.Tx. 1943 em. Görs 1966

Związek: *Onopordion acanthii* Br.-Bl. 1926

Rząd: *Artemisietalia vulgaris* Lohm. in R.Tx. 1947

Związek: *Arction lappae* R.Tx. 1937 em. 1950

Klasa: *Stellarietea mediae* R. Tx., Lohm. Et Prsg 1950

Rząd: *Polygono-Chenopodietalia* (R. Tx. et Lohm. 1950) J. Tx. 1961

Związek: *Polygono-Chenopodion* Siss. 1946

Rząd: *Sisymbrietalia* J. Tx. 1961

Związek: *Sisymbrium officinalis* R. Tx., Lohm, Prsg 1950

Klasa: *Potametea* R. Tx. et Prsg

Rząd: *Potametalia* Koch 1926

Związek: *Nymphaeion* Oberd. 1953

Rycina 7.2.

Badania doliny Słoi wykazały znaczny udział zbiorowisk nieleśnych (60%) (Ryc. 7.2). W dużej mierze jest to roślinność synantropijna (21%), wtórnie ukształtowana pod wpływem działalności antropogenicznej. Są to głównie agrocenozy nieużytków (6%), zbiorowiska z roślinnością ruderalną, towarzyszące zabudowaniom (10%) i drogom (2%) z rzędu *Sisymbrietalia* i rzędu *Onopordetalia*, oraz roślinność segetalna pól uprawnych (roślin okopowych i zbóż) (3%) klasy *Stellarietea mediae*. Dolina rzeczna jest silnie rozczłonkowana rozwiniętą siecią rowów melioracyjnych (1%) i kanałów (5%) oraz sztucznych zbiorników wodnych (stawy 0,7%). Pozostała część doliny Słoi jest intensywnie użytkowana rolniczo w postaci pastwisk *Junco-Cynosuretum* (2%) lub łąk kośnych (10%), w tym z wyczyńcem łąkowym *Alopecuretum pratensis* (1%), *Angelico-Cirsietum oleracei* (1%) i *Poa trivialis-Festuca rubra* (2%). W oddaleniu od cieku rzecznego, od strony wschodniej koryta rzeki, towarzyszą im również intensywnie użytkowane łąki, koszone i nawożone z kupkówką pospolitą *Dactylis glomerata* (6%). Grunty nieużytkowane kośnie i zaniedbane, w przykorytowej części rzeki Słoi, zajmują łąki wilgotne ze śmiałkiem darniowym *Deschampsia caespitosa* (8%) i ziołorośla połąkowe *Lythro-Filipenduletum ulmariae* (3%). Tworzą one kompleks mozaikowo-przestrzenny ze zbiorowiskami szuwarów turzycowych *Caricetum gracilis* (5%) i mozgowych *Phalaridetum arundinaceae* (2%), z mniejszym udziałem szuwarów trzcinowych *Phragmitetum australis* (1%) (Ryc. 7.2).

Obszar doliny Słoi charakteryzuje też występowanie zbiorowisk leśnych (40%). Wokół doliny dominują zadrzewienia olchowe, olchowo-brzozowe i zakrzewienia wierzbowe (łozowiska) z klasy *Alnetea glutinosae* (5%) oraz zlokalizowane od strony północnej i zachodniej łągi świerkowo-olszowe *Piceo-Alnetum* (4%). Wśród sztucznie ukształtowanych drzewostanów, na całym badanym obszarze, w oddaleniu od doliny Słoi, występują zbiorowiska borowe, głównie w postaci

Legenda:

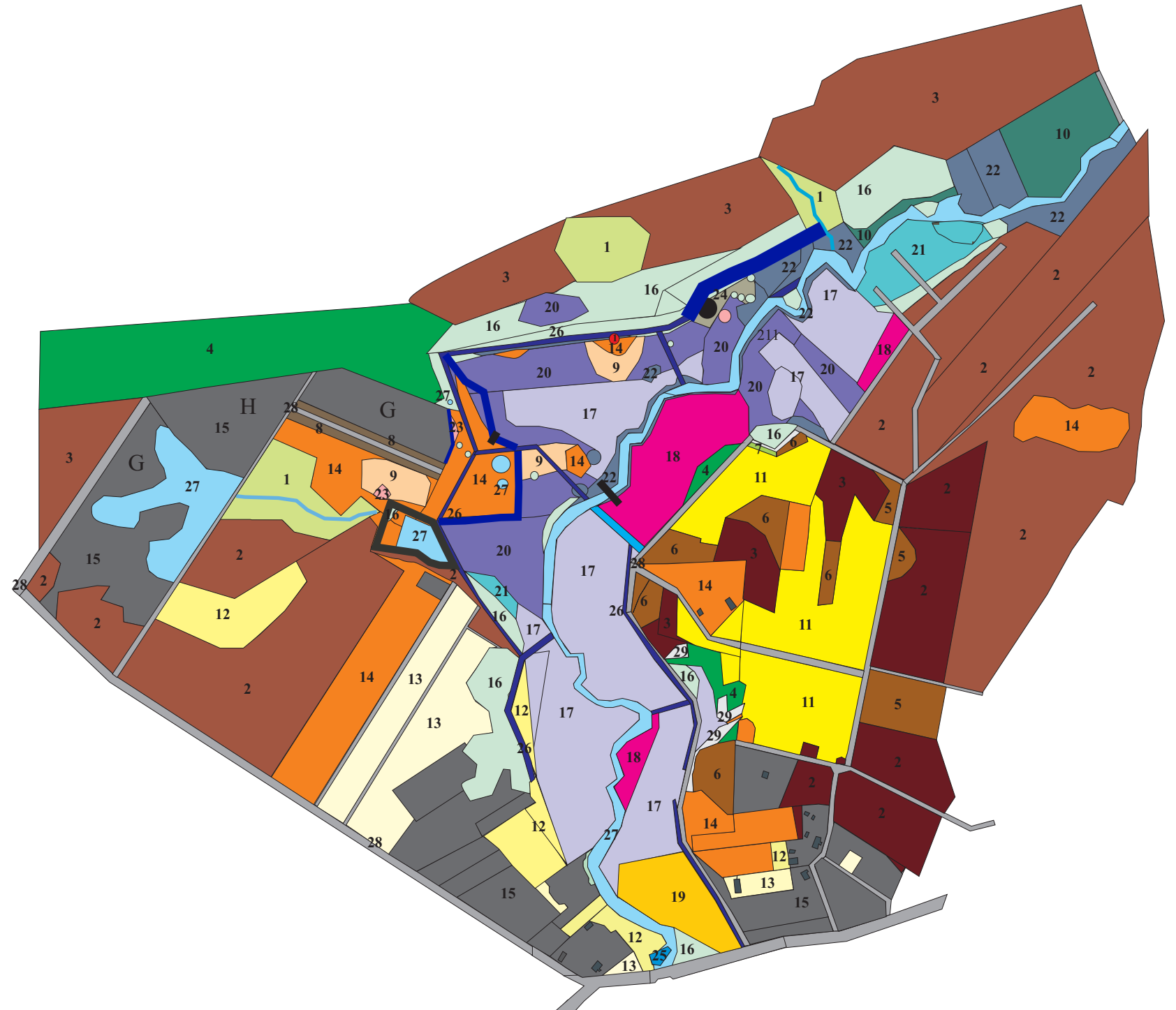
Zbiorowiska leśne związane z siedliskami przyrodniczymi wymienionymi w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG

1 I.kod 91E0-3 - Łęg świerkowo-olszowy *Piceo-Alnetum* Sokołowski 1980 - forma północno-wschodnia niżowego łęgu jesionowo-olszowego

Siedliska przyrodnicze leśne i nieleśne nie wymienione w Załączniku I Dyrektywy Rady 92/43/EWG

- 2** Zadrzewienia i sztuczne drągowiny na siedlisku boru świeżego *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973
- 3** Zadrzewienia i sztuczne drągowiny na siedlisku boru mieszanego świeżego *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978
- 4** Zadrzewienia i sztuczne drągowiny na siedlisku boru mieszanego świeżego *Serratulo-Piceetum* Sokoł. 1968
- 5** Zakrzewienia śródpolne i młodniki sosnowe na siedlisku boru świeżego *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973
- 6** Zakrzewienia śródpolne i młodniki sosnowe na siedlisku boru mieszanego świeżego *Carici digitatae-Piceetum* Czerw. 1978
- 7** Zakrzewienia śródpolne i młodniki sosnowe na siedlisku boru mieszanego świeżego *Serratulo-Piceetum* Sokoł. 1968
- 8** Zagospodarowany parkowo drzewostan sosnowo-brzozowy
- 9** Zbiorowisko łąki intensywnie uprawianej *Alopecuretum pratensis* (Regel 1925) Steffen 1931 ze związku *Alopecurion pratensis* Pass. 1964
- 10** Zbiorowisko łąki wilgotnej *Angelico-Cirsietum oleracei* R.Tx. 1937 em. Oberd. 1967 ze związku *Calthion palustris* R.Tx. 1936 em. Oberd. 1957
- 11** Intensywnie użytkowane, wypasane i nawożone łąki świeże z *Dactylis glomerata* z klasy *Molinio-Arrhenatheretea*
- 12** Agrocenozy: zbiorowiska pastwiskowe z klasy *Molinio-Arrhenatheretea*
- 13** Agrocenozy: zbiorowiska pól uprawnych (segetalne) z klasy *Stellarietea mediae*
- 14** Agrocenozy: nieużytki, ugory, zbiorowiska chwastów towarzyszące gruntom ornym z klasy *Stellarietea mediae*
- 15** Zabudowania, w tym hotel (H) i park golfowy (G) oraz zbiorowiska ruderalne z klasy *Artemisietea*
- 16** Zadrzewienia olchowe, olchowo-brzozowe, inicjalne olszyny połąkowe i zakrzewienia wierzbowe (łozowiska) z klasy *Alnetea glutinosae*
- 17** Łąki mokre - Zbiorowisko *Deschampsia caespitosa*
- 18** Nieużytkowane łąki wilgotne - ziołorośla połąkowe *Lythro-Filipenduletum ulmariae* Hadać et all. 1997
- 19** Intensywnie użytkowane łąki wilgotne - Zbiorowisko *Poa trivialis-Festuca rubra*
- 20** Zbiorowiska szuwarów turzycowych *Caricetum gracilis* (Graebn. et Hueck 1931) R.Tx. 1973 związku *Magnocaricion* Koch 1926
- 21** Zbiorowiska szuwarów trzcinowych *Phragmitetum australis* (Gams 1927) Schmale 1939 związku *Phragmition* Koch 1926 w tym facja z palką szerokolistną *Typha latifolia*
- 22** Zbiorowiska szuwarów mozgowych *Phalaridetum arundinaceae* (Koch 1926 n.n.) Libb. 1931 związku *Magnocaricion* Koch 1926
- 23** Facje z *Juncus effusi*
- 24** Facje z *Rubus idaeus*
- 25** Zbiorowiska roślin wodnych związku *Nymphaeion* klasy *Potametea*
- 26** Zbiorowiska roślin wodnych sztucznych rowów melioracyjnych
- 27** Zbiorowiska roślin wodnych cieku rzecznej Słoi oraz innych zbiorników i oczek wodnych ukształtowanych sztucznie
- 28** Drogi
- 29** Skarpy piaszczysto-żwirowe
-  Wieża obserwacyjna i drewniane kładki
-  Stanowiska gatunków roślin objętych ochroną ścisłą - Czarcikęsik Kluka *Succisella inflexa*

Rycina 7.2. Zróżnicowanie fitosocjologiczne i florystyczne szaty roślinnej w dolinie Słoi



drażogwin w wieku 40-80 lat i młodników sosnowych w wieku 10-35 lat. Dotyczy to szczególnie boru świeżego *Peucedano-Pinetum* (13,2%), którego płaty rozciągają się po wschodniej i południowo-zachodniej stronie od doliny rzecznej oraz borów mieszanych świeżych – *Carici digitatae-Piceetum* (12%), lokującego się w północnej, wschodniej i zachodniej części oraz *Serratulo-Piceetum* (5,1%) występującego na północnym zachodzie (Ryc. 7.2).

O dużej różnorodności florystycznej doliny Słoi decydują również liczne stanowiska chronionych gatunków roślin (Dz. U. 2014, poz. 1409). Stwierdzono tu stanowiska 9 chronionych gatunków roślin, w tym 1 pod ochroną ściśłą (*Succisella inflexa*) i 8 pod ochroną częściową, w tym 2 gatunki roślin naczyniowych (*Daphne mezereum*, *Helichrysum arenarium*) i 6 gatunków mchów (*Eurhynchium striatum*, *Polytrichum commune*, *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens*, *Dicranum polysetum* i *Diranum scoparium*).

7.4.2. Waloryzacja przyrodnicza, estetyczna i rekreacyjna

Dokonana waloryzacja przyrodnicza szaty roślinnej w dolinie Słoi w Lipowym Moście, wskazuje na najwyższą, I rangę, oceny jej walorów (wartość średnia 87,8) na płaszczyźnie przyrodniczej (78,3%), estetycznej (95,1%) i rekreacyjnej (90%) (Tab. 7.2).

Dolina Słoi z siedliskami mokradłowymi wyróżnia się obecnością terenów podmokłych łąk turzycowych i szuwarowych. Jest to również obszar z dużym udziałem zbiorowisk leśnych (40%), co przekłada się na wysokie wskaźniki waloryzacyjne na płaszczyźnie przyrodniczej (kryterium A). Na płaszczyźnie estetycznej, najwyżej punktowane w zakresie tego kryterium są tereny związane ze zbiorowiskami mokradłowymi, wodnymi i leśnymi (Łukaszewska, Wysocki 2009).

Uwzględniając kryterium ochrony gatunkowej (B), na obszarze badań występuje 9 chronionych gatunków roślin, w tym 1 pod ochroną ściśłą i 8 pod ochroną częściową (Dz. U. 2014, poz. 1409). Wśród zbiorowisk chronionych (Dz. U. 2001, Nr 92, poz. 1029) (kryterium C), w dolinie Słoi zidentyfikowano 2 jednostki: eutroficzne łąki wilgotne *Angelico-Cirsietum oleracei* oraz łągi świerkowo-olszowe *Piceo-Alnetum*. Stąd też, wartości wizualne i przyrodnicze rzadkich elementów krajobrazu, z okazałymi i starymi drzewami (kryterium E), które są jeszcze fragmentarycznie obecne w dolinie Słoi, jest wysokie (Tab. 7.2).

Silne przekształcenia antropogeniczne doliny Słoi wykluczają jednak ciągłość trwania ekosystemów i ich niezmiennosc pokrycia w stosunku do map archiwalnych z 1971 roku (kryterium D), które mogłyby być wskazane do objęcia ochroną jako banki nasion lub użytki ekologiczne (Łukaszewska, Wysocki 2009). Świadczy

również o tym wysoki wskaźnik synantropizacji (83,3%), z przeważającym udziałem apofitów w składzie florystycznym zbiorowisk roślinnych, charakterystycznych głównie na siedliskach półnaturalnych i antropogenicznych.

Fragment doliny Słoi badano na powierzchni 10 ha (kryterium G), w obrębie terenów podmokłych (kryterium H) i koryta rzecznej Słoi (kryterium I). Przez obszar Lipowego Mostu przebiega również jeden z trzech turystycznych szlaków konnych Puszczy Knyszyńskiej o długości 119,7 km (kryterium J).

Odporność na użytkowanie rekreacyjne, obliczone na podstawie wzoru Łukaszewskiej i Wysockiego (2009), osiąga średnią wartość 62,4 osób/ha/dzień. Zależy ona od obciążenia granicznego runa, to jest średniej liczby osób, poruszających się jednorazowo przez 8 godzin, po powierzchni 1 ha jednorodnego płatu roślinnego. Powoduje to uruchomienie procesów degradacyjnych siedlisk oraz zmianę składu i struktury zbiorowisk roślinnych. Średnia wartość tego kryterium wynika z faktu obecności na tym terenie pola golfowego i kompleksu hotelowo-rekreacyjnego, popularnego wśród społeczności regionalnej, krajowej i międzynarodowej. Jest to również obszar o bardzo dobrych właściwościach leczniczych i psychoregulacyjnych, ze względu na możliwość czynnego wypoczynku i rekreacji w otoczeniu wielu stawów. Stąd też preferowane kierunki użytkowania zbiorowisk na płaszczyźnie estetycznej i rekreacyjnej oceniono wysoko (Tab. 7.2).

Tabela 7.2. Waloryzacja doliny Słoi metodą Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszewskiej i Wysockiego (2009)

| Kryterium | Punktacja na płaszczyźnie | | |
|---|---------------------------|-------------|--------------|
| | przyrodniczej | estetycznej | rekreacyjnej |
| A – POKRYCIE TERENU | | | |
| Tereny podmokłe, starorzeczka | 5 | 5 | – |
| Lasy (duży udział warstwy drzew) | 5 | 5 | – |
| Monokultury sosny | 4 | 4 | – |
| Łąki, murawy z warstwą drzew | 3 | 3 | – |
| Łąki, murawy bez udziału warstwy drzew | 2 | 2 | – |
| Koszona trawa, pastwiska | 1 | 2 | – |
| B. OBECNOŚĆ GATUNKÓW CHRONIONYCH | | | |
| >5 i 5 | 5 | – | – |
| C. OBECNOŚĆ ZBIOROWISK CHRONIONYCH | | | |
| Obecne | 5 | – | – |

| Kryterium | Punktacja na płaszczyźnie | | |
|---|---------------------------|-------------|--------------|
| | przyrodniczej | estetycznej | rekreacyjnej |
| D. CIĄGŁOŚĆ TRWANIA EKOSYSTEMU | | | |
| To samo pokrycie terenu na mapie w roku 1971 | 0 | - | - |
| E. OBECNOŚĆ STARYCH, OKAZAŁYCH DRZEW | | | |
| > 5 i 5 | 5 | 5 | - |
| F. WSKAŹNIK SYNANTROPIZACJI EKOSYSTEMU S_w | | | |
| 81-100 | 1 | - | - |
| G. POWIERZCHNIA JEDNOSTKI | | | |
| <12,13 ha | 1 | - | - |
| H. ODLEGŁOŚĆ OD BAGNA, TERENÓW PODMOKŁYCH | | | |
| < 10,67 m | 5 | 4 | - |
| I. ODLEGŁOŚĆ OD STRUMIENI RZEK | | | |
| < 30,48 m | 5 | 4 | - |
| J. ODLEGŁOŚĆ OD SZLAKÓW | | | |
| < 30,48 m | - | - | 5 |
| K. ODPORNOŚĆ NA UŻYTKOWANIE REKREACYJNE [osób/ha/tydzień] | | | |
| 113 – 140 | - | - | 3 |
| L. WŁAŚCIWOŚCI LECZNICZE I PSYCHOREGULACYJNE ZBIOROWISKA | | | |
| Bardzo dobre | - | - | 5 |
| Ł. PREFEROWANE KIERUNKI UŻYTKOWANIA ZBIOROWISKA | | | |
| Bardzo duże możliwości | - | - | 5 |
| M. PREFEROWANE KIERUNKI UŻYTKOWANIA ZBIOROWISKA | | | |
| Bardzo dobre | - | 5 | - |
| Łącznie SUMA WSKAŹNIKÓW | | | |
| | 47 | 39 | 18 |

W waloryzacji przyrodniczej autorzy wykorzystują różne elementy środowiska przyrodniczego, badania gleb (Czępińska-Kamińska 2002), fauny (Klimaszewski 2007), czy też krajobrazu (Żarska 2005, Rembiałkowska, Lesiński 2007). Dokonana waloryzacja szaty roślinnej doliny Słoi jest istotnym czynnikiem w precyzowaniu zasad jej ochrony i racjonalnym wykorzystaniu istniejących zasobów, zgodnie z ich predyspozycjami do pełnienia określonych funkcji przyrodniczych, estetycznych

i rekreacyjnych w zmieniającym się antropogenicznie krajobrazie (Mahon, Miller 2003; Brunetta, Voghera 2008; Ferrari i in. 2008).

Literatura

- Brunetta G., Voghera A. 2008. Evaluating Landscape for Shared Values: Tools, Principles, and Methods. *Landscape Res.*, 33: 71-87.
- Czerwiński A. 1995. Geobotanika w ochronie środowiska lasów Podlasia i Mazur. Wydaw. Politechniki Białostockiej, Białystok.
- Czępińska-Kamińska D. 2002. Rozpoznawanie i ocena wartości zasobów przyrodniczych na podstawie gleb. [W:] Szyszko J., Rylke J., Jeżewski P. (red.), Ocena i wycena zasobów przyrodniczych. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, p. 84-96.
- Dembek W. 2002. Problemy ochrony i restytucji mokradł w Polsce. *Inżynieria Ekologiczna – Ekoinżynieria dla Ekorozwoju*, 6: 65-68.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/147/WE z dnia 30 listopada 2009 roku w sprawie ochrony dzikiego ptactwa.
- Dyrektywa Rady 92/43/EWG z dnia 21 maja 1992 roku w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory (ze zmianami).
- Faliński J.B. 1990. Kartografia geobotaniczna. Cz. 2. Kartografia fitosocjologiczna. Państwowe Przedsiębiorstwo Wydawnictw Kartograficznych, Warszawa–Wrocław.
- Ferrari C., Pezzi G., Diani L., Corazza M. 2008. *Evaluating landscape quality with vegetation naturalness maps: an index and some inferences*. *Appl. Veg. Sci.*, 11: 243-250.
- Gamrat R., Kochanowska R., Niedźwiedzki E. 2010. Zróżnicowanie warunków siedliskowych i zbiorowisk roślinnych w dolinie Iny w okolicach Sowna. Część III. Zróżnicowanie zbiorowisk łąkowych na tle warunków glebowych. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 1: 157-165.
- Górniak A. 1999. Wody Parku Krajobrazowego Puszczy Knyszyńskiej. Park Krajobrazowy Puszczy Knyszyńskiej w Supraślu, Supraśl.
- Grzelak M., Janyszek M., Kaczmarek Z., Bocian T. 2008. Kształtowanie się różnorodności zbiorowisk szuwarowych z klasy *Phragmitetea* pod wpływem warunków siedliskowych. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 1: 99-108.
- Herbich J. (red.). 2004. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręczniki metodyczne. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- Kamiński J., 2008. Zróżnicowanie florystyczne i walory przyrodnicze łąk 2-kośnych na zagospodarowanym torfowisku w zależności od warunków wilgotnościowych. *Woda Środ. Obsz. Wiej.*, 2: 87-104.

- Klimaszewski K. 2007. Fauna. [W:] Obidziński A., Żelazo J. (red.), Inwentaryzacja i waloryzacja przyrodnicza. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, p. 65-95.
- Kozłowska T. 2005. Zmiany zbiorowisk łąkowych na tle różnicowania się warunków siedliskowych w charakterystycznych obszarach dolin rzecznych Polski Centralnej. IMUZ, Falenty.
- Kryszak J., Grynia M. 2005. Zbiorowiska trawiaste siedlisk nadmiernie uwilgotnionych w dolinach rzecznych. Łąkarstwo w Polsce, 8: 97-106.
- Kryszak A., Grynia M., Kryszak J., Będziński M., Grzelak M. 2004. Zmiany różnorodności florystycznej nadwarciańskich łąk zalewanych. Woda Środ. Obsz. Wiej., 1: 209-218.
- Kryszak A., Kryszak J. 2007. Użytkowanie a walory przyrodnicze zbiorowisk łąkowych. Fr. Agron., 3: 258-267.
- Kryszak A., Kryszak J., Grynia M., Czemko M. 2006. Dynamika zmian różnorodności florystycznej zbiorowisk trawiastych doliny Obry. Woda Środ. Obsz. Wiej., 1: 229-237.
- Łaska G. 2006. Tendencje dynamiczne zbiorowisk zastępczych w Puszczy Knyszyńskiej. Bogucki Wyd. Nauk., Białystok–Poznań. Zał. 3 mapy roślinności w skali 1:100 000: „Dzisiejsza potencjalna roślinność naturalna Puszczy Knyszyńskiej”, „Dzisiejsza roślinność rzeczywista Puszczy Knyszyńskiej”, „Antropogeniczne przeobrażenia i ochrona roślinności w Puszczy Knyszyńskiej”.
- Łaska G. 2008. Plant communities in wetland habitats in the Knyszyńska Forest – present state and anthropogenic transformations in the GIS approach. Pol. J. Environ. Stud., 15: 207-214.
- Łaska G. 2009. Zbiorowiska roślinne siedlisk mokradłowych w Dolinie Płoski – ocena aktualnego stanu w zależności od różnych form użytkowania. Woda Środ. Obsz. Wiej., 4: 141-162.
- Łaska G. 2012. Różnorodność i walory przyrodnicze zbiorowisk mokradłowych w dolinie Białej, w centrum Białegostoku. Inżynieria Ekologiczna, 29: 87-98.
- Łaska G., Polakowski M., Citko J. 2013. Raport oceny oddziaływania planowanego przedsięwzięcia polegającego na budowie pięciu stawów w dolinie rzeki Słoja, w obrębie Lipowy Most, w gminie Szudziałowo, woj. podlaskie. RDOŚ, Białystok.
- Łukaszewska P., Wysocki Cz. 2009. Waloryzacja fitocenoz dla potrzeb planowania przestrzennego. Zakład Geografii Krajobrazu, Wydział Biologii i Nauki o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
- Mahon J.R., Miller R. W. 2003. Identifying high-value greenspace prior to land development. J. Arboriculture, 29: 25-33.
- Matuszkiewicz W. 2001. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. PWN, Warszawa.

- Matysiak A., Dembek W. 2006. Różnorodność florystyczna zbiorowisk roślinnych na wybranych terenach porolnych Kampinowskiego Parku Narodowego. Woda Środ. Obsz. Wiej., 2: 231-254.
- Piórkowski H. 2002. Kształtowanie szaty roślinnej, warunków siedliskowych i struktury przestrzennej krajobrazu doliny dolnej Pilicy pod wpływem antropopresji. [W:] Dembek W. (red.), Aktualne problemy ochrony mokradeł: walory przyrodnicze mokradeł a ich rolnicze użytkowanie. IMUZ, Falenty, p. 12-42.
- Rembiałkowska E., Lesiński G. 2007. Krajobraz. [W:] Obidziński A., Żelazo J. (red.), Inwentaryzacja i waloryzacja przyrodnicza. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, p. 95-106.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 roku w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. 2014, poz. 1409).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 14 sierpnia 2001 roku w sprawie określenia rodzajów siedlisk przyrodniczych podlegających ochronie (Dz. U. 2001, Nr 92, poz. 1029).
- Starkel L. (red.). 1980. Przeglądowa Mapa Geomorfologiczna Polski w skali 1:500 000. Inst. Geogr. PAN, Warszawa.
- Żarska B. 2005. Ochrona krajobrazu. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.

Izabela Tałałaj

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Botaniki

ul. Konstantego Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: izagry@uwb.edu.pl

Streszczenie

Rodzina storczykowatych *Orchidaceae* jest jedną z najbardziej zagrożonych wyginięciem w skali globalnej grup systematycznych roślin. Reprezentuje ona ponad 10% wszystkich roślin kwiatowych, co stanowi znaczną część światowej bioróżnorodności. Jednym z głównych powodów zanikania populacji storczykowatych są zmiany zachodzące w zajmowanych siedliskach, ich kurczenie się, fragmentacja i różnego rodzaju zaburzenia. Wyjątkowa wrażliwość na powyższe zmiany jest spowodowana szczególnymi cechami ich biologii i ekologii, w tym funkcjonowaniem w sieci zależności z takimi komponentami danego ekosystemu jak grzyby mikorytyczne czy wyspecjalizowane grupy zapylaczy. Dlatego też, storczykowate mogą stanowić swoistego rodzaju bioindykatory i wskaźniki wczesnego ostrzegania o jakości ekosystemów. Warunkiem tej zależności jest dokładne poznanie, w jaki sposób funkcjonują populacje storczyków na danym obszarze. Zakład Botaniki Instytutu Biologii UwB od ponad 20 lat prowadzi wieloaspektowe badania populacji storczyków zlokalizowanych w warunkach Niziny Północnopodlaskiej, takich jak: obuwik pospolity *Cypripedium calceolus* L., podkolan biały *Platanthera bifolia* (L.) Rich., gnieźnik jajowaty *Neottia ovata* (L.) Bloff et Fingerh., gółka długoostrogowa *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br., buławnik czerwony *Cephalanthera rubra* (L.) Rich., kruszczyk szerokolistny *Epipactis helleborine* (L.) Crantz., kruszczyk rdzawoczerwony *E. atrorubens* (Hoffm.) Besser., kruszczyk błotny *E. palustris* (L.) Crantz., wyblin jednolistny *Malaxis monophyllos* (L.) Sw., tająża jednostronna *Goodyera repens* (L.) R. Br. Niniejsza praca stanowi przegląd dynamiki liczebności populacji storczykowatych i wybranych czynników, które je kształtują oraz biologii rozrodu i rozsiewania nasion, opracowanych na podstawie badań demograficznych, eksperymentalnych i genetycznych.

Słowa kluczowe: dyspersja nasion, klonalność, systemy rozrodu, uśpienie

8.1. Wstęp

Zmiany środowiska naturalnego wynikające z intensywnej działalności człowieka spowodowały wycofywanie się i redukcję liczebności stanowisk licznych gatunków roślin (Turner 1966). Wiele z nich reprezentowanych jest obecnie przez małe i izolowane populacje, choć w przeszłości charakteryzował je zasięg ciągły oraz duża liczebność populacji (Deprés i in. 2002; Wróblewska 2008). Obecnie bezspornym jest fakt, że aby podjąć efektywne działania ochronne należy uwzględnić trzy poziomy organizacji biologicznej – genetyczne, gatunkowe i ekosystemowe, składające się na różnorodność biologiczną (Frankel i in. 1995). Zachowanie tak rozumianej bioróżnorodności jest jednym z głównych problemów współczesnej biologii i znajduje się w centrum zainteresowania badaczy reprezentujących różne dyscypliny naukowe.

Jedną z najbardziej zagrożonych w skali globalnej grup systematycznych roślin jest rodzina storczykowatych, Orchidaceae. Reprezentuje ona ponad 10% wszystkich roślin kwiatowych, co stanowi znaczną część światowej bioróżnorodności (Ackerman 1998). Całkowita ekstynkcja wielu przedstawicieli storczykowatych (epifitycznych i naziemnych), jak i szybko następująca zmiana ich statusu ochronnego, od powszechnych do zagrożonych wymarciem, jest procesem obserwowanym od bardzo dawna na wszystkich kontynentach (Turner 1966; Brundrett 2007). Jednym z głównych powodów zanikania populacji storczykowatych jest kurczenie się siedlisk, w których mogą bytować (Wołkowycki 2008). Osuszanie łąk i torfowisk, intensywna gospodarka, nawożenie czy wycinanie lasów (Turner 1966; Michalik 1975; 1979) wpływają nie tylko na bezpośrednie zniszczenie populacji, ale również inicjują fragmentację siedlisk, której negatywne skutki na funkcjonowanie populacji różnych gatunków storczyków od dawna są dokumentowane (Kull, Hutchings 2006; Jacquemyn i in. 2007b). Z punktu widzenia szeroko rozumianej biologii i ekologii, populacje, które na skutek fragmentacji stają się małymi i izolowanymi, są przede wszystkim bardzo silnie limitowane dostępnością zapylaczy. Konsekwencją tego jest obniżony sukces reprodukcyjny wyrażony poziomem owocowania oraz ilością dostępnych w populacji nasion (Murren 2000), co z kolei redukuje poziom rekrutacji nowych osobników i obniża liczebność populacji (Ashman i in. 2004). Ponieważ ewolucja tak bogatej w gatunki rodziny, jaką są Orchidaceae (ok. 19 500 gatunków według Peakall 2007) jest warunkowana przede wszystkim adaptacją do zapylania przez określone grupy zapylaczy (Kiester i in. 1984) oraz mikoryzą z odpowiednimi grzybami (Shefferson i in. 2005), to wszelkie zaburzenia środowiska ograniczające występowanie obydwu grup organizmów, niezbędnych do zrealizo-

wania pełnego cyklu życiowego storczykowatych, są szczególnie istotne w tej grupie roślin.

Funkcjonowanie w „sieci zależności” sprawia, że storczykowate mogą stanowić swoistego rodzaju bioindykatory i wskaźniki wczesnego ostrzegania o jakości ekosystemów. Warunkiem tej zależności jest dokładne poznanie, w jaki sposób funkcjonują populacje storczyków na danym obszarze. Mimo, że zanikanie storczykowatych dotyczy różnych skal geograficznych, to najsilniej zaznacza się ono na poziomach regionalnym i lokalnym. Wśród roślin umieszczonych na europejskiej czerwonej liście roślin naczyniowych znajduje się obecnie 19 przedstawicieli storczykowatych (Bilz i in. 2011), podczas gdy w Polsce 25 gatunków stanowiących nieco ponad połowę rodzimej flory Orchidaceae (Kaźmierczkowa i in. 2014). Z kolei w granicach województwa podlaskiego 16 gatunków obejmujących 44% flory storczykowatych występujących w regionie (Wołkowycki 2008) uznano za narażone w różnym stopniu na wyginiecie. Zakład Botaniki Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku od ponad 20 lat prowadzi wieloaspektowe badania populacji storczyków zlokalizowanych w warunkach Niziny Północnopodlaskiej. Dzięki nim ogólna wiedza z zakresu biologii, ekologii i genetyki storczyków naziemnych została w znaczący sposób uzupełniona o nowe fakty, a poznanie „tajników” funkcjonowania populacji w regionie pozwoliło na podjęcie działań ochrony czynnej w skali lokalnej w ramach projektu realizowanego w Biebrzańskim Parku Narodowym pt. **„Ochrona zagrożonych gatunków roślin na mineralnych wyspach w Biebrzańskim Parku Narodowym”**.

8.2. Liczebność populacji i problemy z wyodrębnieniem osobnika

Analizując zmiany liczebności danej populacji w czasie i przestrzeni istotne jest określenie czy mamy do czynienia z gatunkiem klonalnym i z jaką intensywnością rozmnażanie wegetatywne realizowane jest w poszczególnych populacjach. Przykładowo, badania demograficzne i analiza genetyczna 11 populacji tajeży jednostronnej *Goodyera repens* (L.) R.Br. (zlokalizowanych w Puszczech: Białowieńskiej, Knyszyńskiej, Augustowskiej i Rominckiej oraz w dolinie Biebrzy), powszechnie uznawanej za gatunek o intensywnym rozmnażaniu wegetatywnym, istotnie kształtującym ekologiczną i genetyczną strukturę populacji tego storczyka, niespodziewanie wykazały istotniejszą rolę rozmnażania generatywnego w trwaniu populacji tajeży (Brzosko i in. 2013). Z kolei badania demograficzne oraz analiza gene-

tyczna populacji intensywnie rozrastającego się przez kłącza kruszczyka błotnego *Epipactis palustris* (L.) Crantz. (prowadzone w 5 populacjach w dolinie Biebrzy i na Pojezierzu Suwalskim) udowodniły, że w zależności od siedliska zajmowanego przez ten gatunek, wyraźnie wyodrębniające się w przestrzeni skupiska pędów mogą być tworzone przez ten sam genety lub kilka genety wzajemnie przerastających się długimi międzywęzłami kłączy (Tałałaj 2009). Bardzo ważną rolę rozmnażania wegetatywnego w funkcjonowaniu populacji wykazano również w biebrzańskich populacjach buławnika czerwonego *Cephalanthera rubra* (L.) Rich., w których stwierdzono, że pędy leżące w odległości <20 cm należą do tego samego genety (Brzosko, Wróblewska 2003a). Jedne z najbardziej spektakularnych wyników ukazały badania nad klonalną różnorodnością obuwika pospolitego *Cypripedium calceolus* L. prowadzone na grądzikach Zabudnik, Pogorzały i Oparzelisko w dolinie Biebrzy (Brzosko i in. 2002). Pędy obuwika grupują się w wyraźnie wyodrębniające się w przestrzeni skupienia. Badania genetyczne prowadzone w trzech populacjach udowodniły, że średnia liczba genety tworzących skupienie była zbliżona w badanych populacjach i kształtowała się na poziomie od 2,1 w do 2,7 genety na skupienie. Jednocześnie okazało się, że niektóre skupienia mogą składać się aż z 7 genety, jak również skupienia składające się z dokładnie takiej samej liczby ramet mogą stanowić zarówno jeden genety, jak i 6 różnych genety. Również wielkość genety w skupieniu (a więc intensywność rozrastania się poszczególnych osobników) nie była stała i kształtowała się na poziomie od 2,7 do 4,9 ramety dla danego genety.

Największy genety składający się z 38 i 39 ramet zanotowano w największych skupieniach na grądziku Zabudnik. Ponieważ wzrost liczby skupień jest najczęściej efektem reprodukcji generatywnej, natomiast wzrost liczby pędów w skupieniu wynika głównie z wegetatywnego rozrastania się osobników uzasadnionym stała się analiza dynamiki populacji tego gatunku na dwóch poziomach organizacji: pędów i ich skupień. Zmiany liczebności populacji obuwika na mineralnych wyspach w dolinie Biebrzy prowadzone są od 1990 roku i okazuje się, że na obydwu poziomach organizacji mają one charakter asynchroniczny, co oznacza, że okresy spadku i zwiększania liczebności przypadają na różne lata w poszczególnych populacjach (Brzosko 2002a; 2013). Wyniki badań wskazują jednocześnie, że rola czynników pogodowych w dynamice populacji tego gatunku jest mniejsza niż się powszechnie uważa, natomiast istotnym czynnikiem kształtującym liczebność biebrzańskich populacji są zróżnicowane warunki bytowania na mineralnych wyspach. W sumie, liczebność biebrzańskich populacji *C. calceolus*, zagrożonego wyginięciem w skali całego zasięgu swego występowania, jest jedną z najwyższych w Europie. W latach najwyższej liczebności na grądziku Zabudnik populacja obuwika obejmowała

ponad 200 skupień i blisko 1400 ramet. Liczebność dwóch pozostałych populacji jest średnio o połowę niższa (Brzosko 2002a; 2013).

W przypadku kilku innych analizowanych gatunków storczyków wzrost klonalny miał niewielkie znaczenie w kształtowaniu dynamiki liczebności ich populacji. Sześciolletnie badania dwóch dużych populacji podkolana białego *Platanthera bifolia* (L.) Rich. w dolinie Biebrzy (maksymalna liczebność populacji wynosiła 292 i 458 osobników) ukazały fluktuacje pomiędzy rokiem o najwyższej i najniższej liczebności populacji na poziomie 23%-30% (Brzosko 2003). Z kolei siedmioletnie badania dwóch biebrzańskich populacji listery jajowatej – obecnie gnieźnika jajowatego *Neottia ovata* (L.) Bloff et Fingerh. ukazały mniejsze fluktuacje liczebności populacji dochodzące do 18% w populacji liczącej maksymalnie 98 osobników, natomiast najwyższą różnicę 47% zanotowano w większej populacji liczącej maksymalnie 225 osobników (Brzosko 2002b). Spośród analizowanych storczyków, najbardziej drastycznymi wahaniami liczebności populacji charakteryzuje się wyblin jednolistny *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. Pięcioletnie badania populacji z Doliny Rospudy, Pojezierza Suwalskiego i Sejneńskiego ukazały, że gatunek ten tworzy zwykle populacje małe, nie przekraczające 100 osobników. Normą jest, że fluktuacje ich liczebności pomiędzy poszczególnymi latami wynoszą zwykle 100%, a nawet zanotowano zmianę liczebności na poziomie 300% (Jermakowicz, Brzosko, wysłane do druku).

8.3. Fenomen uśpienia

W rodzinie storczykowatych ważnym powodem fluktuacyjnych zmian liczebności populacji czy wyróżnionych jednostek demograficznych obserwowanych nad powierzchnią ziemi jest zjawisko odpoczynku (ang. *dormancy*), podczas którego rośliny nie wytwarzają organów nadziemnych. W dolinie Biebrzy uśpienie obuwika pospolitego w niektórych latach dotyczyło nawet 75% populacji. W ciągu 15 lat badań populacji tego gatunku, ponad 50% osobników odpoczywało przynajmniej raz i najczęściej odpoczynek trwał jeden rok, choć odnotowano również przypadki roślin nieobecnych nad powierzchnią gleby przez 5 kolejnych lat (Brzosko 2002a). Podobne właściwości stwierdzono również w biebrzańskich populacjach podkolana białego i gnieźnika jajowatego. Kilkuletnie badania na powierzchniach stałych ukazały, że od 34% do 43% osobników w dwóch populacjach *P. bifolia* i od 42% do 65% osobników w dwóch populacjach *N. ovata* odpoczywało przynajmniej raz i odpoczynek również najczęściej trwał jeden rok, a najdłuższy czas uśpienia dla obu ga-

tunków wynosił odpowiednio 4 lata i 5 lat (Brzosko 2002b; 2003). Uśpienie storczyków, z jednej strony pozwala przetrwać niekorzystne warunki, np. suszę, redukując w ten sposób śmiertelność w populacji, z drugiej jednak strony ogranicza rozrodczość, ponieważ część (czasami znaczna) osobników zdolnych do rozrodu nie bierze w nim udziału przez kilka lat, co obniża poziom rozrodczości i w konsekwencji znajduje odzwierciedlenie w przyszłej liczebności populacji (Tamm 1991). W jednej z biebrzańskich populacji *C. calceolus* w następstwie odpoczynku obserwowano drastyczne zmniejszanie się z roku na rok liczby skupień o 42,5%, zaś liczby pędów aż o 75%. Stanowiło to 4-krotną różnicę między maksymalną i minimalną liczbą skupień oraz 7-krotną między maksymalną i minimalną liczbą pędów. Interesującym jest również fakt, że uśpienie dotyczyło najczęściej małych skupień, a do odpoczynku przystępowały z podobną częstotliwością zarówno osobniki kwitnące, jak i niekwitnące (Brzosko 2002a). Zupełnie inny wzorzec wpływu uśpienia na dynamikę populacji ukazują populacje podkolana białego i gnieźnika jajowatego. W badanych populacjach liczebność była pomniejszona o maksymalnie 22,4% i 16,3% uśpionych osobników *P. bifolia* oraz maksymalnie 16,8% i 33,9% uśpionych osobników *N. ovata*. U obu gatunków do odpoczynku istotnie częściej przystępowały osobniki niekwitnące niż kwitnące (Brzosko 2002b; 2003). Wspólną cechą większości badanych populacji *C. calceolus*, *P. bifolia* i *N. ovata* okazała się natomiast zmniejszona frekwencja kwitnienia po zrealizowanym odpoczynku.

8.4. U źródeł sukcesu reprodukcyjnego

Ewolucja storczykowatych jest istotnie determinowana dostępnością zapyłaczy, które są czynnikiem silnie limitującym system rozrodu tej grupy roślin (Tremblay i in. 2005). System rozrodu (ang. *breeding system*) definiowany jako anatomiczne, morfologiczne i fizjologiczne aspekty reprodukcji generatywnej osobnika i populacji (Neal, Anderson 2005), jest jednym z istotniejszych aspektów biologii gatunku i jednocześnie jednym z najważniejszych czynników kształtujących strukturę i dynamikę populacji, wewnątrzpopulacyjną zmienność genetyczną, genetyczne zróżnicowanie pomiędzy populacjami danego gatunku, jak również ewolucję genomów (Hamrick, Godt 1989; Charlesworth 2006). Potwierdzają to również badania dotyczące genetyki populacji storczyków naziemnych (Brzosko i in. 2002; Brzosko, Wróblewska 2003a, b; Brzosko i in. 2004; Brzosko i in. 2009; Tałałaj 2009; Brzosko, Wróblewska 2012; 2013; Brzosko i in. 2013). Mimo konsekwencji, jakie niosą ze sobą poszczególne typy zapłodnienia (zapłodnienie krzyżowe lub samoza-

plodnienie), najnowsze badania dowodzą, że w wielu grupach roślin, w tym u storczykowatych, bardzo często nowe pokolenia powstają na drodze mieszanego systemu rozrodu, łączącego obydwie typy zapłodnienia (Goodwillie i in. 2005). Badania prowadzone na storczykach w warunkach Niziny Północnopodlaskiej wpisują się w aktualny trend intensywnych dociekań badaczy nad zrozumieniem powodów, dla których rośliny wykorzystują mieszany system rozrodu.

Populacje storczyków zlokalizowane w dolinie Biebrzy, na Pojezierzu Suwalskim i w dolinie Rospudy, takie jak kruszczyk szerokolistny *Epipactis helleborine* (L.) Crantz., kruszczyk rdzawoczerwony *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser., kruszczyk błotny, gółka długoostrogowa *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br., buławnik czerwony, podkolan biały i gnieźnik jajowaty charakteryzują się bardzo wysokim poziomem samozgodności (do 100% owoców zawiązanych na skutek indukowanego samozapylenia), który stanowi pierwszy, podstawowy czynnik umożliwiający samozapłodnienie (Tałałaj, Brzosko 2008; Tałałaj, Skierczyński 2015; Tałałaj i in. wysłane do druku). Spośród nich stwierdzono po raz pierwszy, że tylko kruszczyk błotny i gółka długoostrogowa mają możliwość zrealizowania samozapłodnienia na drodze autogamii spontanicznej, w momencie gdy kwiaty nie zostaną zapyłone przez zapylacze. W przypadku *Epipactis palustris* proces ten jest możliwy dzięki właściwemu temu gatunkowi wysunięciu pyłkowni przed znamię na skutek spłaszczenia kieszeni (tzw. klinandrium) skrywającej pyłkowniny oraz zasychaniu bariery mechanicznej pomiędzy żeńskimi a męskimi elementami prętosłupa, jaką stanowi rostellum. Jednocześnie intensywność autogamii u tego gatunku jest istotnie zróżnicowana zarówno pomiędzy populacjami zlokalizowanymi w dolinie Biebrzy i na Pojezierzu Suwalskim, jak i w różnych latach w obrębie tej samej populacji. Spośród kwiatów eksperymentalnie poddanych spontanicznemu samozapłodnieniu, średnio od 0,5 do 82% zawiązało owoce, a zróżnicowana intensywność tego procesu jest prawdopodobnie warunkowana określonymi czynnikami abiotycznymi, zwłaszcza stopniem wilgotności powietrza (Tałałaj, Brzosko 2008). Z kolei w kwiatach *Gymnadenia conopsea* autogamia spontaniczna jest poprzedzona szerokim otwarciem kieszeni, w których znajdują się pyłkowniny przyczepione do trzoneczków. Następnie dochodzi do zaginania się trzoneczków i wysunięcia pyłkowni z kieszeni, zaś pyłkowniny rozdzielają się na pojedyncze pakiety złożone z posklejanych ziaren pyłku, które opadają na boczne łatki znamienia. Spontaniczna autogamia może występować u gółki w kwiatkach będących w różnych fazach kwitnienia (za wyjątkiem fazy początkowej) oraz w różnych położeniach kwiatostanu. Ponieważ, podobnie jak u kruszczyka błotnego jest to proces zależny od warunków siedliskowych, w badanych populacjach w dolinie Biebrzy i Rospudy ma ona niewiel-

kie znaczenie w procesie rozrodu, gdyż maksymalny udział owoców zawiązanych spontanicznie osiąga maksymalnie 3,3% (Tałałaj, Skierczyński 2015).

Oprócz autogamii spontanicznej, w przypadku większości badanych gatunków storczykowatych, bardzo ważną rolę w systemie rozrodu spełnia geitonogamia, czyli samozapylenie w obrębie tego samego kwiatostanu. Wyjątkiem jest buławnik czerwony, który stosuje strategię mimikry Batesowskiej i upodabnia się do kwiatów dzwonek, sam nie produkując nektaru (Nilsson 1983). W badanych populacjach w dolinie Biebrzy sukces reprodukcyjny tego gatunku jest silnie związany z sąsiedztwem dzwonek, co się przekłada bezpośrednio na obecność zapyłaczy z rodzaju *Chelostoma* (nożycówka) i waha się od 0% w populacji, której nie towarzyszą dzwonki do zaledwie 6% w populacji z dzwonekami (Brzosko, Wróblewska 2003a). Natomiast udział mieszanego rozrodu w ogólnym systemie rozrodu został bezpośrednio wykazany w populacjach kruszczyków: szerokolistnego, rdzawoczerwonego i błotnego. Kruszczyki mogą być zapylane przez różne gatunki bezkręgowców, zwłaszcza z rzędów błonkówek i muchówek, które ze względu na brak ścisłego związku z określonym typem budowy kwiatów nazywane są „generalistami” (Tałałaj 2009). Obserwacje zapyłaczy prowadzone w dolinie Biebrzy i na Pojezierzu Suwalskim dowiodły, że prawdopodobieństwo wystąpienia geitonogamii u przedstawicieli rodzaju *Epipactis* rośnie, gdy wzrasta udział odwiedzin kwiatów przez przedstawicieli błonkówek. Owady te wizytują wiele kwiatów na kwiatostanie, co zwiększa szanse przeniesienia pyłku na kwiaty tego samego osobnika. W przeciwieństwie do błonkówek, muchówki najczęściej odwiedzają pojedyncze kwiaty danego osobnika. Ponieważ błonkówki przodowały jako zapyłacze w badanych populacjach *E. atrorubens*, u storczyka tego prawdopodobieństwo wystąpienia geitonogamii okazało się najwyższe spośród trzech gatunków kruszczyków. Natomiast zbliżony udział różnych gatunków błonkówek i muchówek, które interesowały się *E. palustris*, powodował podobną frekwencję zachowań promujących zarówno geitonogamię, jak i zapłodnienie krzyżowe (Tałałaj, Brzosko 2008).

Pośrednim dowodem wskazującym na występowanie mieszanego systemu rozrodu w wielu badanych populacjach storczyków naziemnych jest również obserwowany poziom ich owocowania i różnorodności genetycznej. Przyjmuje się, że gatunki całkowicie niezdolne do zrealizowania samozapłodnienia, nie osiągają owocowania wyższego niż 25% (Tremblay i in. 2005). Wynik taki notowano w okresie 6 lat badań, w trzech populacjach *C. calceolus* w dolinie Biebrzy (Brzosko 2002a). Natomiast, długoterminowe badania dwóch populacji podkolana białego i dwóch gnieźnika jajowatego z doliny Biebrzy wykazały, że poziom owocowania najczęściej przekraczał 50% i osiągał aż 90% (Brzosko 2002b; 2003). Również sukces reprodukcyjny kruszczyków analizowany przez 5 kolejnych lat dochodził

do 90%, przy czym był on najwyższy i najbardziej stabilny w pięciu populacjach *E. palustris*, natomiast bardziej zmienny w czasie i przestrzeni w pięciu populacjach *E. atrorubens* i sześciu populacjach *E. helleborine* (Tałałaj 2009). Udział samozapłodnienia w systemie rozrodu potwierdza również poziom różnorodności genetycznej populacji *P. bifolia* (Brzosko i in. 2009) i trzech gatunków z rodzaju *Epipactis* (Tałałaj 2009).

8.5. Rozsiewanie nasion storczyków – historia napisana od początku

W zależności od zrealizowanego systemu rozrodu, w owocu typu torebka może powstać różna liczba nasion, począwszy od maksymalnie 350 nasion wykształconych na skutek autogamii spontanicznej u gółki długoostrogowej (Tałałaj, Skierczyński 2015) po 8500 nasion powstałych w wyniku autogamii indukowanej u *C. rubra* (Tałałaj i in. wysłane do druku). Nasiona storczykowatych składają się z kulistego zarodka, zwykle zbudowanego z kilkudziesięciu nieodróżnicowanych komórek oraz jednowarstwowej, bardzo cienkiej łupiny nasiennej. Pojedyncze nasiono może mieć długość od 0,05 do 6,0 mm i może ważyć zaledwie od 0,31 do 24 µg. Wielkość nasion sprawia, że są one porównywane do kurzu (ang. *dust-like*). Uważa się, że ze względu na niewielkie rozmiary oraz udział powietrza wewnątrz nasion od 60% do ponad 90%, są one z łatwością przenoszone na długie dystanse (ang. *leptocurtic dispersal*; Arditti, Ghani 2000). Grupa badaczy, którzy popierają pogląd dalekiego transportu nasion, jako głównego nośnika genów (Cozzolino i in. 2003; Alcántara i in. 2006) udowadnia, że wskazywany przez innych naukowców przepływ genów poprzez pyłek (Squirrell i in. 2001; Petit i in. 2005) jest w tej rodzinie roślin utrudniony ze względu na ograniczony areal furazowania owadów.

Badania populacji storczyków w dolinie Biebrzy wykazały zupełnie odmienny wzorzec dyspersji nasion. Wykorzystując szalki Petriego pokryte samoprzylepnymi taśmami i ustawiając je w co najmniej 4 transektach, w odległości do maksymalnie 18 m od rośliny macierzystej (w zależności od badanego gatunku i zajmowanego siedliska) stwierdzono, że u tak różnych gatunków storczyków naziemnych, jak tajeża jednostronna, podkolan biały, buławnik czerwony, gnieźnik jajowaty, obuwik pospolity czy kruszczyk szerokolistny nasiona są głównie rozsiewane bardzo blisko rośliny macierzystej. Spośród badanych gatunków najkrótszy dystans maksymalnej dyspersji do 2 m zanotowano u *G. repens*, a najdalszą dyspersję do 15,5 m wykazano u *E. helleborine* (Brzosko i in. 2013; Brzosko i in. wysłane do druku). Wynik ten

potwierdza wcześniejsze badania dotyczące źródeł zmienności genetycznej populacji i przestrzennej struktury genetycznej analizowanych gatunków (Brzosko i in. 2002; Brzosko, Wróblewska 2003a; Brzosko i in. 2004; Brzosko i in. 2009; Tałałaj 2009; Brzosko, Wróblewska 2012; 2013; Brzosko i in. 2013) oraz bezpośrednio wpisuje się w najnowsze doniesienia dokumentujące bliski transport nasion storczyków (Chung i in. 2005; Jacquemyn i in. 2007a; 2009) i wraz z nimi otwiera nową kartę informacji o tak ważnym aspekcie biologii storczyków naziemnych.

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania moim koleżankom z Zakładu Botaniki za udostępnienie danych źródłowych oraz publikacji wysłanych do druku.

Literatura

- Ackerman J.D. 1998. Evolutionary potential in *orchids*: patterns and strategies for conservation. *Selbyana*, 19: 8-14.
- Alcantara S., Semir J., Solferini V.N. 2006. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic rainforest of south-eastern Brazil. *Ann. Bot. (London)*, 98: 1207-1213.
- Arditti J., Ghani A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.*, 145: 367-421.
- Ashman T.L., Knight T.M., Steets J.A., Amarasekare P., Burd M., Campbell D.R., Dudash M.R., Johnston M.O., Mazer S.J., Mitchell R.J., Morgan M.T., Wilson W.G. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85: 2408-2421.
- Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V. 2011. European Red List of Vascular Plants. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Brundrett M.C. 2007. Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. *Aust. J. Bot.*, 55: 293-307.
- Brzosko E. 2002a. Dynamics of Island populations of *Cypripedium calceolus* in the Biebrza river valley (north-east Poland). *Bot. J. Linn. Soc.*, 139: 67-77.
- Brzosko E. 2002b. The dynamics of *Listera ovata* populations on mineral island in the Biebrza National Park. *Acta Soc. Bot. Poloniae*, 71: 243-251.
- Brzosko E. 2003. The dynamics of island populations of *Platanthera bifolia* in the Biebrza National Park (NE Poland). *Ann. Bot. Fennici*, 40: 243-253.

- Brzosko E. 2013. Dlaczego obuwik pospolity nie jest pospolity? [W:] Taylor J.R.E. (red.), Tajemnice Doliny Biebrzy. Eseje naukowe o zwierzętach i roślinach. Wyd. Trans Humana. Białystok, 164-174.
- Brzosko E., Ostrowiecka B., Bolesta M., Gromotowicz A., Gromotowicz M., Orzechowska A., Orzołek J., Wojdalska M. Seed dispersal in terrestrial orchids (wysłane do druku).
- Brzosko E., Wróblewska A. 2003a. Genetic variation and clonal diversity in island *Cephalanthera rubra* populations from the Biebrza National Park, Poland. Bot. J. Linn. Soc., 143: 99-108.
- Brzosko E., Wróblewska A. 2003b. Low allozymic variation in two island populations of *Listera ovata* (Orchidaceae) from NE Poland. Ann. Bot. Fennici., 40: 309-315.
- Brzosko E., Wróblewska A. 2012. How genetically variable are *Neottia ovata* (Orchidaceae) populations in northeast Poland? Bot. J. Linn. Soc., 170: 40-49.
- Brzosko E., Wróblewska A. 2013. Genetic diversity of nectar-rewarding *Platanthera chlorantha* and nectarless *Cephalanthera rubra*. Bot. J. Linn. Soc., 171: 751-763.
- Brzosko E., Wróblewska A., Jermakowicz E., Hermaniuk A. 2013. High level of genetic variation within clonal orchid *Goodyera repens*. Plant Syst. Evol., 299: 1537-1548.
- Brzosko E., Wróblewska A., Ratkiewicz M. 2002. Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland). Mol. Ecol., 11: 2499-2509.
- Brzosko E., Wróblewska A., Tałałaj I. 2004. Genetic variation and genotypic diversity in *Epipactis helleborine* populations from NE Poland. Plant Syst. Evol., 248: 57-69.
- Brzosko E., Wróblewska A., Tałałaj I., Adamowski W. 2009. Patterns of genetic diversity in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae) with respect to life history traits and recent range expansion. Folia Geobot., 44: 131-144.
- Charlesworth D. 2006. Evolution of plant breeding systems. Curr. Biol., 16: 726-735.
- Chung M.Y., Nason J.D., Chung M.G., 2005. Spatial genetic structure in populations of terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae). Plant Syst. Evol., 254: 209-219.
- Cozzolino S., Noce M.E., Musacchio A., Widmer A. 2003. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). Am. J. Bot., 90: 1681-1687.
- Deprés L., Loriot S., Gaudeul M. 2002. Geographic patterns of genetic variation in the European globeflowers *Trollius europeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. Mol. Ecol., 11: 2337-2347.
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J. 1995. The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Goodwillie C., Kalisz S., Eckert C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 36: 47-49.

- Hamrick J.L., Godt M.J. 1989. Allozyme diversity in plant species. [W:] Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (red.) Population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Jacquemyn H., Brys R., Vandepitte K., Honnay O., Roldán-Ruiz I., Wiegand T. 2007a. A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytol.*, 176: 448-459.
- Jacquemyn H., Vandepitte K., Brys R., Honnay O., Roldán-Ruiz I. 2007b. Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Biol. Conserv.*, 139: 203-210.
- Jacquemyn H., Wiegand T., Vandepitte K., Brys R., Roldán-Ruiz I., Honnay O. 2009. Multi-generational analysis of spatial structure in the terrestrial, food-deceptive orchid *Orchis mascula*. *J. Ecol.*, 97: 206-216.
- Jermakowicz E., Brzosko E. Highly dynamic population structure in boreal-montane orchid *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. (wysłane do druku).
- Każmierczakowa R., Zarzycki K., Mirek Z. (red.), 2014. Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.
- Kiester A.R., Lande R., Schemske D.W. 1984. Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators. *Am. Nat.*, 124: 220-243.
- Kull T., Hutchings M.J. 2006. A comparative analysis of decline in the distribution ranges of orchid species in Estonia and the United Kingdom. *Biol. Conserv.*, 129: 31-39.
- Michalik S. 1975. Storzycyki – ginąca grupa roślin. *Wiad. Bot.*, 19: 231-241.
- Michalik S. 1979. Zagadnienia ochrony zagrożonych gatunków roślin w Polsce. *Ochr. Przyr.*, 42: 11-28.
- Murren C.J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *J. Ecol.*, 90: 100-107.
- Neal P.R., Anderson G.J. 2005. Are ‘mating systems’ ‘breeding systems’ of inconsistent and confusing terminology in plant reproductive biology or is it the other way around? *Plant Syst. Evol.*, 250: 173-185.
- Nilsson L.A. 1983. Mimesis of bellflower (*Campanula*) by the red helleborine orchid *Cephalanthera rubra*. *Nature*, 305: 799-800.
- Peakall R. 2007. Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges. *Mol. Ecol.*, 16: 2834-2837.
- Petit R.J., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D., Vendramin G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.*, 14: 689-501.
- Shefferson R.P., Weiss M., Kull T., Taylor D.L. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady’s slipper orchids, genus *Cypripedium calceolus*. *Mol. Ecol.*, 14: 613-626.

- Squirrel J., Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Dickson J.H., Light M.H.S., MacConail M., Tebbitt M.C. 2001. Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 88: 1409-1418.
- Tałałaj I. 2009. Systemy rozrodu i właściwości populacji a wzorce różnorodności genetycznej *Epipactis helleborine*, *E. atrorubens*, *E. palustris*. Rozprawa doktorska. Manuskrypt. Białystok.
- Tałałaj I., Brzosko E. 2008. Selfing potential in *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and *E. atrorubens* (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 276: 21-29.
- Tałałaj I., Brzosko E., Ostrowiecka B. Mixed mating attributes and early acting inbreeding depression in the four orchid species with different pollination syndrome (wysłane do druku).
- Tałałaj I., Skierczyński M. 2015. Mechanism of spontaneous autogamy in the allogamous lepidopteran orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae). *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 57/1: 130-140.
- Tamm C.O. 1991. Behaviour of some orchid populations in a changing environment. Observations on permanent plots 1943-1990. [W:] Wells T.C.E., Willems J.H. (red.), Population ecology of terrestrial orchids. The Hague: SPB Academic Publishing, 1-13.
- Tremblay R., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.*, 84: 1-54.
- Turner I.S. 1966. The Decline of the Plants. W: Marshall A.J. (red.), The Greater Extinction. London, 134-155.
- Wołkowycki D. 2008. Ocena stopnia zagrożenia storczykowatych w województwie podlaskim. [W:] Brzosko E., Wróblewska A., Tałałaj I. (red.), Problemy badawcze i perspektywy ochrony storczykowatych w Polsce. Wyd. Uniwersytet w Białymstoku i Biebrzański Park Narodowy, Osowiec-Twierdza, 25-32.
- Wróblewska A. 2008. From the center to the margins of geographical range: molecular history of steppe plant *Iris aphylla* L. in Europe. *Plant Syst. Evol.*, 272: 49-65.

Stan zachowania i zagrożenie populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej

Grażyna Łaska, Aneta Sienkiewicz

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok
e-mail: a.sienkiewicz@pb.edu.pl

Streszczenie

Ponad 80% stanowisk zagrożonej wyginięciem populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. znajduje się w północno-wschodniej Polsce (Wójtowicz 2004). Celem pracy jest ocena obecnego stanu zachowania i zagrożenia populacji sasanki otwartej na stanowisku w okolicach wsi Berzniki, w Nadleśnictwie Pomorze, na obszarze Ostoi Augustowskiej PLH200005 oraz wskazanie kierunków i działań ochronnych dla zapewnienia jej dalszej egzystencji. Badania populacji prowadzono w sezonie wegetacyjnym 2014 roku, na powierzchni badawczej o łącznej wielkości 3447 m². Miejsce występowania populacji zlokalizowano na podstawie informacji uzyskanych od Pawlikowskiego (dane niepubl.). W badaniach struktury ekologicznej określono rozmieszczenie i strukturę przestrzenną populacji, strukturę faz rozwojowych, strukturę wielkości osobników z uwzględnieniem wysokości i pokroju.

W badaniach stwierdzono obecność 690 osobników o średnim zagęszczeniu 0,20 osob./m². Struktura przestrzenna populacji ma charakter skupiskowy (współczynnik dyspersji $d=2,75$), przy frekwencji osobników 9,98%. W populacji dominują osobniki wegetatywne (85%), przy znacznie mniejszym udziale osobników generatywnych (15%). W badanej populacji określono obecność 7242 pędów, w tym 138 pędów generatywnych, 7056 pędów wegetatywnych i 48 pędów juvenilnych. Najwięcej osobników charakteryzuje się wysokością od 14 cm do 20 cm (66,1%) i osiąga wielkość przyziemnej rozety do 10 cm (78,6%).

Populacja sasanki otwartej w Puszczy Augustowskiej osiąga największą liczebność w porównaniu z liczebnością stwierdzoną w Puszczy Knyszyńskiej (Łaska, Sienkiewicz 2010) oraz w Puszczy Piskiej (Łaska, Sienkiewicz 2014). Głównym zagrożeniem dla dalszej egzystencji badanej populacji jest znaczne zacienienie przez drzewostan oraz występowanie w runie leśnym sasanki łąkowej *Pulsatilla pratensis*. W celu jej ochrony, na badanym stanowisku zaleca się stałe monitorowanie stopnia zacienienia miejsc występowania, a w przypadku zbyt silnego wzrostu drzew i krzewów, konieczne jest prześwietlanie drzewostanu.

Słowa kluczowe: gatunek chroniony, struktura ekologiczna populacji, status gatunku, zabiegi ochronne, północno-wschodnia Polska

9.1. Wstęp

Sasanka otwarta *Pulsatilla patens* (L.) Mill. od 1958 roku w Polsce podlega ścisłej ochronie gatunkowej i wymaga ochrony czynnej (Dz.U. 2014, poz. 1409). Jest to gatunek o znaczeniu wspólnotowym (kod 1477), wymieniony w Załączniku II Dyrektywy Siedliskowej (92/43/EWG) oraz w Załączniku I Konwencji Berneńskiej, sklasyfikowany jako gatunek zagrożony (E) na „Czerwonej liście roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce” (Zarzycki, Szeląg 2006) oraz w „Czerwonej księdze roślin” (Każmierczakowa i in. 2014). Gatunek ten uznany jest za krytycznie zagrożony (CR) na Wyżynie Małopolskiej (Podgórska, Bróz 2010) i w Karpatach Polskich (Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008), jako narażony na wyginięcie (V) – klasyfikowany jest w Wielkopolsce i na Pomorzu Zachodnim (Żukowski, Jackowiak 1995), a jako wymarły w regionie (RE) na Dolnym Śląsku (Kącki 2003) i w województwie opolskim (Nowak, Spałek 2002). Wielu autorów potwierdza proces ustępowania tego taksonu ze stanowisk będących w zasięgu naturalnego występowania rośliny (Ciosek 1999; Chmura 2003; Karczevska 2009; Juśkiewicz-Swaczyna 2010). W zależności od regionu Polski, stopień zagrożenia taksonu i ryzyko jego wymarcia są różne. Zależy to w głównym stopniu od oddziaływania czynników naturalnych (biotycznych i abiotycznych), jak i antropogenicznych, które determinują występowanie zagrożonego gatunku (Łaska, Sienkiewicz 2013). Ponad 80% stanowisk zagrożonej wyginięciem populacji sasanki otwartej znajduje się w północno-wschodniej Polsce (Wójtowicz 2004). Fakt, że Puszcza Augustowska jest miejscem najliczniejszego występowania tego gatunku w Polsce (Pawlikowski, dane niepubl.) umożliwia podjęcie aktywnych działań zmierzających do opracowania skutecznych kierunków ochrony sasanki otwartej i zachowania jej dalszej egzystencji na tym terenie. Cennym narzędziem przy ocenie ryzyka zagrożenia tego taksonu oraz efektów planowanych działań ochronnych w Polsce i w Europie, są badania struktury ekologicznej populacji sasanki otwartej (Brook i in. 2000; Menges 2000). Określenie rozmieszczenia i struktury przestrzennej populacji, struktury faz rozwojowych, struktury wielkości osobników z uwzględnieniem wysokości i pokroju, umożliwi ocenę obecnego stanu zachowania populacji oraz ogólnej kondycji osobników w badanej populacji. Pozwala również określić stopień zagrożenia gatunku, co jest szczególnie ważne w przypadku małych populacji, dla których spadek liczebności może doprowadzić do całkowitego wyginięcia istniejących populacji. Celem pracy jest ocena obecnego stanu zachowania i zagrożenia populacji sasanki otwartej na stanowisku w okolicach miejscowości Berźniki, w Nadleśnictwie Pomorze oraz wskazanie kierunków i działań ochronnych dla zapewnienia dalszej egzystencji tego taksonu.

9.2. Materiały i metody badań

Badania terenowe oceny stanu zachowania populacji *P. patens* prowadzono w sezonie wegetacyjnym 2014 roku. Miejsce występowania badanej populacji zlokalizowano na podstawie informacji uzyskanych od Pawlikowskiego (dane niepubl.). Prace terenowe obejmowały badania kartograficzne występowania taksonu z wykorzystaniem kartowania punktowego i lokalizacji techniką GPS. Stanowisko badawcze o łącznej wielkości 3447 m² podzielono na mniejsze poletka podstawowe o wielkości 1 m². W celu określenia struktury przestrzennej, na każdym poletku podstawowym skartowano rozmieszczenie osobników sasanki otwartej, z uwzględnieniem ich frekwencji i zagęszczenia. Frekwencję i zagęszczenie osobników określono na podstawie ich obecności i liczebności na poletkach o wielkości 1 m². Za skupisko przyjęto osobniki zlokalizowane w odległości nie większej niż 1 m. W trakcie badań terenowych opisywano cechy charakteryzujące każdego osobnika. Na podstawie cech morfologiczno-rozwojowych, rozpoznano i odnotowano liczebność osobników w poszczególnych fazach rozwojowych (juwenilnej, wegetatywnej i generatywnej). W celu określenia struktury wielkości osobników w badanej populacji, dokonano pomiaru wysokości osobników, średnicy przyziemnej rozety oraz liczby pędów. Oceny stanu zachowania sasanki otwartej dokonano na podstawie rozmieszczenia osobników i liczebności badanej populacji. Określenie struktury przestrzennej, struktury faz rozwojowych oraz struktury wielkości osobników dało podstawy do oceny stanu zagrożenia populacji *P. patens* w Nadleśnictwie Pomorze.

9.3. Teren i obiekt badań

Badania populacji *P. patens* prowadzono w północno-wschodniej Polsce, na terenie Nadleśnictwa Pomorze w Puszczy Augustowskiej, w okolicach miejscowości Berżniki. Jest to teren należący do sieci obszarów Natura 2000 jako Specjalny Obszar Ochrony Siedlisk „Ostoja Augustowska” PLH200005 i Obszar Specjalnej Ochrony Ptaków „Puszcza Augustowska” PLB200002. Teren nadleśnictwa obejmuje kompleks leśny o powierzchni 15 864,4 ha, położony w północno-wschodniej części Puszczy Augustowskiej, z którego 6364 ha zajmują Obszary Chronionego Krajobrazu „Pojezierze Sejneńskie” oraz „Puszcza i Jeziora Augustowskie” (RDPL, Białystok).

Sasanka otwarta *Pulsatilla patens* (L.) Mill. jest byliną należącą do rodziny jaskrowatych (*Ranunculaceae*). Jest to gatunek o zasięgu cyrkumborealnym. Wystę-

puje głównie na skraju borów sosnowych z klasy *Vaccinio-Piceetea* (Matuszkiewicz 2001), na stanowiskach o wystawie południowo-zachodniej i południowej. Sasanka otwarta preferuje miejsca prześwietlone i słabo ocienione, stąd też notowana jest także na przeorywanych zrębach, przecinkach i pasach przeciwpożarowych, przy drogach, liniach przesyłowych, torach kolejowych, pasach granicznych oraz na kserotermicznych i psammofilnych murawach (Wójtowicz 2000; Łaska, Sienkiewicz 2010). Jest hemikryptofitem (Raunkiaer 1909) i rhizofitem (Łukaszewicz 1962) o wysokości 7-20 cm (w czasie owocowania do 40 cm), z pojedynczym dzwonkowatym kwiatem złożonym z 6 działek o średnicy do 6 cm i barwie od błękitnej do ciemnofioletowej.

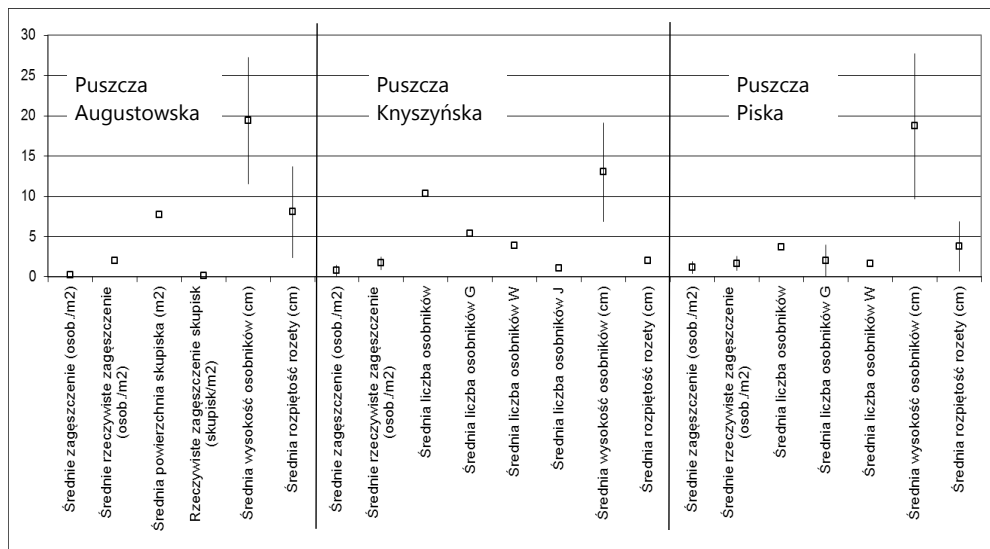
9.4. Wyniki badań i dyskusja

W badaniach struktury ekologicznej określono rozmieszczenie i strukturę przestrzenną populacji, strukturę faz rozwojowych, strukturę wielkości osobników z uwzględnieniem wysokości i pokroju.

9.4.1. Liczebność i struktura przestrzenna populacji

W populacji sasanki otwartej stwierdzono obecność 690 osobników. Badania wykazały, że struktura przestrzenna populacji ma charakter skupiskowy, co potwierdza wysoki współczynnik dyspersji $d=2,75$. Na powierzchni badawczej o łącznej wielkości 3447 m², obecność sasanki otwartej stwierdzono na 344 jednometrowych poletkach podstawowych. Częstość występowania osobników w badanej populacji wynosi 9,98%. Średnie zagęszczenie osobników w badanej populacji wynosi 0,20 osobnika na 1 m², a zagęszczenie rzeczywiste kształtuje się na poziomie 2,01 osobnika na 1 m². Wartości średniego i rzeczywistego zagęszczenia osobników sasanki otwartej w badanej populacji, w porównaniu z wartościami zagęszczenia w innych populacjach w północno-wschodniej Polsce wykazują, że liczebność populacji w Nadleśnictwie Pomorze kształtuje się na wysokim poziomie. Dla porównania: w Nadleśnictwie Supraśl w Puszczy Knyszyńskiej, w populacji sasanki otwartej liczącej 165 osobników, średnie zagęszczenie osobników wynosi od 0,01 do 2,0 osobnika na 1 m², a rzeczywiste zagęszczenie osobników osiąga od 1,0 do 3,8 osobnika na 1 m², przy obecności 6 populacji o skupiskowym typie rozmieszczenia osobników (Łaska, Sienkiewicz, dane niepubl.). W Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej, w populacji sasanki otwartej liczącej 33 osobniki, średnie zagęszczenie osobników wynosi od 0,25 do 3,0 osobnika na 1 m², a rzeczywiste zagęszcze-

nie osobników osiąga od 1,0 do 3,0 osobników na 1 m², przy obecności 3 populacji o skupiskowym typie rozmieszczenia osobników (Łaska, Sienkiewicz 2014) (Ryc. 9.1).



□ - $\bar{x} \pm L$ - średnia ± odchylenie standardowe

Rycina 9.1. Średnie wielkości struktury ekologicznej populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill., odpowiednio: w Puszczy Augustowskiej, w Puszczy Knyszyńskiej oraz w Puszczy Piskiej

W Nadleśnictwie Pomorze, w populacji sasanki otwartej, stwierdzono występowanie 35 skupisk liczących powyżej 5 osobników w skupisku, przy średniej powierzchni skupiska $7,71 \pm 8,02$ m² i rzeczywistym zagęszczeniu skupisk 0,13 skupiska na 1 m². Maksymalnie w jednym skupisku stwierdzono obecność 142 osobników, a na 1 m² określono maksymalnie 10 osobników.

Rozmieszczenie osobników w badanej populacji charakteryzuje się występowaniem skupisk. Stwierdzono, że znaczne zagęszczenie osobników w skupiskach oraz duży areał skupisk w miejscach prześwietlonych i słabo ocienionych, odpowiadających pod względem wymagań siedliskowych, zapewnia populacji większe możliwości rozwoju i sprzyja dalszej ekspansji gatunku. Skupianie się osobników, przy niesprzyjających warunkach środowiskowych, powoduje niższą ich śmiertelność niż osobników izolowanych (Howard, Goldberg 2001; Lehsten, Kleyer 2007; Loeuille, Leibold 2008; Łaska 2012). Jest to szczególnie ważne w przypadku osobników juwenilnych, które w największym stopniu narażone są na oddziaływanie niekorzystnych warunków środowiskowych.

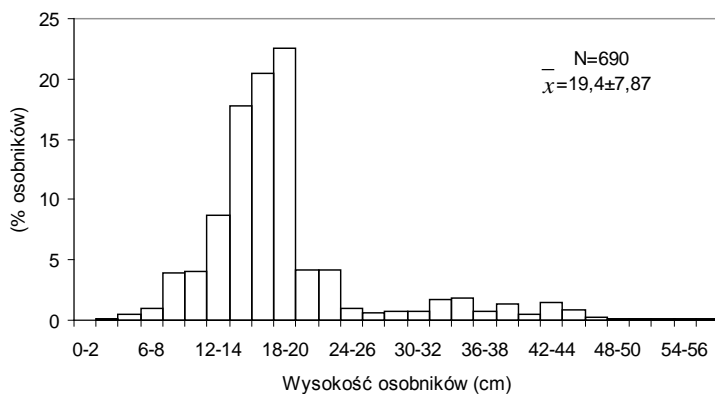
9.4.2. Struktura faz rozwojowych osobników w populacji

W populacji *P. patens* w Nadleśnictwie Pomorze, odnotowano obecność 102 osobników generatywnych i 588 osobników wegetatywnych. Nie stwierdzono obecności osobników juvenilnych. Rozkład wiekowy populacji przedstawia kształtem piramidę typu urny, nie posiadającej podstawy z powodu braku osobników juvenilnych w strukturze populacji. Przewaga dorosłych osobników niekwitnących w badanej populacji może świadczyć o wysokim udziale osobników przed kwitnieniem. Ale może również wskazywać na zredukowane tempo reprodukcji dojrzałych osobników z powodu niekorzystnych warunków środowiskowych. Dla porównania: na stanowiskach sasanki otwartej w Nadleśnictwie Supraśl w Puszczy Knyszyńskiej, stwierdzono obecność 86 osobników generatywnych, 62 osobników wegetatywnych i 17 osobników juvenilnych (Łaska, Sienkiewicz dane niepubl.), zaś na stanowiskach w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej, odnotowano występowanie 18 osobników generatywnych i 15 osobników wegetatywnych (Łaska, Sienkiewicz 2014) (Ryc. 9.1). Stwierdzono, że tendencje rozwojowe badanej populacji w Nadleśnictwie Pomorze warunkowane są rekrutacją osobników juvenilnych i obecnością korzystnych warunków środowiskowych do ich wzrostu i rozwoju, oraz podobnym udziałem w badanej populacji osobników generatywnych i wegetatywnych.

W populacji *P. patens* na stanowisku w Nadleśnictwie Pomorze stwierdzono obecność 7242 pędów, w tym 138 pędów generatywnych, 7056 pędów wegetatywnych i 48 pędów juvenilnych. Średnia liczba pędów przypadająca na jednego osobnika w badanej populacji wynosi $10,5 \pm 8,8$, przy średniej liczbie pędów generatywnych $0,2 \pm 0,7$ oraz średniej liczbie pędów wegetatywnych $10,23 \pm 8,52$ i średniej liczbie pędów juvenilnych $0,07 \pm 0,34$. W badanej populacji dominują 1 pędowe osobniki kwitnące, przy maksymalnej liczbie do 13 pędów kwiatowych.

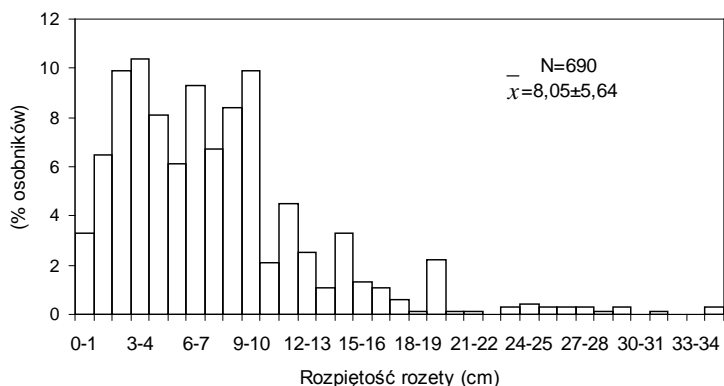
9.4.3. Struktura wielkości osobników

Analiza struktury wielkości osobników w badanej populacji sasanki otwartej wskazuje, że dominują osobniki o średniej wysokości (Ryc. 9.2). Stwierdzono, że najwięcej jest osobników o wysokości od 16 do 18 cm (20,4%) i od 18 do 20 cm (22,6%). Mniejszy udział stanowią natomiast osobniki niższe, w klasach wysokości od 2 do 12 cm (0,1-4,1%) i osobniki wyższe, w klasach wysokości od 20 do 58 cm (0,1-4,2%) (Ryc. 9.2). Najwyższy osobnik sasanki otwartej w Nadleśnictwie Pomorze osiąga wysokość 58 cm, a najniższy – 4 cm. Średnia wysokość osobników w badanej populacji wynosi $19,4 \pm 7,87$ cm (Ryc. 9.2).



Rycina 9.2. Wysokość osobników w populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej

W badaniach stwierdzono, że w populacji *P. patens* dominują osobniki o średnicy przyziemnej rozety do 10 cm (78,6%). Mniejszy udział w populacji jest natomiast osobników dużych, o średnicy przyziemnej rozety powyżej 20 cm (5,1%) (Ryc. 9.3). Na badanym stanowisku w Nadleśnictwie Pomorze, średnica przyziemnej rozety sasanki otwartej osiąga maksymalnie do 47 cm, a minimalnie do 0,5 cm. Średnia rozpiętość przyziemnej rozety osobników w badanej populacji wynosi $8,05 \pm 5,64$ cm (Ryc. 9.3).



Rycina 9.3. Średnica przyziemnej rozety osobników w populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej

Na stanowiskach sasanki otwartej w Nadleśnictwie Supraśl w Puszczy Knyszyńskiej, najwyższy osobnik osiąga wysokość 30 cm, a najniższy 2 cm. Największa stwierdzona rozpiętość przyziemnej rozety osiąga nawet 13 cm, a najmniejsza 0,5 cm (Łaska, Sienkiewicz, dane niepubl.). Na stanowiskach w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej, najwyższy osobnik osiąga wysokość 35 cm, a najniższy – 7 cm. Średnica przyziemnej rozety osiąga maksymalnie do 15 cm, a minimalnie do 0,5 cm (Łaska, Sienkiewicz 2014) (Ryc. 9.1).

9.4.4. Zagrożenia populacji *P. patens* i działania ochronne

Głównym zagrożeniem dla dalszej egzystencji populacji *P. patens* w Nadleśnictwie Pomorze jest znaczne zacienienie miejsca jej występowania przez rozrastający się drzewostan. Sasanka otwarta, jako gatunek światłolubny, preferuje stanowiska widne, prześwietlone i dobrze nasłonecznione. Zanik naturalnych czynników zaburzeń w postaci pożarów i wiatrolomów, skutkujących tworzeniem się luk w drzewostanie może stanowić przyczynę do wycofywania się tego gatunku na badanym terenie. Istotne znaczenie dla dalszej egzystencji populacji tego taksonu ma także utrzymanie odpowiedniego zwarcia warstwy krzewów, gdyż między innymi od niego zależy naturalne odnawianie się populacji. Zagrożeniem dla występowania badanej populacji jest również liczna obecność w runie leśnym sasanki łąkowej *Pulsatilla pratensis*. Ze względu na niską konkurencyjność badanego gatunku w stosunku do innych roślin runa, wzrost stopnia pokrycia przez sasankę łąkową może przyczynić się do ustąpienia populacji *P. patens*. Liczna obecność osobników *P. pratensis* w runie leśnym ogranicza kiełkowanie nasion i rekrutację siewek badanego taksonu oraz redukuje znacznie dostępność miejsc do wzrostu i rozwoju młodych osobników *P. patens*.

P. patens w Polsce jest gatunkiem rzadkim, dla którego wśród przyczyn zagrożenia podaje się stałe zmniejszanie powierzchni leśnej i nasilenie się różnych form presji antropogenicznej poprzez rolnicze, przemysłowe lub urbanistyczne wykorzystanie obszarów jej naturalnego występowania (Wójtowicz 2000, 2004; Nowak, Spałek 2002; Kącki 2003; Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008). W celu zachowania badanej populacji na stanowisku w Nadleśnictwie Pomorze, niezbędne jest stosowanie zabiegów ochrony czynnej oraz stałe monitorowanie stopnia zacienienia w miejscu jej występowania. Ochrona czynna powinna obejmować działania związane z usuwaniem zakrzewień i prześwietlaniem drzewostanu. Warunkiem zachowania tego taksonu w miejscach o znacznym pokryciu przez sasankę łąkową jest odsłanianie fragmentów gleby w celu tworzenia bezpiecznych miejsc do kiełkowania i rozwoju nowych osobników.

9.5. Podsumowanie i wnioski

O randze zagrożenia sasanki otwartej świadczy fakt, że gatunek ten jest wymieniony w „Czerwonych księgach” i na „Czerwonych listach” wielu krajów. Na terenie Czech *P. patens* jest taksonem krytycznie zagrożonym (Holub, Procházka 2000), wymieniony jest także na Czerwonej Liście oraz w Czerwonych Księgach Niemiec (zagrożony) (Röder, Kiehl 2006), Szwecji (narażony) (Gärdenfors 2000), Litwy (względnie przywrócony), Obwodu Leningradzkiego Rosji (zmniejszająca się liczebność), Łotwy (niepełne dane) (EUNIS 2005), Słowacji (Průša i in. 2005) i Okręgu Kaliningradzkiego Federacji Rosyjskiej (Noskov 2000). W Finlandii i Estonii populacje tego gatunku uznano za reliktowe (Rassi i in. 2001; Pilt, Kukk 2002). Na terenie Polski, stanowiska sasanki otwartej objęte są ochroną w 6 parkach narodowych, w 21 parkach krajobrazowych oraz w 29 rezerwach przyrody (Zych 2007). W badaniach wykazano, że populacja sasanki otwartej w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej jest najliczniejsza w porównaniu z liczebnością taksonu notowaną w innych regionach Polski. W badaniach prowadzonych na Murawach Poligonu w Orzyszu, stwierdzono obecność 49 populacji o łącznej liczbie 316 osobników (Juśkiewicz-Swaczyna 2010), w Nadleśnictwie Supraśl w Puszczy Knyszyńskiej – 16 populacji z 165 osobnikami (Łaska, Sienkiewicz 2010), a w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej – 9 populacji z 33 osobnikami (Łaska, Sienkiewicz 2014).

Na podstawie analizy cech demograficznych *P. patens* na stanowisku w Nadleśnictwie Pomorze stwierdzono, że populacja jest w dobrej kondycji. Świadczy o tym występowanie w populacji 690 osobników, rozmieszczonych skupiskowo i osiągających średnie wielkości. Należy jednak podkreślić, że tendencje rozwojowe badanej populacji warunkowane są obecnością osobników juvenilnych oraz korzystnymi warunkami środowiskowymi do ich wzrostu i rozwoju. Zagrożeniem dla występowania populacji w Nadleśnictwie Pomorze jest znaczne zacienienie przez drzewostan oraz występowanie w runie leśnym sasanki łąkowej. Dlatego też, na terenie Nadleśnictwa Pomorze w Puszczy Augustowskiej nadano jej status gatunku narażonego na wyginięcie (VU) i zalecane jest stałe monitorowanie warunków środowiskowych jego występowania.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składamy Panu Pawłowi Pawlikowskiemu za udostępnienie informacji o lokalizacji stanowiska w Nadleśnictwie Pomorze. Praca zrealizowana została ze środków MB/WBiŚ/10/2014.

Literatura

- Brook B. W., O'Grady J.J., Chapman A.P., Bergman M.A., Akcakaya H.R., Frankham R. 2000. Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature*, 404: 385-387.
- Chmura D. 2003. Zagrożenia lokalnych populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* na przykładzie stanowiska na Sodowej Górze w Jaworznie. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 59(5): 14-27.
- Ciosek M.T. 1999. Rodzaj *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*) na Podlasiu i Mazowszu. *Fragm. Flor. Geobot. Ser. Pol.*, 6: 15-19.
- European Nature Information System (EUNIS), 2005. Species factsheet for *Pulsatilla patens*. <http://eunis.eea.eu.int/speciesfactsheet.jsp?idSpecies=177045&idSpeciesLink=177045>.
- Gärdenfors U. 2000. Population Viability Analysis in the Classification of Threatened Species: Problems and Potentials. *Ecol. Bull.*, 48: 181-190.
- Holub J., Procházka F. 2000. Red List of vascular plants of the Czech Republic – 2000. *Preslia*, 72: 187-230.
- Howard T.G., Goldberg D.E. 2001. Competitive response hierarchies for germination, growth, and survival and their influence on abundance. *Ecology*, 82: 979-990.
- Juśkiewicz-Swaczyna B. 2010. Population structure of *Pulsatilla patens* in relation to the habitat quality. *Tuexenia*, 30: 457-466.
- Karczewska M. 2009. Nowe stanowisko *Pulsatilla patens* (*Ranunculaceae*) w Białowieskim Parku Narodowym. *Fragm. Flor. Geobot. Ser. Pol.*, 16(2): 438-439.
- Każmierczakowa R., Zarzycki K., Mirek Z. 2014. Polska Czerwona Księga Roślin. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.
- Kącki Z. 2003. Zagrożone gatunki flory naczyniowej Dolnego Śląska. Instytut Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Tow. Przyjaciół Przyrody „Pro Natura”, Wrocław.
- Lehsten V., Kleyer M. 2007. Turnover of plant trait hierarchies in simulated community assembly in response to fertility and disturbance. *Ecol. Quest.*, 203: 270-278.
- Loeuille N., Leibold M.A. 2008. Ecological consequences of evolution in plant defenses in a metacommunity. *Theor. Popul. Biol.*, 74: 34-45.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2010. Eastern pasqueflower *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in the Knyżyńska Forest. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 79: 46.

- Łaska G. 2012. Changes of the life strategy and adaptation of the reproductive strategy of *Carex digitata* to disturbances factors. *Ecol. Quest.*, 16: 22-47.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2013. Stan zachowania i zagrożenie populacji *Pulsatilla patens* (L.) Mill. pod wpływem zmiennych warunków środowiska przyrodniczego w Puszczy Knyszyńskiej. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*. Wyd. PTB, Białystok, 143-154.
- Łaska G., Sienkiewicz A. 2014. Stan zachowania i zagrożenie populacji sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. w Nadleśnictwie Spychowo w Puszczy Piskiej. [W:] Łaska G. (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów*. Wyd. PTB, Białystok, 143-152.
- Łukaszewicz A. 1962. Morfologiczno-rozwojowe typy bylin. PTPN, Poznań.
- Matuszkiewicz W. 2001. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. PWN, Seria *Vademecum Geobotanicum*, Warszawa.
- Menges E.S. 2000. Population viability analyses in plants: challenges and opportunities. *Trends Ecol. Evol.*, 15: 51-56.
- Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H. 2008. *Czerwona Księga Karpat Polskich. Rośliny naczyniowe*. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków.
- Noskov G.A. 2000. *Red data book of nature of Leningrad Region. Plants and Fungi*. St. Petersburg, vol. 2.
- Nowak A., Spalek K. 2002. *Czerwona Księga Roślin Województwa Opolskiego. Rośliny naczyniowe wymarłe, zagrożone i rzadkie*. Polskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, Opole.
- Pilt I., Kukk Ü. 2002. *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis* (*Ranunculaceae*) in Estonia: distribution and ecology. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.*, 51: 242-256.
- Podgórska M., Bróz E. 2010. Wymieranie stanowisk sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. subsp. *patens* na Wyżynie Małopolskiej. [W:] Szczepkowski A., Obidziński A. (red.), *Planta in vivo, in vitro et in silico*. LV Zjazd PTB, Warszawa, 61.
- Průša D., Eliáš ml. P., Dítě D., Čačko L., Krása P., Podešva Z., Kovář L., Průšová M., Hoskovec L., Adamec L. 2005. *Chránené rastliny Českej a Slovenskej republiky*. Computer Press, Brno.
- Rassi P., Alanen A., Kanerva T., Mannerkoski I. 2001. *The 2000 Red List of Finnish species. The II Committee for the Monitoring of Threatened Species in Finland. The Ministry of the Environment, Helsinki*.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz.U. 2014, poz. 1409).
- Röder D., Kiehl K. 2006. Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. *Flora*, 201: 499-507.

- Wójtowicz W. 2000. Biologia, wymagania siedliskowe i możliwości uprawy zachowawczej *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Biul. Ogr. Bot., 9: 45-54.
- Wójtowicz W. 2004. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Sasanka otwarta. [W:] Werblan-Jakubiec H., Sudnik-Wójcikowska B. (red.), Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000, 9: 168-171.
- Zarzycki K., Szelań Z. 2006. Czerwona lista roślin naczyniowych w Polsce. [W:] Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szelań Z. (red.), Czerwona lista roślin i grzybów Polski. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków, 9-20.
- Zych M. 2007. Krajowy Plan Ochrony Gatunku Sasanka otwarta (*Pulsatilla patens* (L.) Mill.), Warszawa.
- Żukowski W., Jackowiak B. 1995. Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Zachodniego i Wielkopolski. Prace Zakładu Taksonomii Roślin UAM nr 3.

Z badań nad przemianami środowiska przyrodniczego, gospodarki i osadnictwa na Pojezierzu Mrągowskim

Marta Szal

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Botaniki

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: m.szal@uwb.edu.pl

Streszczenie

W niniejszym opracowaniu przedstawiono problematykę aktywności człowieka w pradziejach, w średniowieczu oraz w czasach nowożytnych, a w szczególności zmian, jakie swoimi różnymi działaniami powodował w środowisku naturalnym. Obraz przekształceń szaty roślinnej, uchwycony w profilu palinologicznym PG2, wskazuje, że działalność człowieka w okresie od epoki brązu do początków średniowiecza w niewielkim stopniu kształtowała środowisko przyrodnicze Pojezierza Mrągowskiego. W diagramie pyłkowym wyróżniono wówczas niewielkie odlesienia oraz rozwój zbiorowisk z roślinnością łąkową i uprawami zbóż. Bardziej znaczące zmiany odnotowano dla okresu późnego średniowiecza, kiedy to zwiększyła się różnorodność palinotaksonów, związana zapewne z powiększeniem areалу zbiorowisk ruderalnych i pól uprawnych. Najbardziej czytelne przekształcenia szaty roślinnej odnotowano dla ostatnich ok. 150 lat. Charakterystyczne dla tego okresu jest rozprzestrzenienie się świerka w lokalnych drzewostanach, co odzwierciedla specyficzną gospodarkę leśną, polegającą na nasadzeniach tego gatunku na siedliskach grądowych.

Słowa kluczowe: antropopresja, paleobotanika, analiza palinologiczna, Mazury, północno-wschodnia Polska

10.1. Wstęp

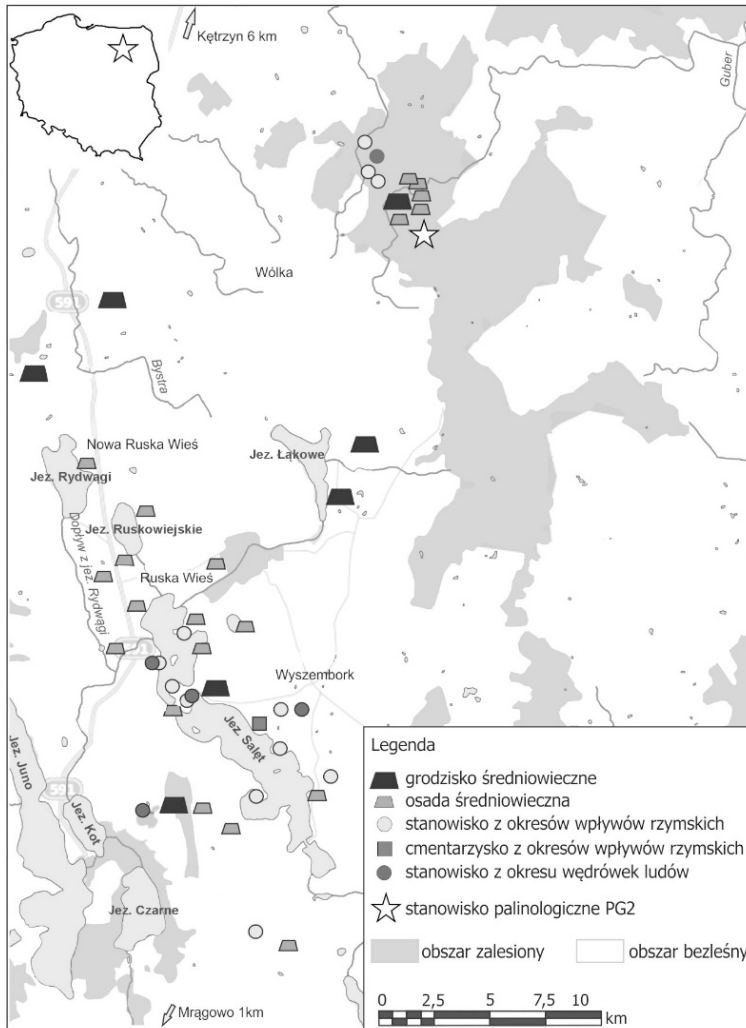
W studiach nad rozwojem dawnych społeczności coraz większą rolę odgrywa problematyka dotycząca wpływu czynników środowiskowych kształtujących warunki życia człowieka, a także badania odnoszące się do roli *homo sapiens* w przekształcaniu poszczególnych elementów przyrody (m.in. Latałowa 2007). Analiza palinologiczna zajmuje szczególne miejsce w tego typu badaniach paleoekologicznych, gdyż umożliwia rekonstrukcję historii przemian szaty roślinnej, w tym zmian wywołanych gospodarką i osadnictwem dawnych społeczności. W opracowaniach dedykowanych relacji człowiek-środowisko, bardzo ważny jest wybór odpowiedniego terenu do badań. Szczególnie cenne są stanowiska bądź regiony, dla których istnieje możliwość konfrontacji wyników analiz paleoekologicznych z danymi archeologicznymi i/lub historycznymi (dokumenty, mapy) (Odgaard, Rasmussen 1998). Z tego względu, do badań, których wyniki są prezentowane w niniejszej pracy, wybrano obszar Pojezierza Mrągowskiego, gdzie począwszy od 1949 roku trwają systematyczne badania wykopaliskowe. Prowadzone one były kolejno przez: Jerzego Antoniewicza, Jerzego Okulicza-Kozaryna i Wojciecha Nowakowskiego, a po 1993 roku kontynuowane przez kilkanaście ekspedycji Instytutu Archeologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Muzeum w Kętrzynie. Na podstawie tych wieloletnich studiów, w obrębie mikroregionu osadniczego nad jeziorem Sałęt oraz kompleksu osadniczego w Poganowie, stwierdzono funkcjonowanie osadnictwa począwszy od mezolitu, aż po okres średniowiecza (Wróblewski i in. 2003; Nowakiewicz 2004; Szymański 2005; Manasterski 2009; Wyczółkowski 2009). Region ten stał się, tym samym, jednym z najlepiej przebadanych archeologicznie obszarów północno-wschodniej Polski, co stworzyło znakomitą okazję do podjęcia w tym miejscu studiów paleoprzyrodniczych nad uwarunkowaniami środowiskowymi osadnictwa oraz zmianami, jakie następowały w środowisku pod wpływem antropopresji w kolejnych fazach osadniczych. W niniejszej pracy zawarte są częściowe wyniki analiz palinologicznych podjętych w ramach tych badań.

10.2. Materiał i metody

10.2.1. Wiercenie

Materiał do badań pochodzi z torfowiska zlokalizowanego ok. 7 km na południe od Kętrzyna (Ryc. 10.1). Wiercenie wykonano przy użyciu świdra torfowego typu Instorf. Niestety, uzyskany profil, o łącznej miąższości osadów 190 cm, wyka-

zuje zaburzenia sedymentologiczne na głębokości poniżej 60 cm, spowodowane prawdopodobnie zmianami hydrologicznymi. Z tego względu, w niniejszej pracy interpretacji zostały poddane wyniki analizy pyłkowej górnej części profilu (60-0,5 cm).



Rycina 10.1. Lokalizacja wiercenia PG2 wykonanego na potrzeby badań paleoekologicznych oraz stanowisk archeologicznych w jego otoczeniu

Źródło: opracowanie własne.

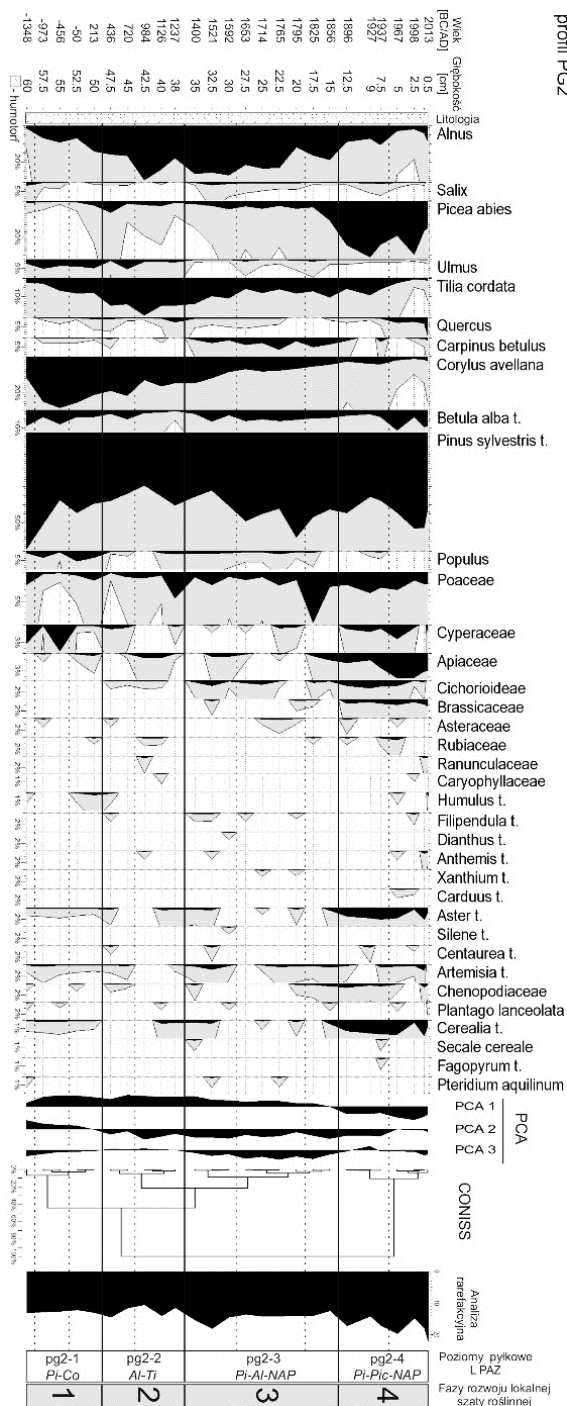
10.2.2. Analiza pyłkowa

Analizie pyłkowej poddano 26 próbek osadu. Materiał macerowano metodą acetolizy Erdtmana (Faegri i Iversen 1989). W każdej próbce liczono średnio 900 ziaren pyłków drzew i krzewów (AP) oraz wszystkie inne towarzyszące im sporomorfy. Przy identyfikacji sporomorf posługiwano się kluczami (m.in. Beug 2004) i kolekcją porównawczą. Wyniki analizy przedstawiono w postaci procentowych diagramów pyłkowych (Berglund, Ralska-Jasiewiczowa 1986). Udziały procentowe poszczególnych taksonów pyłkowych wyliczano w stosunku do sumy podstawowej, na którą składał się pyłek drzew i krzewów (AP) oraz roślin zielnych (NAP) – z wyłączeniem roślin wodnych, bagiennych i zarodnikowych. Kreślenie diagramów wykonano przy pomocy programu Polpal (Nalepka, Walanus 2003). Do podziału diagramów pyłkowych na lokalne poziomy zespołów pyłkowych, wykorzystano analizę numeryczną CONISS (Grimm 1987) oraz analizę składowych głównych PCA. Wykonano również analizę rarefakcyjną, w celu uchwycenia zmian w różnorodności rozpoznanych taksonów. Powyższe analizy wykonano w aplikacjach dostępnych w pakiecie programu Polpal.

10.2.3. Datowanie

Wiek stropowej warstwy osadów (15 cm) określono metodą ołowiową (^{210}Pb) w Instytucie Nauk Geologicznych PAN w Warszawie, a czterech prób osadów z większych głębokości, wykonano metodą radiowęglową ($^{14}\text{C}/\text{AMS}$) w Gliwickim Laboratorium Radiowęglowym Instytutu Fizyki Politechniki Śląskiej.

10.3. Wyniki



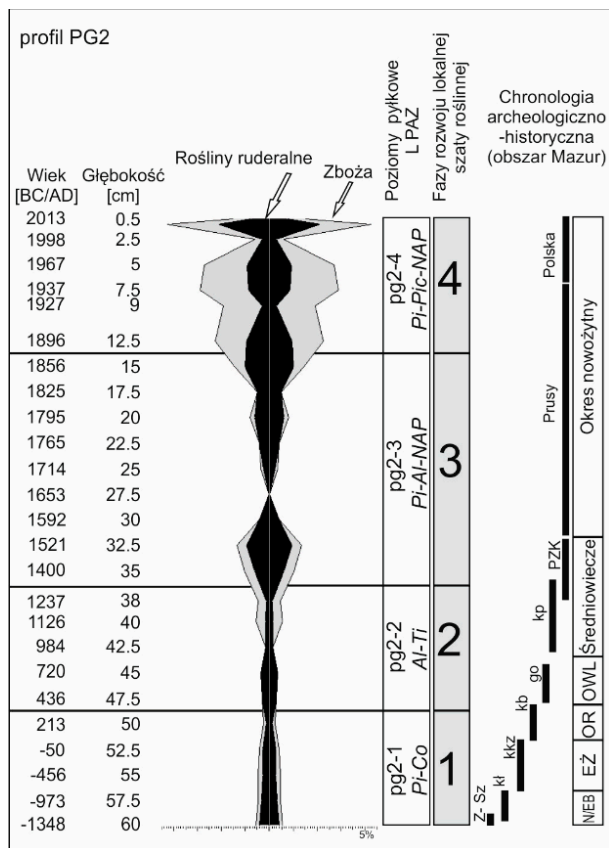
profil PG2

Na uproszczonym diagramie, prezentującym wyniki przeprowadzonych analiz, wyróżniono cztery lokalne poziomy zespołów pyłkowych (L PAZ), które odpowiadają kolejnym etapom rozwoju roślinności w najbliższym otoczeniu badanego zbiornika (Ryc. 10.2).

Rycina 10.2. Diagram prezentujący wyniki analizy palinologicznej i analiz numerycznych (wybrane krzywe)

Źródło: badania własne.

Dla zobrazowania skali oddziaływania człowieka na środowisko, przygotowano syntetyczny diagram procentowy palinologicznych wskaźników antropogenicznych (Ryc. 10.3).



Rycina 10.3. Diagram prezentujący zestawienie palinologicznych wskaźników antropogenicznych na tle danych archeologiczno-historiescznych

Objaśnienia: Z-Sz – zespoły typu Ząbie-Szestno; kł – kultura łużycka; kcz – kultura kurhanów zachodnio-bałyckich; KB – kultura bogaczewska; go – grupa olsztyńska; kp – kultura pruska; PKZ – Państwo Zakonu Krzyżackiego; N/EB – neolit/epoka brązu; EŻ – epoka żelaza; OR – okres rzymski; OWL – okres wędrówek ludów.

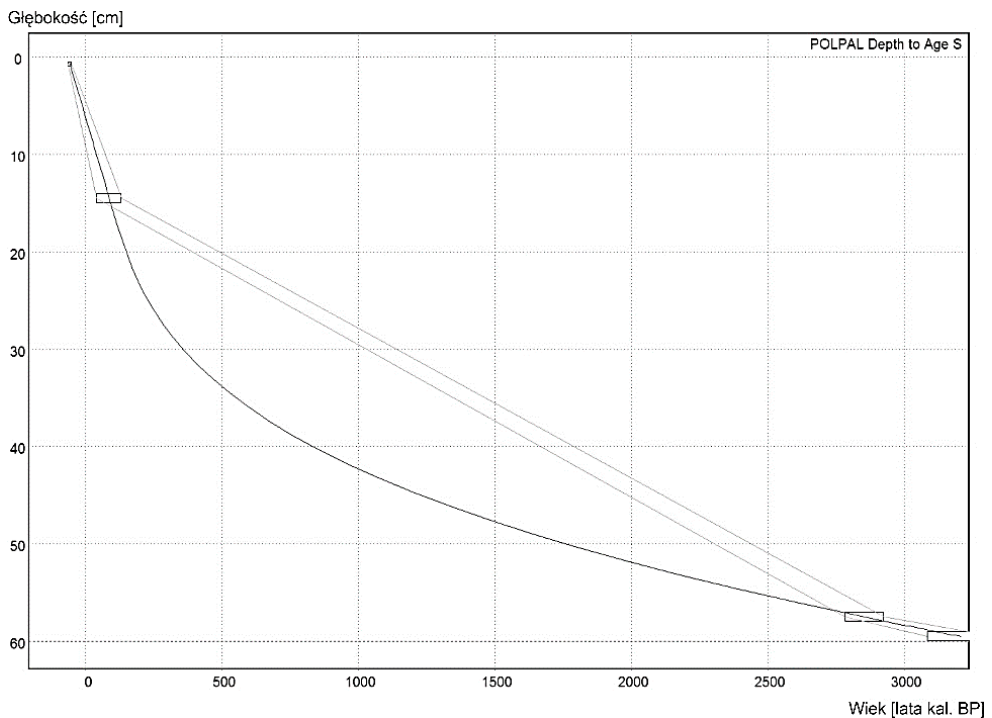
Źródło: badania własne.

Wyniki datowania izotopowego posłużyły do opracowania modelu wiek/głębokość (Tab. 10.1, Ryc. 10.4). Wykorzystano do tego aplikację Depth/Age programu Polpal (Nalepka, Walanus 2003; Walanus, Nalepka 2004). Z modelu odczytano przybliżony wiek każdej analizowanej palinologicznie próbki.

Tabela 10.1. Wyniki określenia wieku osadów profilu PG2 metodą izotopową

| Głębokość (cm) | Wiek ^{14}C (lata BP) | Wiek kalibrowany (lata BP) | | Wiek kalibrowany (lata BC/AD) |
|--|--------------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------------|
| | | Zakres 68% | Zakres 95% | |
| Datowanie metodą ołowiową (^{210}Pb) | | | | |
| 15 | – | – | – | 1818-1908 AD |
| Datowanie metodą radiowęglową ($^{14}\text{C}/\text{AMS}$) | | | | |
| 57,00 | 2760 ±25 | 2876-2794 | 2925-2781 | 976-832 BC |
| 59,50 | 3015 ±25 | 3238-3165 | 3334-3081 | 1385-1132 BC |
| 116,00 | 9890 ±60 | 11387-11226 | 11602-11200 | 9653-9251 BC |
| 170,00 | 10570 ±60 | 12591-12426 | 12652-12390 | 10737-10455 BC |

Źródło: badania własne.



Rycina 10.4. Model wiek/głębokość wykonany w programie Depth/Age Polpal

Źródło: badania własne.

10.4. Dyskusja. Fazy rozwoju lokalnej szaty roślinnej

10.4.1. Pierwszy poziom palinologiczny (lata ok. 1350 p.n.e. – 330 n.e.)

Uzyskany zapis palinologiczny dokumentuje mozaikowość otoczenia badanego stanowiska: od siedlisk bagiennych, wilgotnych łąk, po siedliska suche.

W starszej fazie omawianego poziomu pyłkowego (datowanej na lata ok. 1350-1160 p.n.e.) (Ryc. 10.2) na uwagę zasługują stosunkowo wysokie wartości procentowe sosny, brzozy i leszczyny, zyskujących na znaczeniu szczególnie w okresach odlesienia. Obecność zarodników paproci, orlicy pospolitej *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn pośrednio potwierdza występowanie na badanym terenie widnych lasów sosnowych, ale może także wskazywać na istnienie siedlisk zaburzonych przez człowieka (np. poprzez wypalanie powierzchni leśnych). W zapisie pyłkowym zachowane są ślady aktywności gospodarczej człowieka, która zapewne wymagała tworzenia prześwieleń w okapie lasu poprzez wycinkę lub wypalanie. Obecność palinologicznych wskaźników antropopresji (Ryc. 10.2, Ryc. 10.3), wskazuje na występowanie zbiorowisk ruderalnych i upraw zbożowych. Ponadto, zarejestrowano ziarna pyłku w typie babki lancetowatej, będącej wskaźnikiem prowadzenia wypasów. Co ciekawe, Makohonienko (2004) wskazuje, że choć babka lancetowata wykazuje szczególną relację z praktyką umiarkowanego spasaniasa, może być także wskaźnikiem występowania powierzchni ornych.

Osady z głębokości 59,5 cm wydатовano metodą radiowęglową na lata 1385-1132 p.n.e, czyli na przełom epok neolitu i brązu, kiedy miało miejsce ścieranie się lokalnych ugrupowań neolitycznych z napływową ludnością kultury łużyckiej. Obszar Pojezierza Mazurskiego w tym okresie opisywany jest w literaturze archeologicznej jako nieomal biała plama na mapie osadnictwa tej części Europy (m.in. Dąbrowski 1997), a zachowania osadnicze opisywane były tu dotąd jako przenikanie/penetracje/wpływy grup o mieszanych cechach kulturowych, niepozwalających na jednoznaczny klasyfikację. Mazury określane są też często jako peryferia ludów nierolniczych, tzw. społeczności strefy leśnej, zajmujących się zbieractwem i łowiectwem, bez stabilnej sieci osadniczej. Dopiero najnowsze badania wykopaliskowe, prowadzone pod kierownictwem Manasterskiego (2009), przyniosły dane archeologiczne pozwalające na określenie dla tego okresu swoistej sekwencji osadniczej, nazwanej zespołem typu Ząbie-Szestno. Badania prowadzone przez Manasterskiego (2009) wskazują, że gospodarka ówczesnych społeczności opierała się, poza dotychczas przyjmowanym łowiectwem i zbieractwem, także na mobilnej hodowli zwierząt. Na badanych stanowiskach, wśród odnalezionych szczątków pokonsumpcyjnych, zidentyfikowano kości bydła, owcy, kozy, konia oraz psa, zaś wśród kości

dzikich zwierząt, dominowały pozostałości ryb. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki analizy palinologicznej wydają się potwierdzać przypuszczenia archeologów o praktykowaniu pasterstwa, a ponadto wskazują na podjęcie prób uprawy zbóż na obszarze Pojezierza Mrągowskiego (Ryc. 10.2, Ryc. 10.3).

Młodszą fazę pierwszego poziomu palinologicznego wydatowano na lata 1160 p.n.e.-330 n.e. Na ten okres przypada znacząca zmiana w życiu społeczeństw europejskich, mianowicie przy wyrobieniu narzędzi i broni coraz powszechniej stosuje się żelazo zamiast brązu. Rozwój technik uzyskiwania i obrabiania nowego surowca, wiązał się z formowaniem się w Europie nowych układów osadniczo-kulturowych. Na Pojezierzu Mazurskim, w VII w. p.n.e., miejsce kultury łużyckiej zajmują Bałtowie przybyli z dorzecza Dniepru, formując ugrupowanie pod nazwą kultury kurhanów zachodniobałtyjskich (Okulicz 1981). Z tym ugrupowaniem wiąże się powstanie kompleksu osadniczego w Poganowie, położonego niedaleko badanego stanowiska palinologicznego PG2. Skład spektrów pyłkowych wskazuje na stałe występowanie zbiorowisk antropogenicznych, ale dokumentuje także nieznaczną regenerację drzewostanów (Ryc. 10.2). Wzrastają wówczas udziały pyłku olchy, wiązu i topoli, co świadczy o występowaniu olsów i łągów, najpewniej w dolinie pobliskiego strumienia. Ponadto, zarejestrowano ziarna pyłku w typie *Humulus* (Ryc. 10.2), który reprezentowany jest na obszarze środkowoeuropejskim przez pnącza chmielu zwyczajnego, będącego naturalnym składnikiem lasów łągowych (Matuszkiewicz 2002). Zarejestrowano także wysokie udziały procentowe krzywej pyłkowej sosny oraz zwiększone udziały procentowe pyłku lipy, grabu, dębu, brzozy i leszczyny (Ryc. 10.2), odzwierciedlające występowanie lasów mieszanych. Zapis palinologiczny wskazuje tym samym, że ówczesne osadnictwo nie wywołało zbyt silnych zaburzeń w środowisku, albo też osady ulokowane były w znacznej odległości od badanego stanowiska, co uniemożliwia właściwą ocenę siły antropopresji. Pomimo powyższych wątpliwości, przeprowadzone badania dokumentują występowanie w okolicy niewielkich terenów wypasu i pól uprawnych (Ryc. 10.3).

10.4.2. Drugi poziom palinologiczny (lata ok. 330-1320 n.e.)

W świetle zapisu pyłkowego, starsza faza wyróżnionego tu poziomu palinologicznego obrazuje osłabienie osadnictwa, przypadające na okres rzymski i okres wędrowek ludów. W tym czasie postępuje dalsza odbudowa olsów i łągów. Zaznacza się również wzrost udziałów procentowych pyłku lipy, grabu i brzozy (Ryc. 10.2), wskazując na rozwój mieszanych lasów liściastych. Rozprzestrzeniły się także zarośla leszczynowe, co dokumentuje wzrost udziału pyłku w typie *Corylus avellana* (Ryc. 10.2). W dalszym ciągu dominującym składnikiem szaty roślinnej pozostawa-

ła sosna. Zarejestrowany w zapisie pyłkowym wzrost różnorodności palinotaksonomicznej (wzrost wartości krzywej rarefakcyjnej) oraz obecność przedstawicieli zbiorowisk ruderalnych, między innymi bylicy i komosowatych, świadczy o występowaniu siedlisk zmienionych przez człowieka (Ryc. 10.2). Powierzchnia, jaką zajmowały zbiorowiska otwarte, nie była zbyt duża, a ich występowanie prawdopodobnie można powiązać z osadnictwem z okresu rzymskiego, na który datowane są położone niedaleko stanowiska osadnicze Poganowo stan. X i Poganowo stan. XI oraz cmentarzysko w Turwągach (VOß 1886).

W młodszej fazie drugiego poziomu pyłkowego następuje postępujący proces deforestacji. Zaznacza się przede wszystkim spadek udziałów olchy, wiązu i lipy (Ryc. 10.2), co oznacza ograniczenie areału olsów. Maleje również reprezentacja leszczyny oraz, i tak rzadkiej wcześniej, brzozy. Na odlesionych powierzchniach rozwinęły się zbiorowiska otwarte, głównie łąki. Analiza rarefakcyjna wykazała większe bogactwo rozpoznanych taksonów (Ryc. 10.2), co pośrednio wskazuje na zmianę warunków siedliskowych, w związku ze zmniejszeniem się zwarcia drzewostanów i możliwością pojawienia się taksonów światłolubnych. Jak podaje Noryśkiewicz (2006), wzrost wartości krzywej rarefakcyjnej może wskazywać na fazy o wzmożonej aktywności gospodarczej człowieka. W omawianym odcinku profilu PG2, licznie notowane były trawy, selerowate, jaskrowate, marzanowate i goździkowate. Jednocześnie zaznaczył się wzrost wartości krzywej procentowej zbóż (Ryc. 10.3), co odzwierciedla istnienie powierzchni uprawnych w okolicy badanego stanowiska. Przedstawiony tu obraz przekształceń środowiska datowany jest na lata 850-1320 n.e. i obejmuje okres średniowiecznego osadnictwa, którego liczne pozostałości zarejestrowano w okolicy badanego stanowiska palinologicznego, w tym rozległą osadę, grodzisko oraz miejsce kultu (ofiarnie) (Wyczółkowski 2009). Ludności kultury pruskiej, która zasiedlała w tym czasie obszar Pojezierza Mrągowskiego, znana jest w historiografii z pogańskich wierzeń, w których ważną rolę odgrywał kult lasu (Białyński 2002; Łapo 2007). Piotr z Dusburga, kronikarz krzyżacki, opisał tak zwane „święte gaje”, gdzie nie rąbano drzew i nie łowiono zwierzyń (Wyszomirski 2005, przekład). Z kolei Jan Długosz nadmienia, że tylko nieliczni mieli prawo wstępu na teren miejsc świętych. Niektórzy historycy upatrują przyczyn śmierci św. Wojciecha w sprofanowaniu pruskiego miejsca kultu (Powierski 1966; Białyński 2002). Las w religii Prusów, był siedzibą ich bóstw, głównym miejscem odprawiania kultu i z tego względu, traktowany był z niezwykłą czcią. Białyński (2002) podaje, że szczególną opieką otaczano, między innymi, dęby. Być może, zarejestrowany w omawianym tu poziomie pyłkowym, wzrost udziałów pyłku dębu, można wiązać ze sprawowaniem opieki nad tym drzewem.

10.4.3. Trzeci poziom palinologiczny (lata ok. 1320-1870 n.e.)

Starsza faza wyróżniona tu poziomu pyłkowego, czasowo odpowiada podbojowi krzyżackiemu badanego obszaru. Zdaniem historyków, w wyniku licznych wojen prusko-krzyżackich oraz międzyplemiennych, doszło w tym czasie do znacznego wyludnienia Mazur (m.in. Białuński 1996). W źródłach archeologicznych zarejestrowano jednak ślady osadnictwa, które przetrwało aż do XIV wieku (Okulicz 1981; Nowakiewicz, Wróblewski 2003; Wróblewski i in. 2003; Auch, Nowakiewicz 2009; Wyczółkowski inf. ustna.), a które to pozostałości dodatkowo znajdują potwierdzenie w wynikach analiz palinologicznych (Wacnik 2009; Szal i in. 2013, 2015). Działania Zakonu od połowy XIV wieku wiązały się uruchomieniem akcji osadniczej, która objęła badany rejon i przyniosła efekt, między innymi, w postaci nadania w 1357 roku praw miejskich miastu Kętrzyn (oddalonemu od badanego stanowiska o ok. 8 km) i następnie wybudowaniu tam zamku krzyżackiego (ok. 1370 AD). Jak podaje Sikorski (2012), w ramach przywileju lokacyjnego, Kętrzyn otrzymał 1713,6 ha gruntów, z których większość miała być przeznaczona pod uprawy rolne. W świetle prezentowanych w niniejszej pracy danych palinologicznych, w wyróżnionym okresie następuje spadek reprezentacji drzew, takich jak: wiąz, lipa i dąb (Ryc. 10.2). Zajmowane przez nie żyzne siedliska przeznaczano pod uprawę zbóż, o czym świadczy obecność pyłku *Cerealia* typ (Ryc. 10.2). Po raz pierwszy w analizowanym profilu zarejestrowano ziarna pyłku w typie *Secale cereale*, wskazujące na uprawy żyta. Ponadto, krzywa rarefakcyjna osiąga największe z dotychczasowych wartości, co wskazuje na wyraźne zwiększenie bogactwa rozpoznanych taksonów pyłkowych (Ryc. 10.2). Zapis palinologiczny wskazuje na zwiększenie się powierzchni zbiorowisk ruderalnych z bylicą oraz terenów otwartych z trawami (łąki i/lub pastwiska). W profilu obecna jest wiązówka oraz baldaszkowate i turzycowate, informujące szczególnie o obecności podmokłych łąk. W młodszym odcinku trzeciego poziomu palinologicznego, wydatowanego na lata 1620-1840, zaznacza się wzrost udziału pyłku niektórych drzew, wskazując na zmniejszenie się aktywności gospodarczej człowieka i odbudowę lasu na terenach wyłączonych z użytkowania. Grab, który lepiej od innych drzew regeneruje się z odrośli korzeniowych, zajął miejsce na najżyźniejszych siedliskach. Część obszarów porolnych zajęły lasy brzoźowe i bory sosnowe. Doszło też do częściowego odnowienia się świerka, który mógł wchodzić w skład różnych typów lasu. Jak wynika z zapisu pyłkowego, w niedalekim sąsiedztwie stale obecne były bardzo niewielkie powierzchnie zbiorowisk otwartych, w tym prawdopodobnie także zbiorowisk o charakterze antropogenicznym.

10.4.4. Czwarty poziom palinologiczny (lata ok. 1860-2013 n.e.)

W wyróżnionym etapie miała miejsce zdecydowana przebudowa drzewostanów, wyrażona znacznym, dość gwałtownym wzrostem udziału świerka, który od tej chwili, obok sosny, stał się gatunkiem dominującym w tej okolicy (Ryc. 10.2). Najprawdopodobniej, było to wynikiem gospodarki leśnej prowadzonej na terenach Prus począwszy od XVII do XVIII wieku, polegającej na systematycznym nasadzeniu świerka na siedliskach grądowych (Żurkowski i in. 2004). Datowanie metodą ołowiową momentu wzrostu krzywej pyłkowej świerka wskazuje, że na Pojezierzu Mrągowskim tego typu gospodarke leśną rozpoczęto ok. 1860 roku. Rozwój nasadzonego świerka ograniczył areal typowych składników grądów, takich jak: grab, lipa, wiąz i leszczyna (spadek udziałów procentowych pyłku w typie: *Carpinus betulus*, *Tilia cordata*, *Ulmus* i *Corylus avellana*) (Ryc. 10.2). Świerk mógł też rozprzestrzeniać się w okolicznych zbiorowiskach w sposób naturalny, ponieważ sprzyjają temu warunki klimatyczne północno-wschodniej Polski, a wysoki udział świerka w drzewostanach wszystkich typów lasu jest cechą typową dla tej części kraju (Środoń 1967, Uggla 1965). W taki sposób świerk mógł rozwinąć się przede wszystkim w zbiorowiskach olsów, częściowo eliminując z nich olszę (spadek udziałów pyłku *Alnus*) (Ryc. 10.2). Niewykluczone, że proces ten został przyspieszony w wyniku obniżenia poziomu wody, spowodowanego pracami melioracyjnymi, które w XIX-wiecznych Prusach prowadzono na masową skalę. Zarejestrowany w diagramie pyłkowym wzrost udziału pyłku roślin zielnych dokumentuje przerzedzenie drzewostanów i poszerzenie arealu zbiorowisk otwartych. Podwyższone frekwencje wielu wskaźników antropogenicznych sugerują, że były to przede wszystkim zbiorowiska związane z człowiekiem (Ryc. 10.3). Stosunkowo wysokie wartości procentowe pyłku *Cerealia* typ oraz obecność pyłku *Secale cereale* dowodzą istnienia upraw zbożowych, a występujący w dużych ilościach pyłek Brassicaceae może obrazować uprawy rzepaku (Ryc. 10.2). Licznie notowany pyłek bylicy i komosowatych dokumentuje rozwój zbiorowisk ruderalnych. Ponadto, podwyższone frekwencje pyłku traw wskazują na obecność łąk i/lub pastwisk. Tworzenie śródleśnych prześwieleń i rozwój zbiorowisk antropogenicznych wiązały się najprawdopodobniej z utworzeniem w XIX i XX wieku licznych wsi i majątków ziemskich w sąsiedztwie badanego stanowiska.

Podziękowania

Badania zostały dofinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (projekt badawczy nr DEC-2011/01/B/HS3/04167) oraz dotację celową na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w roku 2015, na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku.

Literatura

- Auch M., Nowakiewicz T. 2009. Ruska ceramika z Ruskiej Wsi. Przyczynek do studiów nad interregionalnymi kontaktami we wczesnośredniowiecznych Prusach. [W:] Bitner-Wróblewska A., Iwanowska G. (red.), Bałtowie i ich sąsiedzi. Marian Kaczyński in memoriam. Seminarium Bałtyjskie 2. PMA, Warszawa, 481-493.
- Berglund B.E., Ralska-jasiewiczowa M. 1986. Pollen analysis and pollen diagrams. [W:] Berglund B.E., Ralska-Jasiewiczowa M. (red.), Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology. Wiley and Sons Ltd., Chichester-Toronto, 455-484.
- Beug H.J. 2004. Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Białyński G. 1996. W sprawie lasów i leśnictwa w południowo-wschodnich Mazurach od XIV do początku XVIII wieku. KMW, 3: 433-447.
- Białyński G. 2002. Las w wierzeniach Prusów i Jaćwiegów, Feste Boyen, 1: 31-42.
- Dąbrowski J. 1997. Epoka brązu w północno-wschodniej Polsce, Wyd. BTN, Białystok.
- Faegri K., Iversen J. 1989. Textbook of pollen analysis (4th edition by Faegri K., Kaland P.E., Krzywinski K.). Wiley, Chichester.
- Grimm E.C. 1987. CONISS: a Fortran 77 program for stratigraphically constrained cluster analysis by the method of incremental sum of squares. Computers and Geosciences 13: 13-35.
- Latałowa M. 2007. Gospodarka człowieka w diagramach pyłkowych. [W:] Makohonienko M., Makowiecki D., Kurnatowska Z. (red.), Środowisko-Człowiek-Cywilizacja. T. 1. Ser. Wyd. SAŚ, 171-188.
- Łapo J.M. 2007. Co wynika z leżenia pod lipą, albo o tym czy lud mazurski zachował pamięć o świętych gajach pruskich? [W:] Łysiak W. (red.), Las w kulturze polskiej. T. 5. Wyd. Eco, Poznań, 487-491.
- Makohonienko M. 2004. Palinologiczne podstawy rekonstrukcji środowiska przyrodniczego a zagadnienia nomadyzmu i pastoralizmu w strefie euroazjatyckiej. [W:] Kośko A., Szmyt M. (red.), Nomadyzm a pastoralizm w Międzyrzeczu Wisły i Dniepru (neolit, eneolit, epoka brązu). Wyd. Poznańskie, Poznań, 235-249.

- Manasterski D. 2009. Pojezierze Mazurskie u schyłku neolitu i na początku epoki brązu w świetle zespołów typu Ząbie-Szestno. Wyd. IA UW, Warszawa.
- Matuszkiewicz J.M. 2002. Zespoły leśne Polski. PWN, Warszawa.
- Nalepka D., Walanus A. 2003. Data processing in pollen analysis. *Acta Palaeobotanica*, 43: 125-134.
- Noryskiewicz A.M. 2006. Historia cisa w okolicy Wierchlasu w świetle analizy pyłkowej. Wyd. UMK, Toruń.
- Nowakiewicz T. 2004. Piłkalia nad Boskim jeziorem. O „wysokich domach” wczesnośredniowiecznych Prusów (na przykładzie północnej Galindii). *Barbaricum*, 7: 275-290.
- Nowakiewicz T., Wróblewski W. 2003. „Legenda galindzka” Piotra z Dusburga w świetle badań archeologicznych. [W:] Bursche A., Ciołek R. (red.), *Antyk i barbarzyńcy. Księga dedykowana profesorowi Jerzemu Kolendo w siedemdziesiątą rocznicę urodzin*. Wyd. IA UW, Warszawa, 313-322.
- Okulicz J. 1981. Osadnictwo ziem pruskich od czasów najdawniejszych do XIII wieku, [W:] *Dzieje Warmii i Mazur w zarysie*. T. 1, PWN, Warszawa, 8-60.
- Odgaard B.V., Rasmussen P. 1998. The use of historical data and sub-recent (A.D. 1800) pollen assemblages to quantify vegetation/pollen relationships. *Paläoklimaforschung Palaeoclim Res*, 27: 67-75.
- Powierski J. 1966. Św. Wojciech w Polsce i w Prusach. *KMW*, 4(94): 559-584.
- Sikorski J. 2012. Historia miasta Kętrzyn. <http://www.jerzysikorski.pl/historia-miasta-ketrzyn>.
- Szal M., Kupryjanowicz M., Wyczółkowski M. 2013. Puszcza Galindzka – kto i kiedy przyczynił się do jej wylesienia? [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*. PTB, Białystok, 227-243.
- Szal M., Kupryjanowicz M., Wyczółkowski M. 2015. Anthropogenic transformation of the vegetation in the immediate vicinity of the settlement complex at Poganowo (Mrągowo Lakeland, NE Poland). *Studia Quaternaria*, 32(1): 19-29.
- Szymański P. 2005. Mikroregion osadniczy z okresu wpływów rzymskich w rejonie jeziora Sałęt na Pojezierzu Mazurskim. *Światowit Supplement Series P: Prehistory and Middle Ages*. T. 10. Wyd. IA UW, Warszawa.
- Środoń A. 1967. Świerk pospolicie w czwartorzędzie Polski. *Acta Palaeobot.*, 8(2): 3-59.
- Ugła H. 1965. Puszcza Piska. [W:] Broda J. (red.), *Dzieje lasów, leśnictwa i drzewnictwa w Polsce*. PWRiL, Warszawa, 565-576.
- Voß G. 1886. Ein Gräberfeld der ersten Jahrhunderte n. Chr. Geburt in Gr. Thurwangen, Prussia *Berichte*, 11: 55-59.
- Wacnik A. 2009. Galindowie i Krzyżacy – oddziaływanie na lokalną roślinność w rejonie Miłek i Staświn (Kraina Wielkich Jezior Mazurskich, północno-wschodnia Polska). *Wiad. Bot.*, 53(1): 21-34.

- Walanus A., Nalepka D. 2004. Integration of Late Glacial and Holocene pollen data from Poland. *Ann. Soc. Geol. Polon.*, 74(3): 285-294.
- Wróblewski W., Nowakiewicz T., Bogucki M. 2003. Terra desolata. Wczesnośredniowieczna Galindia w świetle badań mikroregionu Jeziora Sałęt. [W:] Wróblewski W. (red.), *Studia Galindzkie*, T. 1. Wyd. IA UW, Warszawa, 157-180.
- Wyczółkowski M. 2009. „Baba” kamienna z Poganowa. Wczesnośredniowieczne miejsce kultu Prusów. [W:] Bitner-Wróblewska A., Iwanowska G. (red.), *Bałtowie i ich sąsiedzi. Marian Kaczyński in memoriam. Seminarium Bałtyjskie*. T. 2. PMA, Warszawa, 605-633.
- Wyszomirski S. (przekład) 2005. Piotr z Dusburga. Kronika ziemi pruskiej. Wyd. UMK, Toruń.
- Żurkowski M., Godlewski Z., Szlaski A., Zbrożek P., Ziemblicki R. 2004. „Lasy Mazurskie”. RDLP Białystok i RDLP Olsztyn.

Rola hybrydyzacji międzygatunkowej w kształtowaniu zmienności genetycznej oraz morfologicznej brzoź (*Betula* L.)

Agnieszka Chrzanowska* / Katarzyna A. Jadwiszczak

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

*e-mail: maga.chrzanowska@gmail.com

Streszczenie

Znaczący przepływ genów między sympatrycznymi gatunkami brzoź (*Betula* L.) powoduje trudności w opisie taksonomicznym, morfologicznym i filogenetycznym różnorodnych przedstawicieli tego rodzaju. Hybrydy międzygatunkowe brzoź mogą posiadać morfologię pośrednią lub taką, jaką ma jeden z gatunków rodzicielskich. Mieszańce pierwszego pokolenia między gatunkami różniącymi się ploidalnością charakteryzują się zazwyczaj pośrednią liczbą chromosomów, ale hybrydy dalszych pokoleń i organizmy powstałe z krzyżówek wstecznych często nie różnią się liczbą chromosomów od jednego z gatunków rodzicielskich. Na skutek introgresji chloroplastowego DNA różnogatunkowe brzozy rosnące sympatrycznie są do siebie bardziej podobne pod względem markerów chloroplastowych niż osobniki tego samego gatunku pochodzące z populacji allopatrycznych. Brak diagnostycznych markerów molekularnych dla poszczególnych gatunków brzoź sprawia, że związki pokrewieństwa w obrębie tego rodzaju są ciągle niejasne. Hybrydyzacja i introgresja u *Betula* powodują, że jednoznaczne zaklasyfikowanie osobników w dalszym ciągu wymaga zastosowania jednocześnie analizy wybranych sekwencji DNA, pomiarów morfometrycznych i oszacowania wielkości genomu.

Słowa kluczowe: cechy morfologiczne, filogeneza, introgresja, kariotyp

11.1. Wstęp

Hybrydyzacja to proces polegający na kojarzeniu się osobników pochodzących z różnych genetycznie populacji, w wyniku którego może powstać potomstwo mieszańcowe. Jeżeli wkład gatunków rodzicielskich w powstanie genotypu hybrydowego nie jest równocenny, mówimy o hybrydyzacji introgressywnej (Rieseberg, Carney 1998). Hybrydyzacja jest następstwem występowania niepełnej bariery izolacji rozrodczej między gatunkami sympatrycznymi lub parapatrycznymi. Brak całkowitej bariery izolacji rozrodczej dotyczy najczęściej gatunków młodych ewolucyjnie, które w środowisku naturalnym mogą wymieniać geny nawet przez kilka milionów lat od czasu swego powstania (Mallet 2005).

Zjawisko hybrydyzacji ma bardzo duże znaczenie w procesie ewolucji. Hybrydyzacja może bowiem doprowadzić do powstania nowych gatunków, zwłaszcza gdy mieszańce są allopoliploidami. Allopoliploidy mają zwielokrotnioną liczbę genomów dwóch różnych gatunków, stąd też między nimi a formami wyjściowymi tworzy się natychmiastowa, silna bariera reprodukcyjna (Soltis, Soltis 2009). Natomiast niepełna izolacja reprodukcyjna między mieszańcami a gatunkami rodzicielskimi może prowadzić do introgresji genów neutralnych lub adaptacyjnych, co przyczynia się do zwiększenia różnorodności genetycznej populacji lub pojawienia się w populacji nowych korzystnych cech (Abbott i in. 2013). Genotypy zawierające korzystne allele pochodzące od innego gatunku mogą mieć większe dostosowanie w porównaniu z czystymi osobnikami rodzicielskimi, co istotnie podnosi szansę na przetrwanie gatunku (Donovan i in. 2010). Z drugiej jednak strony, hybrydyzacja i introgresja mogą powodować rozbijanie korzystnych układów genów dających lokalne adaptacje, doprowadzić do wymieszania się unikalnych pul genowych populacji lub młodych gatunków i zaniku 'czystych' populacji. Zjawisko to stanowi szczególne zagrożenie dla rzadkich gatunków, które tworzą niewielkie izolowane populacje i częściej krzyżują się z blisko spokrewnionymi gatunkami, ponieważ w mało licznych populacjach szansa na znalezienie odpowiedniego partnera do rozrodu jest dużo niższa (Rhymer, Simberloff 1996).

Hybrydyzacja odgrywa bardzo ważną rolę u ok. 25% gatunków roślin (Mallet 2005), jednak częstość występowania mieszańców jest istotnie statystycznie zależna od pochodzenia filogenetycznego danej grupy, i dlatego poszczególne rzędy roślin naczyniowych różnią się pod względem frekwencji hybrydów (Whitney i in. 2010). Do spontanicznej wymiany genów dochodzi znacznie częściej u bylin o zapłodnieniu krzyżowym, które mogą ponadto rozmnażać się przez agamospermię (rozmnażanie przez nasiona powstające z niezapłodnionej komórki jajowej lub z innej komórki woreczka zalążkowego) lub w sposób wegetatywny (Ellstrand i in. 1996).

Zarówno agamospermia, jak i rozmnażanie wegetatywne zapewniają stabilność genotypu hybrydowego, który powstał z dwóch, często niekompatybilnych, genomów rodzicielskich. Analiza przeprowadzona wśród 282 rodzin roślin naczyniowych pochodzących z Europy, Ameryki Północnej i Australii wykazała, że najwyższą zdolność do hybrydyzacji, liczoną jako procent kojarzeń zakończonych powstaniem potomstwa mieszańcowego wśród wszystkich potencjalnych krzyżówek międzygatunkowych w danym rodzaju, wykazują paprocie z rodziny Dennstaedtiaceae (denstecjowate) oraz rośliny kwiatowe, między innymi z rodzin: Phyllanthaceae (liściokwiatowe), Aspleniaceae (zanokcicowate), Blechnaceae (podrzeniowate), Orchidaceae (storzycowate), Haloragaceae (wodnikowate), Salicaceae (wierzbowate) i Betulaceae (brzozowate; Whitney i in. 2010; Barrington 2011).

Brzozy (*Betula* L.) są doskonałym przykładem na to, jak bardzo hybrydyzacja może utrudniać definiowanie gatunków, a co za tym idzie, ich wzajemne powiązania. Ze względu na intensywny międzygatunkowy przepływ genów do dzisiaj nieznana jest liczba gatunków brzoź. Różni autorzy podają, że do rodzaju *Betula* może należeć od 30 do 120 gatunków drzew i krzewów obecnych na półkuli północnej (Järvinen i in. 2004; Koropachinskii 2013). W Europie rosną cztery gatunki brzoź o potwierdzonym statusie taksonomicznym, dwa krzewiaste: brzoza niska (*Betula humilis* Schrk.) i karłowata (*B. nana* L.) oraz dwa drzewiaste: brzoza omszona (*B. pubescens* Ehrh.) i brodawkowata (*B. pendula* Roth). Brzozy drzewiaste są powszechne na niemal całym kontynencie, natomiast gatunki krzewiaste mają ograniczony zasięg występowania (Hultén, Fries 1986). *Betula nana* występuje w północnej części Europy oraz na izolowanych stanowiskach w Europie Zachodniej i Środkowej. *Betula humilis* rośnie w Europie Wschodniej i Środkowej oraz w Alpach. Ponadto, na kontynencie wyróżnia się niekiedy: brzozę ojcowską *B. oycoviensis* Bess., brzozę karpacką *B. carpatica* Waldst. and Kit ex Willd. (Ralska-Jasiewiczowa i in. 2004; Staszkievicz 2014), brzozę ciemną *B. obscura* Kotula (Franiel 2009) i brzozę karelską *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti (Ryynänen, Ryynänen 1986).

11.2. Rola hybrydyzacji w kształtowaniu zmienności morfologicznej brzoź

Z uwagi na duże podobieństwo morfologiczne dwóch najbardziej pospolitych w Europie gatunków brzoź drzewiastych: *B. pubescens* i *B. pendula*, zostały one opisane w 1753 roku przez Linneusza jako jeden gatunek – *B. alba*. Analizy cytolo-

giczne wykazały jednak, że obydwa gatunki różnią się poziomem ploidalności. *Betula pendula* jest diploidem ($2n=28$), natomiast *B. pubescens* to allotetraploid ($2n=56$), a więc gatunek o podwojonej liczbie chromosomów. Obydwa gatunki zajmują różne nisze ekologiczne. *Betula pendula* rośnie zwykle w środowiskach bardziej suchych i ciepłych, z kolei *B. pubescens* występuje na stanowiskach o większej wilgotności, jednak zasięgi występowania obu gatunków w dużej mierze pokrywają się ze sobą (Atkinson 1992). Szeroki zakres zmienności cech morfologicznych *B. pendula* i *B. pubescens* sprawia, że są one trudne do rozróżnienia w terenie. Atkinson i Codling (1986) zaproponowali metodę rozróżnienia tych dwóch gatunków za pomocą dyskryminacyjnej funkcji Atkinsona (ang. *Atkinson Discriminant Function*, ADF), bazującej na cechach związanych z kształtem liścia: liczbie ząbków na brzegu blaszki liściowej, odległości od ogonka do pierwszego ząbka u podstawy liścia oraz szerokości wierzchołka liścia. Dla *B. pendula* otrzymuje się $ADF < -2$, natomiast w przypadku *B. pubescens* $ADF > -2$ (Wang i in. 2014b). Zastosowanie tej metody na bardzo dużej próbie liści pochodzących od osobników *B. pendula* oraz *B. pubescens* w Wielkiej Brytanii pozwoliło przypisać 97,5% prób do jednego z dwóch gatunków, co pokrywało się z wynikami genotypowania z wykorzystaniem jądrowego mikrosatelitarnego DNA (Wang i in. 2014a). Nakrywanie się cech morfologicznych obydwu gatunków może być konsekwencją wymiany genów między nimi lub wpływu czynników środowiskowych. Wang i in. (2014b) sugerują jednak, że znaczenie hybrydyzacji w zróżnicowaniu morfologicznym jest niewielkie, gdyż szacuje się, że hybrydy *B. pendula* i *B. pubescens* występują w naturze stosunkowo rzadko i mają znacznie obniżoną płodność (Atkinson 1992).

Znacznie częściej spotykane są mieszańce między tetraploidalną *B. pubescens* a diploidalną *B. nana* na obszarach, na których ich zasięgi pokrywają się. Połączenie analiz morfologicznych i cytogenetycznych wykorzystano do zbadania zjawiska hybrydyzacji między brzozą omszoną a brzożą karłowatą na Islandii (Thórsson i in. 2001). W tym celu wybrano łącznie 72 osobniki należące do różnych grup kariologicznych: diploidy ($2n=28$), triploidy ($2n=42$) i tetraploidy ($2n=56$). Dla każdego osobnika obliczono wartość indeksu morfologicznego, bazując na cechach różniących oba gatunki, takich jak: forma wzrostu, pokrój, długość ogonka liściowego, kształt liścia, ząbkowanie, kształt wierzchołka, podstawy i brzegu liścia. Każda cecha została wypunktowana jako 0, 1 lub 2, przy czym 0 przypisano cechom typowym dla *B. nana*, natomiast wartością 2 oznaczono cechy charakterystyczne dla *B. pubescens* (np. kształt liścia okrągły – 0, odwrotnie jajowaty – 1, jajowaty – 2). Wartości indeksu morfologicznego dla poszczególnych osobników otrzymano poprzez zsumowanie punktów dla poszczególnych cech. Najniższą wartość (0) reprezentowały typowe osobniki *B. nana*, zaś najwyższa (13) oznaczała brzozy o morfo-

logii *B. pubescens* (Thórsson i in. 2001). Porównanie wartości indeksu morfologicznego i liczby chromosomów wykazało, zgodnie z oczekiwaniami, że większość osobników diploidalnych miała cechy *B. nana* (0-1), natomiast tetraploidy posiadały cechy bardziej typowe dla *B. pubescens* (8-11). Żadna z badanych brzoź nie miała jednak wszystkich cech *B. pubescens* (13; Thórsson i in. 2001). Wśród analizowanych brzoź zidentyfikowano osobniki tetraploidalne o pośrednich cechach morfologicznych (3-7), jak i osobniki diploidalne o morfologii pośredniej lub nawet charakterystycznej dla *B. pubescens* (8-10). Osobniki triploidalne wykazywały pełne spektrum cech morfologicznych: od typowych dla *B. nana* (1), poprzez pośrednie (2-7) do charakterystycznych dla *B. pubescens* (8-9; Thórsson i in. 2001).

Innym przykładem obrazującym jak przepływ genów między spokrewnionymi gatunkami brzoź wpływa na morfologię osobników, jest znaleziony w zachodniej części Islandii triploidalny mieszańiec, który łączył w sobie cechy morfologiczne brzozy omszonej i brzozy karłowatej (Anamthawat-Jóhnnsson, Thórsson 2003). Cechy tego osobnika typowe dla *B. pubescens* to m.in.: forma wzrostu i pokrój, natomiast cechy *B. nana* to: zaokrąglona podstawa i okrągły kształt blaszki liściowej. Zaobserwowano ponadto, że liście tego osobnika wybarwiają się jesienią na czerwono, co jest charakterystyczne dla brzozy karłowatej, w odróżnieniu do brzozy omszonej, której liście o tej porze roku są jasnożółte. Naturalna hybrydyzacja między *B. pubescens* i *B. nana* jest zjawiskiem dość powszechnym, aczkolwiek osobniki triploidalne są częściej spotykane na granicy stanowisk zajmowanych przez brzozy, co może oznaczać, że mieszańce lepiej radzą sobie na obszarach otwartych, niezarośniętych przez gatunki rodzicielskie (Anamthawat-Jóhnnsson, Thórsson 2003).

Thórsson i in. (2007) przeprowadzili badania cech morfologicznych *B. pubescens* i *B. nana* z wykorzystaniem indeksu morfologicznego oraz liniowej analizy dyskryminacyjnej LDA (ang. *Linear Discriminant Analysis*). Model LDA mierzy cechy ilościowe, takie jak: powierzchnia liścia, długość ogonka liściowego, długość i szerokość liścia, natomiast indeks morfologiczny bazuje na cechach jakościowych. Obydwie metody pozwoliły rozróżnić trzy grupy osobników o różnym stopniu ploidalności, jednak model LDA okazał się bardziej dokładny w przypadku triploidalnych hybrydów (51% poprawnie zidentyfikowanych mieszańców) niż indeks morfologiczny (42%; Thórsson i in. 2007). Z powodu dużego zróżnicowania morfologicznego mieszańców, analizy cech ilościowych pozwoliły rozpoznać tylko połowę triploidów, jednak osobniki diploidalne *B. nana* i tetraploidalne *B. pubescens* zostały poprawnie zidentyfikowane z niemalże 100% dokładnością (Thórsson i in. 2007).

Badania oparte na analizie cech morfologicznych liści i organów generatywnych *B. humilis* przeprowadzono w Polsce (Staszkiwicz i in. 1993). U części osob-

ników niektóre z analizowanych cech miały wartości bardziej zbliżone do *B. nana* lub do brzoź drzewiastych: *B. pendula* i *B. pubescens*, a jedynie niewielka liczba osobników charakteryzowała się wszystkimi cechami czystego gatunku *B. humilis* (Staszekiewicz i in. 1993). Pomiary morfometryczne sugerowały, że w populacjach *B. humilis* częstość hybrydów i form introgressywnych może sięgać nawet 45%. Autorzy przypuszczają, że zjawisko introgresji mogło ulec nasileniu na skutek osuszenia torfowisk i melioracji podmokłych łąk, które stanowią naturalne siedliska brzozy niskiej. W warunkach silniejszego nacisku selekcji, hybrydy brzoź mają przypuszczalnie większe szanse przeżycia niż gatunki rodzicielskie (Thórsson i in. 2007).

11.3. Wpływ hybrydyzacji na interpretację wyników analiz filogenetycznych brzoź

W analizach filogenetycznych stosuje się różne sekwencje DNA, które w odróżnieniu od cech morfologicznych nie podlegają modyfikującym wpływom środowiska. W badaniach nad wzajemnymi powiązaniem filogenetycznymi brzoź wykorzystywane były następujące sekwencje DNA: geny jądrowe (Järvinen i in. 2004; Li i in. 2005; Nagamitsu i in. 2006; Isidorov i in. 2014), geny chloroplastowe (Järvinen i in. 2004), ITS (ang. *internal transcribed spacers*; Nagamitsu i in. 2006; von Cräutlein i in. 2011), mikrosatelitarne DNA (Nagamitsu i in. 2006), ISSR (ang. *inter-simple sequence repeats*; Jiang i in. 2002), AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*; Schenk i in. 2008) i RAD tagi (ang. *restriction-site associated DNA fragments*; Wang i in. 2013). Dla wielu grup roślin zaproponowano krótkie sekwencje DNA diagnostyczne dla poszczególnych gatunków, tzw. genetyczne kody paskowe (ang. *barcoding*). Należą do nich m.in. rodzaje: bylica (*Artemisia* L.), rzeżucha (*Cardamine* L.), gwiazdnica (*Stellaria* L.), szczaw (*Rumex* L.) i zawilec (*Anemone* L.; Saarela i in. 2013). Niestety, w przypadku brzoź popularne kody paskowe DNA pokazują brak zmienności na poziomie międzygatunkowym (von Cräutlein i in. 2011; Saarela i in. 2013), co nie pozwala rozstrzygnąć wątpliwości taksonomicznych. Na przykład, do dzisiaj niewyjaśnione zostało pochodzenie hybrydowego gatunku *B. pubescens*. Za jeden z gatunków rodzicielskich brzozy omszonej uznawana jest brzoza brodawkowata (Howland i in. 1995). Nie wiadomo jednak, czy drugim gatunkiem rodzicielskim jest *B. nana* czy *B. humilis* (Järvinen i in. 2004). Järvinen i in. (2004) stwierdzili bowiem u *B. pubescens* dwa allele jądrowego genu dehydrogenazy alkoholowej (*ADH*) różniące się długością. W analizie

filogenetycznej krótszy allel grupuje się z allelem *B. humilis*, a dłuższy – z allelem *B. nana*.

Kolejnym problemem w analizach filogenetycznych brzoź wynikającym z zachodzenia procesu hybrydyzacji jest to, że drzewa filogenetyczne bazujące na różnych fragmentach genomu pokazują odmienne związki pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi gatunkami (Schenk i in. 2008). Na przykład, wykorzystanie genu *ADH* w analizach 14 gatunków brzoź pozwoliło wyróżnić trzy grupy (Järvinen i in. 2004). W każdej z grup znalazły się gatunki zasiedlające różne kontynenty, przy czym euroazjatycki gatunek *B. pubescens* był włączany do grupy pierwszej lub trzeciej, w zależności od tego, czy brany był pod uwagę allel krótki czy długi genu *ADH*. Z kolei, na podstawie sekwencji chloroplastowego genu maturazy (*matK*), te same gatunki brzoź zostały podzielone na dwie grupy. Do pierwszej weszły trzy gatunki północnoamerykańskie: *B. alleganiensis* Britt., *B. lenta* L. i *B. papyrifera* Marsh. (Järvinen i in. 2004). Pozostałe 11 gatunków pochodzących z Europy, Azji i Ameryki Północnej utworzyło grupę drugą. Najbardziej prawdopodobną przyczyną braku zgodności wzorów zróżnicowania sekwencji jądrowych i chloroplastowych jest hybrydyzacja introgressywna, która może prowadzić do włączenia genomu chloroplastowego (cpDNA) lub mitochondrialnego (mtDNA) jednego gatunku do puli genowej innego gatunku (ang. *cytoplasmic capture*), nawet przy niewielkiej wymianie genów jądrowych (Rieseberg, Soltis 1991; Rieseberg i in. 1996). W efekcie osobnik jest podobny pod względem cpDNA i/lub mtDNA do jednego gatunku rodzicielskiego, a pod względem morfologii i genomu jądrowego – do drugiego gatunku rodzicielskiego. Podejrzewa się, że introgresja cpDNA jest odpowiedzialna za większe podobieństwo genetyczne różnogatunkowych brzoź występujących w populacjach sympatrycznych niż osobników tego samego gatunku, pochodzących ze stanowisk allopatrycznych (Pálme i in. 2004; Thórsson i in. 2010; Jadwiszczak i in. 2012; Thompson i in. 2015).

Kolejną próbę ustalenia powiązań filogenetycznych między brzożami podjęli Schenk i in. (2008), którzy w swoich analizach wykorzystali 23 gatunki i kilkanaście hybrydów międzygatunkowych. W drzewie filogenetycznym, narysowanym w oparciu o wysoce zmienne markery AFLP, cztery europejskie gatunki brzoź zostały zaklasyfikowane do tej samej grupy – IV. *Betula*, chociaż w morfologicznej klasyfikacji de Jonga (1993) *B. humilis* i *B. nana* należą do sekcji *Chamaebetula*, a *B. pendula* i *B. pubescens* do sekcji *Betula*. Niejasne pokrewieństwo pomiędzy grupami brzoź wydzielonymi na podstawie markerów AFLP oraz niskie wartości poparcia statystycznego dla poszczególnych gałęzi drzewa wynikają najprawdopodobniej z zaniku różnic gatunkowych, co jest konsekwencją zachodzenia hybrydyzacji introgressywnej (Schenk i in. 2008).

Odmienność tok rozumowania przyjęli Jiang i in. (2002), którzy przeprowadzili analizę markerów ISSR u ośmiu gatunków brzoź z Europy i Azji. Według tych autorów, gatunki zaklasyfikowane przez de Jonga (1993) do jednej sekcji morfologicznej są bardziej do siebie podobne genetycznie niż gatunki należące do różnych sekcji, co ułatwia zachodzenie hybrydyzacji w obrębie jednej sekcji.

Schenk i in. (2008) sugerowali, że problemy w ustalaniu pokrewieństwa brzoź mogą być spowodowane nie tylko międzygatunkową wymianą genów, ale także zajściem wielu przypadków specjacji w krótkim czasie, co niekiedy skutkuje pojawieniem się mutacji konwergentnych (są to podobne mutacje występujące w dwóch niezależnych liniach rodowych; cechy homoplastyczne) lub niekompletną segregacją alleli (ang. *incomplete lineage sorting*). Brak kompletnej segregacji alleli polega na tym, że dwie populacje potomne, pochodzące od tej samej populacji ancestralnej, posiadają różne allele. Jednak wyniki badań jądrowego mikrosatelitarnego DNA przeprowadzone w Wielkiej Brytanii w populacjach brzozy omszonej i brzozy karłowatej nie potwierdzają tych ostatnich hipotez. Według Wanga i in. (2014a), zarówno różnice w procentowym udziale obcych alleli u obu gatunków brzoź, jak i wzrost frekwencji wspólnych alleli z południa na północ, czyli w kierunku zasięgu *B. nana*, świadczą o introgresji.

11.4. Wpływ hybrydyzacji na kariotyp i genotyp brzoź

Niektóre sympatrycznie rosnące gatunki brzoź różnią się liczbą chromosomów, np. *B. pendula* jest diploidem o $2n=28$, a *B. pubescens* tetraploidem o $2n=56$. Brzoza omszona, preferująca wilgotne gleby bagienne i torfiaste, może również współwystępować z diploidalnymi brzozami krzewiastymi: *B. humilis* ($2n=28$) i *B. nana* ($2n=28$). Wydawałoby się zatem, że analiza liczby chromosomów w populacjach brzoź może pomóc w oszacowaniu frekwencji hybrydów, gdyż potencjalne mieszańce z pokolenia F1 powinny być triploidami o $2n=42$. Takie hybrydy stwierdzono na Islandii (Thórsson i in. 2001, 2007; Anamthawat-Jónsson, Thórsson 2003), gdzie sympatryczne populacje tworzą brzoza omszona i brzoza karłowata. Jednak nie wszystkie hybrydy w populacjach islandzkich były triploidami. Część osobników mieszańcowych okazała się diploidalna (Anamthawat-Jónsson, Tómasson 1990; Anamthawat-Jónsson, Thórsson 2003; Thórsson i in. 2007). Przypuszczalnie takie diploidy są dalszym niż F1 pokoleniem mieszańców albo pochodzą z krzyżówek wstecznych (Anamthawat-Jónsson, Tómasson 1990). W naturalnych populacjach *B. pubescens* i *B. nana* na Islandii częstość triploidalnych hybrydów

wynosiła ok. 10% (Thórsson i in. 2001; 2007). Z kolei, w eksperymencie polegającym na zapłodnieniu kwiatów żeńskich brzozy karłowatej pyłkiem pochodzącym od brzozy omszonej otrzymano ok. 70% potomstwa triploidalnego (Anamthawat-Jónsson, Tómasson 1999). Konsekwencją posiadania triploidalnego genomu jest bardzo często obniżona płodność lub nawet sterylność osobników, wynikające z nieprawidłowości w koniugacji i segregacji chromosomów. Jednak badania przeprowadzone na Islandii sugerują, że triploidy między brzozą karłowatą a omszoną wytwarzają niewielką ilość zdolnych do zapłodnienia gamet o 14 lub 28 chromosomach (Anamthawat-Jónsson, Thórsson 2003).

Krzyżówki między *B. pendula* i *B. pubescens* dają potomstwo o $2n=28, 32, 42$ lub 56 chromosomach w kariotypie (Atkinson 1992; Howland i in. 1995). Dane kariotypowe pochodzące z polskich populacji brzozy niskiej również mogą wskazywać na zachodzenie kojarzeń międzygatunkowych, gdyż od 19 do 60% osobników było aneuploidami o: $2n=26-27$ lub $2n=29-31$ (Jadwiszczak i in. 2011). Analiza chromosomowa przeprowadzona w sympatrycznych populacjach *B. humilis* i *B. pubescens* w Niemczech wykazała, że wszystkie potencjalne hybrydy miały kariotyp typowy dla jednego z gatunków rodzicielskich (Natho 1959). Powyższe przykłady pokazują, że pomimo wyraźnych różnic w liczbie chromosomów pomiędzy niektórymi gatunkami *Betula*, nie zawsze jest możliwe wskazanie osobników hybrydowych. Wynika to z faktu, że chromosomy brzoź są niezmiernie małe (średnio $<1\mu\text{m}$, czyli mniej niż 1/10 średniej długości chromosomu pszenicy), co powoduje ogromne trudności w ich liczeniu (Anamthawat-Jónsson 2003). Do dzisiaj brakuje danych na temat zmienności chromosomowej w naturalnych populacjach *Betula*. Przyczyną tego stanu jest brak szczegółowych opisów kariotypów brzoź. O kariotypie *B. pendula* wiadomo tylko tyle, że tworzą go chromosomy metacentryczne i submetacentryczne (Taper, Grant 1973).

Początkowe badania chromosomowe w populacjach brzoź sugerowały, że przepływ genów jest jednokierunkowy: od gatunku o niższej ploidalności do gatunku o wyższej ploidalności. Porównanie zmienności morfologicznej, kariotypowej i mapowanie genów rybosomalnych (rDNA) w islandzkich populacjach brzoź pozwoliło wyciągnąć wniosek o dwukierunkowym przepływie genów, w którym triploidalne hybrydy odgrywają bardzo istotną rolę (Anamthawat-Jónsson, Thórsson 2003). Triploidalne mieszańce z Islandii posiadały geny rDNA 16S-28S pochodzące od obu gatunków rodzicielskich, co dowodzi, że powstały jako pokolenie F1 – w wyniku kojarzenia czystych form rodzicielskich. Ciągłą w czasie i przestrzeni możliwość wymiany genów między *B. nana* i *B. pubescens* potwierdziła ocena wielkości genomów u czystych gatunków oraz ich triploidalnych hybrydów. Genom triploida okazał się pośredni (666 mln par zasad) w stosunku do genomów diploi-

dalnego (448 mln pz) i tetraploidalnego (882 mln pz; Anamthawat-Jónsson i in. 2010). Pośrednia wielkość genomu triploidów oznacza, że nie uległ on jeszcze zmodyfikowaniu, a więc powstał bardzo niedawno.

Wydawałoby się, że wszelkie wątpliwości związane z hybrydyzacją i introgresją u brzoź rozwieje sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS), zwane inaczej wielkoskalowym, pozwalające otrzymać sekwencje ogromnej liczby fragmentów DNA u badanych osobników. W wyniku sekwencjonowania wielkoskalowego uzyskano średnio ponad 71 tysięcy RAD tag (krótkie odcinki DNA przyległe do miejsca restrykcyjnego) loci u dwóch osobników *B. nana*, siedmiu *B. pubescens*, jednego *B. pendula* i pięciu hybrydów międzygatunkowych (Wang i in. 2013). Spośród analizowanych RAD tagów, cztery wykazały brak zmienności u dwóch brzoź karłowatych, co może sugerować, że loci te są diagnostyczne dla tego gatunku. Jednak wynik ten wymaga potwierdzenia na większej próbie osobników, gdyż może się okazać, że genotypy innych osobników *B. nana* są heterozygotyczne w potencjalnych loci markerowych lub takie same allele występują jednak u gatunków blisko spokrewnionych. Generalnie, analiza NGS potwierdziła, że sekwencje DNA brzozy omszonej i karłowatej nie różnią się istotnie (Wang i in. 2013). Stąd też, dopóki sekwencjonowanie wielkoskalowe nie stanie się standardem w badaniach populacyjnych, jednoznaczne określenie przynależności gatunkowej osobników *Betula* wymaga zastosowania jednocześnie analizy wybranych markerów molekularnych, pomiarów morfometrycznych i oszacowania wielkości genomu (Wang i in. 2014b).

Literatura

- Abbott R., Albach D., Ansell S., Arntzen J.W., Baird S.J.E., Bierne N., Boughman J., Brelsford A., Buerkle C.A., Buggs R., Butlin R.K., Dieckmann U., Eroukhmanoff F., Grill A., Cahan S.H., Hermansen J.S., Hewitt G., Hudson A.G., Jiggins C., Jones J., Keller B., Marczewski T., Mallet J., Martinez-Rodriguez P., Most M., Mullen S., Nichols R., Nolte A.W., Parisod C., Pfennig K., Rice A.M., Ritchie M.G., Seifert B., Smadja C.M., Stelkens R., Szymura J.M., Vainola R., Wolf J.B.W., Zinner D. 2013. Hybridization and speciation. *J. Evolution. Biol.*, 26: 229-246.
- Anamthawat-Jónsson K. 2003. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridization. *Method. Cell Sci.*, 25: 91-95.
- Anamthawat-Jónsson K., Thórsson A.T. 2003. Natural hybridisation in birch: triploid hybrids between *Betula nana* and *B. pubescens*. *Plant Cell Tiss. Org.*, 75: 99-107.

- Anamthawat-Jónsson K., Thórhsson Æ.Th., Temsch E.M., Greilhuber J. 2010. Icelandic birch polyploids – the case of a perfect fit in genome size. *J. Bot.*, article ID 347254: 9 pages. doi:10.1155/2010/347254
- Anamthawat-Jónsson K., Tómasson T. 1990. Cytogenetics of hybrid introgression in Icelandic birch. *Hereditas*, 112: 65-70.
- Anamthawat-Jónsson K., Tómasson T. 1999. High frequency of triploid birch hybrid by *Betula nana* seed parent. *Hereditas*, 130: 191-193.
- Atkinson M.D. 1992. Biological flora of the British Isles: *Betula pendula* Roth (*B. verrucosa* Ehrh.) and *B. pubescens* Ehrh. *J. Ecol.*, 80: 837-870.
- Atkinson M.D., Codling A. N. 1986. A reliable method for distinguishing between *Betula pendula* and *B. pubescens*. *Watsonia*, 7: 5-6.
- Barrington D. S. 2011. Should hybrids be protected by listing; *Betula x sandbergii* and *Botrychium minganense* in Vermont. *J. Torrey Bot. Soc.*, 138: 465-471.
- de Jong P.C. 1993. An introduction to *Betula*: Its morphology, evolution, classification and distribution with a survey of recent work. The IDS *Betula* Symposium, International Dendrology Society. Susses, U.K.
- Donovan L.A., Rosenthal D.R., Sanchez-Velenosi M., Rieseberg L.H., Ludwig F. 2010. Are hybrid species more fit than ancestral parent species in the current hybrid species habitats? *J. Evolution. Biol.*, 23: 805-816.
- Ellstrand N.C., Whitkus R.W., Rieseberg L.H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5090-5093.
- Franiel I. 2009. Problemy taksonomiczne *Betula obscura* (Betulaceae) – przegląd literatury. *Fragm. Florist. Geobot. Pol.*, 16: 27-32.
- Howland D.E, Oliver R.P, Davy A.J. 1995. Morphological and molecular variation in natural population of *Betula*. *New Phytol.*, 130: 117-124.
- Hultén E, Fries M. 1986. Atlas of north European vascular plants. Koeltz Scientific Books, Köningstein.
- Isidorov V.A., Szczepaniak L., Wróblewska A., Pirożnikow E., Vetchinnikova L. 2014. Gas chromatographic-mass spectrometric examination of chemical composition of two Eurasian birch (*Betula* L.) bud exudates and its taxonomical implication. *Biochem. Syst. Ecol.*, 52: 41-48.
- Jadwiszczak K.A., Banaszek A., Jabłońska E., Sozinov O. V. 2012. Chloroplast DNA variation of *Betula humilis* Schrk. in Poland and Belarus. *Tree Genet. Genomes*, 8: 1017-1030.
- Jadwiszczak K.A., Jabłońska E., Kłosowski S., Banaszek A. 2011. Aneuploids in the shrub birch *Betula humilis* populations in Poland. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 80: 233-235.
- Järvinen P., Palmé A., Morales L.O., Lännpää M., Keinänen M., Söpanen T., Lascoux, M. 2004. Phylogenetic relationships of *Betula* species (*Betulaceae*) based on nuclear *ADH* and chloroplast *matK* sequences. *Am. J. Bot.*, 9: 1834-1845.

- Jiang J., Chuan-Ping Y., Gui-Feng L., Jin-Hua W., Tong-Hua L. 2002. Genetic relationship of interspecies for eight birch species. *J. Forest. Res.*, 13: 281-284.
- Koropachinskii I.Y. 2013. Natural hybridization and taxonomy of birches in North Asia. *Contemp. Prob. Ecol.*, 6: 350-369.
- Li J., Shoup S., Chen Z. 2005. Phylogenetics of *Betula* (Betulaceae) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA. *Rhodora* 107: 69-86.
- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*, 20: 229-237.
- Nagamitsu T., Kawahara T., Kanazashi A. 2006. Endemic dwarf birch *Betula apoiensis* (Betulaceae) is a hybrid that originated from *Betula ermanii* and *Betula ovalifolia*. *Plant Species Biol.*, 21: 19-29.
- Natho G. 1959. Variationsbreite und Bastardbildung bei mitteleuropäischen Birkensippen. *Feddes Repert.*, 61: 211-273.
- Palmé A.E., Su Q., Palsson S., Lascoux M. 2004. Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. *Mol. Ecol.*, 13: 167-178.
- Ralska-Jasiewiczowa M., Wacnik A., Mamakowa K., Nalepka D. 2004. *Betula* L. – Birch. [W:] Ralska-Jasiewiczowa M., Latałowa M., Wasylkowa K., Tobolski K., Madeyska E., Wright H. E., Turner C. (red.), Late Glacial and Holocene history of vegetation in Poland based on isopollen maps. *Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków*, 57-68.
- Rhymer J. M., Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst.*, 27: 83-109.
- Rieseberg L.H., Carney S.E. 1998. Plant hybridization. *New Phytol.*, 140: 599-624.
- Rieseberg L.H., Soltis D.E. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trend. Plant.*, 5: 65-84.
- Rieseberg L.H., Whitton J., Linder C.R. 1996. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. *Acta Bot. Neerl.*, 45: 243-262.
- Ryynänen L., Ryynänen M. 1986. Propagation of adult curly-birch succeeds with tissue culture. *Silva Fenn* 20: 139-147.
- Saarela J.M., Sokoloff P.C., Gillespie L.J., Consaul L.L., Bull R.D. 2013. DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (*rbcL* + *matK*) for 490 Vascular Plant Species. *PLoS ONE* 8(10): e77982. doi:10.1371/journal.pone.0077982.
- Schenk M.F., Thienpont C.N., Koopman W.J.M., Gilissen L. J., Smulders M.J.M. 2008. Phylogenetic relationships in *Betula* (Betulaceae) based on AFLP markers. *Tree Genet. Genomes*, 4: 911-924.
- Soltis P.S., Soltis D.E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 561-88.

- Staszkiwicz J., Białobrzeska M., Truchanowicz J., Wójcicki J.J. 1993: Variability of *Betula humilis* (Betulaceae) in Poland. 4. Hybrid and introgressive forms. *Fragm. Florist. Geobot. Pol.* 38: 475-488.
- Staszkiwicz J. 2014. *Betula oycoviensis* Besser. [W:] Kaźmierczakowa R., Zarzycki K., Mirek Z. (red.), *Polska Czerwona Księga Roślin*, Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków, 89-90.
- Taper L.J., Grant W.F. 1973. The relationship between chromosome size and DNA content in birch (*Betula*) species. *Caryologia*, 26: 263-273.
- Thomson A.M., Dick C.W., Dayanandan S., Carine M. 2015. A similar phylogeographical structure among sympatric North American birches (*Betula*) is better explained by introgression than by shared biogeographical history. *J. Biogeogr.*, 42: 339-350.
- Thórsson Æ.Th., Pálsson S., Lascoux M., Anamthawat-Jónsson K. 2010. Introgression and phylogeography of *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their triploid hybrids in Iceland inferred from cpDNA haplotype variation. *J. Biogeogr.*, 37: 2098-2110.
- Thórsson Æ.Th., Pálsson S., Sigurgeirsson A., Anamthawat-Jónsson K. 2007. Morphological variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their triploid hybrids in Iceland. *Ann. Bot.*, 99: 1183-1193.
- Thórsson Æ.Th., Salmela E., Anamthawat-Jónsson K. 2001. Morphological, cytogenetic, and molecular evidence for introgressive hybridization in birch. *J. Hered.*, 92: 404-408.
- von Cräutlein M., Korpelainen H., Pietiläinen M., Rikkinen J. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers. Conserv.*, 20: 373-389.
- Wang N., Borrell J.S., Bodles W.J., Kuttapitiya A., Nichols R.A., Buggs R.J. 2014a. Molecular footprints of the Holocene retreat of dwarf birch in Britain. *Mol. Ecol.*, 23: 2771-2782.
- Wang N., Borrell J.S., Buggs R.J.A. 2014b. Is the Atkinson discriminant function a reliable method for distinguishing between *Betula pendula* and *B. pubescens* (Betulaceae)? *J. Bot.*, 2: 90-94.
- Wang N., Thomson M., Bodles W.J., Crawford R.M., Hunt H.V., Featherstone A.W., Pellicer J., Buggs R.J. 2013. Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Mol. Ecol.*, 22: 3098-3111.
- Whitney K.D., Ahern J R., Campbell L.G., Albert L.P., King M.S. 2010. Patterns of hybridization in plants. *Perspect. Plant Ecol.*, 12: 175-182.

12 Różnorodność biologiczna ektomykoryzowych symbiontów topoli włoskiej (*Populus nigra* 'Italica') w środowisku zmienionym antropogenicznie

Magdalena Kulczyk-Skrzeszewska* / Barbara Kieliszewska-Rokicka

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii Środowiska, Katedra Mikologii i Mikoryzy

Al. Ossolińskich 12, 85-093 Bydgoszcz
*email: mkulczyk@ukw.edu.pl

Streszczenie

W pracy zbadano stan symbiozy ektomykoryzowej dojrzałych osobników topoli czarnej *Populus nigra* 'Italica', rosnących w zróżnicowanych warunkach siedliskowych: na stanowiskach wiejskich śródpolnych i przydrożnych oraz stanowiskach miejskich o różnym stopniu oddziaływania ruchu ulicznego. Badania zbiorowisk ektomykoryzowych symbiontów topoli przeprowadzono metodami morfologiczno-anatomicznymi przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (morfotypowanie). Na pięciu badanych stanowiskach topoli wyróżniono łącznie 16 morfotypów ektomykoryz. Stwierdzono istotny wpływ siedliska na proporcję między liczbą żywych i martwych ektomykoryz, a także na zróżnicowanie zbiorowisk ektomykoryzowych symbiontów *P. nigra* 'Italica'.

Słowa kluczowe: ekosystem miejski, ekosystem rolniczy, stresowe czynniki glebowe, mykoryza, morfotypy

12.1. Wstęp

Mykoryzy są to mutualistyczne związki symbiotyczne, występujące między wyspecjalizowanymi grzybami przystosowanymi do życia w glebie i w roślinie a korzeniem (lub innym organem kontaktującym się z podłożem) żywej rośliny. Bliski kontakt komórek partnerów mykoryzowych umożliwia obustronną wymianę substancji odżywczych między rośliną (fytobiontem) i grzybem mykoryzowym (mykobiontem). Mykoryzy są niezbędne dla jednego lub obu partnerów symbiotycznych (Brundrett 2004).

Badania paleontologiczne oraz molekularne dowodzą, że symbioza mykoryzowa rozwinęła się wraz pojawieniem się na Ziemi pierwszych roślin lądowych. Początkowo (ok. 450-500 mln lat temu) – w postaci mykoryzy arbuskularnej, później (ok. 200 mln lat temu), wraz ze wzrostem zawartości materii organicznej, w glebach pierwotnych rozwinęła się ektomykoryza (Cairney 2000). Ponad 90% gatunków roślin lądowych żyje w symbiozie z grzybami mykoryzowymi. Grzyby te są niezbędne dla prawidłowego rozwoju roślin, ponieważ zwiększają ich odporność na patogeny glebowe, czynniki abiotyczne, a także poprawiają dostępność wody i związków mineralnych (głównie fosforu i/lub azotu) roślinie – gospodarzowi. W zamian, grzyby mykoryzowe otrzymują od rośliny organiczne związki węgla (Smith, Read 2008). Grzyby mykoryzowe są szczególnie ważne i niezbędne dla roślin zasiedlających gleby ubogie w dostępne pierwiastki odżywcze, tereny zdegradowane, zanieczyszczone przez przemysł, transport i rolnictwo.

W zależności od sposobu penetracji korzeni przez grzybnię oraz wymiany metabolitów pomiędzy symbiontami, wyróżniono kilka kategorii mykoryzy, z których najpowszechniejsze w środowisku naturalnym to: mykoryza arbuskularna (AM), ektomykoryza (ECM), mykoryza roślin wrzosowatych (ERM) i mykoryza storczyków. Poza wymienionymi kategoriami opisano wiele typów mykoryz specyficznych dla niewielkich grup roślin (Smith, Read 2008). W przypadku AM, grzyb mykoryzowy (gatunki z gromady Glomeromycota) wnika do przestrzeni międzykomórkowych epidermy i kory pierwotnej oraz do wnętrza komórek korzeni drobnych rośliny-gospodarza, tworząc charakterystyczne struktury (grzybnia intramatrykalna, zwoje grzybniowe, wezikule i arbuskule) oraz rozprzestrzenia się w podłożu, tworząc struktury pozakorzeniowe (grzybnia ekstramatrykalna i zarodniki). Ektomykoryzy rozwijają się na najdrobniejszych korzeniach żywiących, charakteryzujących się budową pierwotną i średnicą najczęściej nieprzekraczającą 2 mm. Odnaczają się swoistą morfogenezą, zróżnicowaną w zależności od roślinnego gospodarza i grzybowego partnera. Strzępki grzyba otaczają korzeń rośliny-gospodarza tworząc opilśń, czyli mufkę. Struktura mufki grzybniowej zależy od

symbionta grzybowego i najczęściej jest specyficzna dla rodzaju lub gatunku (Agerer 1987-2002). Strzępki grzybniowe mykobionta wnikają do wnętrza korzenia, penetrują przestwory międzykomórkowe epidermy i kory pierwotnej rośliny-gospodarza, tworząc tzw. sieć Hartiga, natomiast nie kolonizują wnętrza komórek. Od powierzchni mufki w głąb podłoża odchodzą strzępki tworzące sieć grzybni ekstramatrykalnej. Grzyby ektomykoryzowe są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, aczkolwiek nawiązują symbiozę tylko z 3% gatunków roślin naczyniowych, głównie z drzewami leśnymi strefy borealnej i umiarkowanej, należącymi do rodzin: Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Salicaceae oraz lasów tropikalnych – Dipterocarpaceae (Read 1993; Smith, Read 2008). Pod względem systematycznym, grzyby ektomykoryzowe należą głównie do klasy Basidiomycetes: Agaricales, Thelephorales, Russulales, Cantharellales oraz Ascomycetes: Pezizales, Helotiales, które są jednak mniej liczne i słabiej poznane.

Topole mają zdolność tworzenia dwóch typów mykoryzy: ECM i AM. Mechanizmy warunkujące stan mykoryzowy topoli są słabo poznane, a wyniki badań różnych autorów – niejednoznaczne; jednak szereg autorów wskazuje na genotyp topoli jako jeden z czynników istotnie wpływających na pionowe rozmieszczenie korzeni (Barker i in. 2002; Karliński i in. 2010) oraz udział grzybów mykoryzowych w kolonizacji korzeni (Khasa i in. 2002; Gehring i in. 2006; Karliński i in. 2010).

Badania prezentowane w pracy były prowadzone na jednolitym genetycznie materiale roślinnym, jakim jest odmiana hodowlana topoli czarnej *Populus nigra* 'Italica', nazywana też topolą włoską (ang. Lombardy poplar). *P. nigra* 'Italica' powstała prawdopodobnie na przełomie XVII i XVIII wieku w Lombardii we Włoszech, w wyniku spontanicznej mutacji (Białobok 1973). Z uwagi na wyjątkowe walory estetyczne (wąski, kolumnowy pokrój), rozmnożona wegetatywnie przez człowieka, stanowi jednorodny klon męski, a osobniki klonalne rozpowszechniły się w Europie przez Francję i Niemcy. Najprawdopodobniej w drugiej połowie XVIII wieku *P. nigra* 'Italica' dotarła do Polski. Drzewa żeńskie o pokroju topoli włoskiej, rzadziej spotykane na naszych terenach, są mutantami albo mieszańcami topoli włoskiej z topolą czarną (Seneta, Dolatowski 2000). Topola włoska jest sadzona w różnych ekosystemach, także w silnie odkształconych antropogenicznie siedliskach miejskich, przemysłowych i wzdłuż ruchliwych arterii komunikacyjnych. Obserwuje się zamieranie tego popularnego drzewa ozdobnego, szczególnie w miastach, zarówno w Polsce (obserwacje własne), jak i innych krajach (Cousins i in. 2003). Zjawisko zamierania tych drzew może mieć związek ze stanem symbiozy mykoryzowej.

Celem pracy była ocena wpływu warunków środowiska na żywotność i zróżnicowanie zbiorowisk ektomykoryz topoli czarnej *P. nigra* 'Italica' oraz wskazanie

dominujących symbiontów. Grzyby ECM, zdolne do życia w warunkach stresowych, mogą być wykorzystane w programach zasiedlania topolą włoską różnych środowisk, szczególnie tych poddanych antropopresji.

12.2. Teren badań

Badania prowadzono na pięciu stanowiskach dorosłych drzew topoli włoskiej (*P. nigra* 'Italica') w Polsce, reprezentujących zróżnicowane warunki środowiskowe. Dwa miejsca badawcze (1 – Prusinowo 52°12'N, 17°08'E i 2 – Borówiec 52°17'N, 17°02'E) reprezentują tereny wiejskie, zlokalizowane w gminie Kórnik (woj. wielkopolskie). Topole na stanowisku pierwszym rosną wzdłuż drogi przy gruntach ornych, a na stanowisku drugim – rosną w pasie pomiędzy polami a ogrodami. Nie są wyeksponowane na bezpośredni wpływ zanieczyszczeń powietrza, pozostają jedynie pod wpływem działalności rolniczej. Dwa kolejne miejsca badawcze (nr 3 i nr 4), zlokalizowane na terenie Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego (UKW) w Bydgoszczy (53°07'N, 18°00'E), są pod wpływem umiarkowanego ruchu ulicznego. Stanowisko nr 5 również znajduje się w centrum Bydgoszczy na terenie UKW, w bezpośrednim sąsiedztwie al. Powstańców Wielkopolskich – ulicy o dużym natężeniu ruchu. Na uwagę zasługuje fakt, że stanowiska badawcze różniły się pod względem struktury podłoża glebowego: na stanowisku nr 1 systemy korzeniowe topoli w połowie znajdują się w obrębie pola uprawnego, gdzie były prowadzone prace agrotechniczne, na stanowiskach nr 3 i 4 systemy korzeniowe drzew są rozprzestrzenione w glebie Ogrodu Botanicznego, gdzie powierzchnia gleby jest wolna, nieutwardzona i nienarażona na ubijanie. Na stanowisku nr 2 gleba jest gliniasta, zbita, trudno przepuszczalna dla wody, a na stanowisku nr 5 podłoże jest kamieniste i również zbite. Z każdego stanowiska wyselekcjonowano po dwa dorosłe (70-80-letnie) drzewa *P. nigra* 'Italica'. Wyjątek stanowi stanowisko nr 3, gdzie rośnie pojedyncza topola włoska. Przynależność wybranych drzew do klonu *P. nigra* 'Italica' potwierdziły analizy molekularne przeprowadzone w Plant Research International, Wageningen UR Plant Breeding w Holandii.

12.3. Materiały i metody

12.3.1. Pobieranie prób glebowo-korzeniowych

Próby glebowo-korzeniowe pobierano wiosną i jesienią w 2008 i 2009 roku, kopiąc przy użyciu łopaty na głębokość 20 cm (powierzchnia próby 15×15 cm). Pobrano po 5 losowych prób spod każdego drzewa, w odległości około 1,5 m od podstawy pnia topoli. Do czasu analizy, próby były przechowywane w foliowych woreczkach w temperaturze -10°C.

12.3.2. Analiza chemiczna gleby

Próby glebowe wysuszone i przesiane przez sito (\emptyset oczek = 2 mm) poddano analizie na zawartość przyswajalnych form makro- i mikrośladników (C_{og} , N_{og} , P, K, Ca, Mg, S-SO₄, Cl, Na, Pb), a także kwasowość i przewodność elektryczną gleb w certyfikowanym laboratorium w Katedrze Nawożenia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

12.3.3. Badania ilościowe i jakościowe ektomykoryz

Reprezentatywne próby korzeni drobnych (100 odcinków o długości ok. 1 cm każdy) obserwowano pod mikroskopem stereoskopowym (Carl Zeiss Stemi 2000-C), przy powiększeniu 6,5-50× z oświetleniem światłowodowym. Żywotność ektomykoryz oceniono na podstawie kryteriów wizualnych (Vogt, Persson 1991). Morfotypy wyróżniono na podstawie cech morfologicznych ektomykoryz, takich jak: kształt i wielkość ektomykoryzy, kolor i struktura powierzchni mufki grzybniowej, cechy morfologiczne i anatomiczne strzępek grzybni ekstramatrykalnej, obecność sznurów grzybniowych (Agerer 1987-2002; Ingleby i in. 1990). Obliczono procentowy udział morfotypu jako stosunek liczby żywych wierzchołków ECM, reprezentujących dany morfotyp – do całkowitej liczby żywych ektomykoryz. Zakładając, że jeden morfotyp oznacza jeden gatunek, obliczono wskaźnik ogólnej różnorodności gatunkowej (Shannon, Weaver 1949).

12.3.4. Analizy statystyczne

W celu opracowania statystycznego otrzymanych wyników badań, stosowano analizę wariancji ANOVA oraz test Tukeya (rozsądnej istotnej różnicy). Do analiz statystycznych dane procentowe standaryzowano. Standaryzacje i analizy staty-

styczne wykonano przy pomocy programu komputerowego STATISTICA [Stat-Soft, Inc. (2011)] data analysis software system, wersja 10, www.statsoft.com.

12.4. Wyniki

12.4.1. Analiza właściwości chemicznych gleb

Analiza wariancji ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy stanowiskami badawczymi pod względem zawartości wybranych makro- i mikroprzebiegów, pH oraz przewodności elektrycznej (Tab. 12.1). Czynnikiem najbardziej różnicującym stanowiska badawcze była zawartość ołowiu, stosunek węgla do azotu i stężenie chlorków.

Tabela 12.1. Charakterystyka gleb stanowisk badawczych

| Cecha | Stanowiska | | | | |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | Prusinowo (1) | Borówiec (2) | Bydgoszcz (3) | Bydgoszcz (4) | Bydgoszcz (5) |
| C _{og.} [%] | 0,10 | 0,45 | 2,10 | 0,45 | 0,90 |
| N _{og.} [%] | 0,10 ^a | 0,16 ^b | 0,36 ^c | 0,27 ^d | 0,23 ^c |
| C/N | 1,06 ^a | 2,81 ^c | 5,83 ^e | 1,67 ^b | 3,91 ^d |
| P [mg 100g ⁻¹] | 5,40 ^{bcd} | 1,40 ^a | 2,90 ^{ab} | 2,80 ^{ab} | 11,60 ^{cd} |
| K [mg 100g ⁻¹] | 14,80 ^a | 18,70 ^{ab} | 34,25 ^{bc} | 27,90 ^{abc} | 61,55 ^{cd} |
| Ca [mg 100g ⁻¹] | 30,95 ^a | 37,75 ^a | 371,45 ^c | 393,40 ^c | 196,25 ^b |
| Mg [mg 100g ⁻¹] | 6,75 ^a | 7,65 ^a | 26,75 ^b | 32,30 ^b | 40,20 ^b |
| S-SO ₄ [mg 100g ⁻¹] | 0,35 ^a | 1,00 ^{ab} | 3,20 ^b | 2,10 ^{ab} | 3,50 ^b |
| Cl [mg 100g ⁻¹] | 2,55 ^d | 4,30 ^c | 1,30 ^b | 1,10 ^a | 2,20 ^c |
| Na [mg 100g ⁻¹] | 1,90 ^b | 1,80 ^b | 1,30 ^a | 2,30 ^b | 3,00 ^b |
| Pb [mg kg ⁻¹] | 4,34 ^a | 7,03 ^b | 13,66 ^c | 14,40 ^c | 20,64 ^d |
| pH [H ₂ O] | 6,80 ^a | 6,60 ^a | 7,43 ^b | 7,54 ^b | 7,57 ^b |
| EC [mS/cm] | 0,10 ^a | 0,11 ^a | 0,31 ^b | 0,28 ^b | 0,39 ^b |

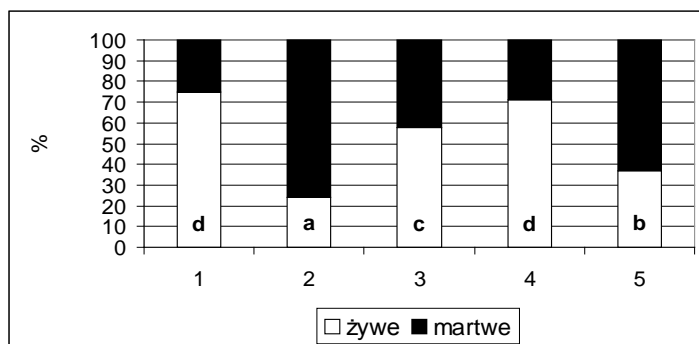
Objaśnienia: 1 – Prusinowo, 2 – Borówiec, 3 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW I), 4 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW II), 5 – Bydgoszcz (Al. Powstańców Wielkopolskich). Wyniki są wartościami średnimi (n=10). Różnymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice w wartościach parametrów glebowych pomiędzy stanowiskami badawczymi (test Tukeya, p<0,05).

Źródło: badania własne.

12.4.2. Badania ilościowe i jakościowe ektomykoryz

12.4.2.1. Procentowy udział żywych ektomykoryz

Analiza wariancji ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy stanowiskami pod względem procentowego udziału żywych i martwych ektomykoryz (Ryc. 12.1). Najmniej żywych ektomykoryz (24%) stwierdzono na stanowisku 2 (Borówiec). Istotnie największy udział żywych ektomykoryz zaobserwowano w Prusinowie oraz na terenie Ogrodu Botanicznego (Bydgoszcz), odpowiednio: 75% i 71%. Wśród drzew rosnących na terenie miejskim, stwierdzono tendencję do obniżania się procentowego udziału żywych ektomykoryz wraz ze wzrostem presji antropogenicznej, jaką stanowi natężenie ruchu komunikacyjnego.



Rycina 12.1. Stosunek liczby żywych do martwych ektomykoryz w próbach korzeni drobnych dorosłych drzew topoli *Populus nigra* 'Italica' (wyrażony w procentach) na poszczególnych stanowiskach badawczych

Objaśnienia: 1 – Prusinowo, 2 – Borówiec, 3 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW I), 4 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW II), 5 – Bydgoszcz (Al. Powstańców Wielkopolskich). Dane są wartościami średnimi z dwóch lat badawczych (2008 i 2009). Różnymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy stanowiskami badawczymi (test Tukeya, $p < 0,05$).

Źródło: badania własne.

12.4.2.2. Różnorodność zbiorowisk ektomykoryzowych

Na podstawie przeprowadzonych badań, wyróżniono łącznie 16 morfotypów ECM *P. nigra* 'Italica', od 6 do 13 morfotypów na stanowisku (Tab. 12.2). Szczegółowa analiza cech morfologiczno-anatomicznych wierzchołków ECM pozwoliła określić przynależność niektórych symbiontów ECM topoli do określonego rodzaju. Sześć morfotypów zaobserwowano na stanowisku wiejskim w Borówcu, z jednym dominującym morfotypem MF16, którego udział w puli żywych mykoryz był równy 67%.

Tabela 12.2. Procentowy udział morfotypów ektomykoryz dorosłych drzew *Populus nigra* 'Italica' w ogólnej liczbie ektomykoryz na poszczególnych stanowiskach badawczych

| Morfotyp | Stanowisko | | | | |
|----------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | Prusinowo (1) | Borówiec (2) | Bydgoszcz (3) | Bydgoszcz (4) | Bydgoszcz (5) |
| MF1 | 22,80 | 25,80 | 35,30 | 21,60 | 1,08 |
| MF2 | 9,80 | 0,83 | 4,07 | 4,93 | 1,89 |
| MF3 | 14,73 | 2,08 | 6,10 | 1,55 | 6,76 |
| MF4 | – | – | 39,30 | 56,30 | 87,30 |
| MF5 | 5,40 | – | 1,02 | 1,70 | 0,81 |
| MF6 | 27,97 | – | 8,81 | 3,94 | 0,27 |
| MF7 | 0,90 | – | – | – | – |
| MF8 | 3,00 | – | 0,68 | 1,27 | 0,54 |
| MF9 | 1,00 | 0,83 | 2,03 | 0,85 | – |
| MF10 | – | – | – | 0,56 | – |
| MF11 | 2,00 | – | – | – | – |
| MF12 | 11,00 | – | – | – | – |
| MF13 | 0,50 | – | 0,34 | 1,97 | – |
| MF14 | 0,40 | – | – | 0,28 | – |
| MF15 | – | 3,33 | 1,70 | 1,83 | 1,35 |
| MF16 | 0,50 | 67,10 | 0,68 | 3,23 | – |

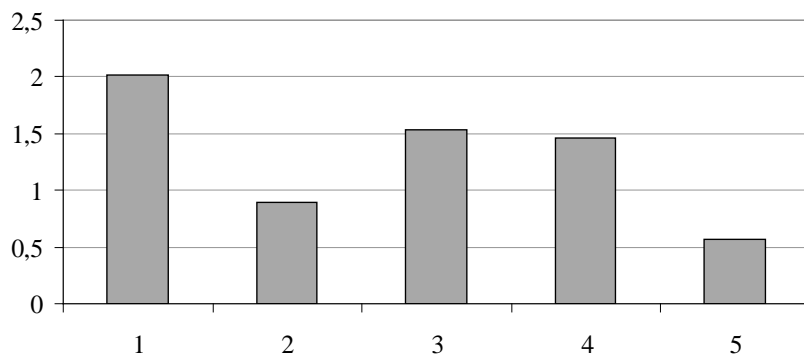
Objaśnienia: 1 – Prusinowo, 2 – Borówiec, 3 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW I), 4 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW II), 5 – Bydgoszcz (Al. Powstańców Wielkopolskich). Dane są wartościami średnimi wyników uzyskanych w sezonach 2008 i 2009 roku.

Źródło: badania własne.

Największe bogactwo morfotypów stwierdzono natomiast w Ogrodzie Botanicznym UKW (Bydgoszcz 4) i w Prusinowie (odpowiednio: 13 i 12 morfotypów). Tylko trzy morfotypy wystąpiły we wszystkich badanych miejscach (choć ich udział procentowy był zróżnicowany): MF1 – podobny do *Hebeloma*: 1-35%, MF2 – podobny do *Thelephora*: 1-10%, MF3 – podobny do *Paxillus*: 1-16%. Topole na poszczególnych stanowiskach badawczych posiadały też specyficzne morfotypy. Na stanowisku nr 1 (Prusinowo) występował morfotyp MF7 reprezentowany przez 1% ektomykoryz, morfotyp MF11 – 2% ektomykoryz i morfotyp MF12 – 11% ektomykoryz. Zbiorowisko ektomykoryz drzew rosnących w Prusinowie charakteryzowało się również istotnie najwyższym udziałem procentowym morfotypu MF3 w stosunku do pozostałych stanowisk. Morfotypem charakterystycznym dla topoli

rosnących na stanowiskach w Bydgoszczy okazał się MF4 (podobny do *Tuber*), którego udział wahał się od 40% do 87%, w zależności od stanowiska. Morfotyp MF10 wystąpił wyłącznie na stanowisku nr 4 w Bydgoszczy, chociaż jego udział w puli mykoryz był niski (0,56%). Generalnie, na wszystkich stanowiskach badawczych dominowało od jednego do trzech morfotypów.

Badania ukazują, że najwyższą różnorodnością biologiczną, określoną na podstawie współczynnika różnorodności gatunkowej Shannona (Ryc. 12.2), charakteryzowało się zbiorowisko ektomykoryz topoli rosnących na stanowisku w Prusinowie i była ona 4-krotnie większa od tej zaobserwowanej w Bydgoszczy wzdłuż ulicy o wysokim natężeniu ruchu (stanowisko nr 5). Najbardziej podobnymi do siebie, pod względem wartości wskaźnika Shannona, były dwa stanowiska bydgoskie (nr 3 i nr 4 w Arboretum UKW) oraz stanowiska nr 2 i nr 5.



Rycina 12.2. Wskaźnik ogólnej różnorodności biologicznej ektomykoryz (indeks Shannona) dla poszczególnych stanowisk badawczych

Objaśnienia: 1 – Prusinowo, 2 – Borówiec, 3 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW I), 4 – Bydgoszcz (Ogród Botaniczny UKW II), 5 – Bydgoszcz (Al. Powstańców Wielkopolskich).

12.5. Dyskusja

Wyniki obecnej pracy wykazały istotny wpływ siedliska na bogactwo i zróżnicowanie zbiorowisk ektomykoryzowych symbiontów *P. nigra* 'Italica', a także na proporcje między liczbą żywych i martwych ektomykoryz. Największą różnorodność symbiontów ektomykoryzowych stwierdzono na jednym z dwóch badanych stanowisk wiejskich, a najniższą – na jednym z trzech stanowisk miejskich. Badania pokazały też znaczące różnice liczby typów morfologicznych ektomykoryz topoli

w obrębie typów siedlisk (miejskie i wiejskie). Wyróżniono trzy morfotypy wspólne dla wszystkich stanowisk oraz morfotypy specyficzne dla poszczególnych siedlisk.

Związki mykoryzowe są zależne od wielu czynników środowiska, do których zalicza się: warunki klimatyczne i glebowe, genotyp i cechy fizjologiczne rośliny-gospodarza oraz właściwości grzybów mykoryzowych. W obecnej pracy czynnik genetyczny nie miał znaczenia, ponieważ przedmiotem badań były drzewa będące jednym klonem topoli czarnej *P. nigra* 'Italica', co zostało potwierdzone przy pomocy badań molekularnych. Środowisko wpływa na mykoryzę bezpośrednio poprzez glebę oraz pośrednio, przez oddziaływanie na symbionta roślinnego, jego aktywność fotosyntetyczną i alokację związków węgla z części nadziemnej do korzeni i mykoryz (Smith, Read 2008). Stanowiska, na których rosły badane topole, istotnie różniły się pod względem właściwości chemicznych gleby (Tab. 12.1), przy czym czynnikami najistotniej różnicującymi były stężenia N, Cl, Ca, K, Pb, stosunek C/N, a także pH i EC (przewodność elektryczna). Podobne wyniki uzyskali Karliński i in. (2013), którzy wykazali, że czynnikami istotnie wpływającymi na stopień kolonizacji korzeni drobnych różnych odmian hodowlanych topoli przez grzyby ektomykoryzowe była zawartość C, N oraz Ca w glebie, a na terenach przemysłowych dodatkowo koncentracja metali ciężkich i wilgotność gleby.

W obecnej pracy na poszczególnych stanowiskach badawczych wyróżniono od 6 do 13 morfotypów ektomykoryzowych, związanych z korzeniami *P. nigra* 'Italica' (Tab. 12.2). Generalnie, na wszystkich stanowiskach badawczych dominował jeden do trzech morfotypów, z jednoczesnym niskim udziałem pozostałych. Liczba morfotypów na poszczególnych stanowiskach, zarówno miejskich, jak i wiejskich, była niższa w porównaniu z wynikami prac innych autorów badających grzyby mykoryzowe towarzyszące topolom. Cripps (2004) stwierdziła obecność owocników ponad 50 gatunków grzybów potencjalnie związanych z *Populus tremuloides*. W Ogrodzie Botanicznym UKW w Bydgoszczy, gdzie zlokalizowane były dwa stanowiska topoli badanych w obecnej pracy, wykazano występowanie owocników 11 gatunków grzybów ektomykoryzowych (Głowska i in. 2013). Jednak ocena zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych, na podstawie występowania owocników naziemnych, może prowadzić do niedoszacowania liczby gatunków, ponieważ nie wszystkie grzyby ektomykoryzowe tworzą owocniki widoczne gołym okiem. Niektóre gatunki grzybów nie tworzą wcale owocników, ale są obecne w glebie i nawiązują symbiozę ektomykoryzową, inne tworzą owocniki niepozorne, trudne do zaobserwowania (tzw. owocniki rozpostarte), produkują owocniki podziemne lub wytwarzają owocniki co kilka lat (Smith, Read 2008). Obecność takich symbiontów ektomykoryzowych w systemach korzeni drobnych drzew można stwierdzić w wyniku morfotypowania ektomykoryz i identyfikacji grzybów w pojedyn-

czych ektomykoryzach z wykorzystaniem metod opartych na analizie DNA (Gardens, Bruns 1993). Badania przeprowadzone w oparciu o połączone metody morfologiczne i molekularne, pozwoliły zidentyfikować 122 gatunki grzybów ektomykoryzowych w próbach korzeniowych pojedynczego drzewa *Populus tremula*, rosnącego w lesie mieszanym w Estonii (Bahram i in. 2011).

W obecnej pracy badane były dwa typy ekosystemów pozostających pod wpływem działalności człowieka: ekosystem miejski i ekosystem rolniczy. Badania dowodzą, że ekosystemy miejskie charakteryzują się mniejszym bogactwem gatunków grzybów naziemnych i mniejszą obfitością owocników w stosunku do obszarów pozamiejskich (Ławrynowicz 1982). Czynniki stresowe środowiska mogą istotnie wpływać na kompozycję zbiorowisk grzybów glebowych oraz obniżyć zdolność grzybów ektomykoryzowych do kolonizacji korzeni drzew (Newbound i in. 2010). W drzewostanach sosnowych, rosnących w silnie zanieczyszczonym środowisku, a mianowicie w pobliżu huty miedzi w Głogowie, stwierdzono istotnie niższe zróżnicowanie gatunkowe grzybów ektomykoryzowych i niższą obfitość owocników w porównaniu do drzewostanów kontrolnych (Rudawska i in. 2011). Na skład i biomasę zbiorowisk grzybów i bakterii glebowych wpływa bardzo istotnie odczyn gleby (Bååth, Anderson 2003; Rousk i in. 2009). W obecnej pracy, gleby na stanowiskach miejskich były alkaliczne ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}=7,4-7,6$), a na stanowiskach wiejskich charakteryzowały się odczynem lekko kwaśnym ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}=6,6-6,8$). Jako że różne gatunki grzybów mają różne wymagania w stosunku do pH, odczyn gleby mógł wpływać na strukturę gatunkową zbiorowisk grzybów oraz na dostępność kluczowych pierwiastków dla grzybów i roślin. Wysokie pH gleby oraz wysokie stężenie Ca na stanowiskach miejskich (Tab. 12.1) mogły wpływać na ograniczony dostęp fosforu (Smith, Read 2008). Także usuwanie liści spod drzew na stanowiskach miejskich może ograniczać obieg pierwiastków i wpływać na strukturę zbiorowiska symbiontów ektomykoryzowych (Aponte i in. 2010). W obecnej pracy niski udział żywych ektomykoryz i małe zróżnicowanie zbiorowisk ektomykoryz stwierdzono na stanowisku wiejskim (nr 2 – Borówiec) i stanowisku miejskim (nr 5 – Bydgoszcz wzdłuż ulicy o dużym natężeniu ruchu). Te dwa stanowiska różnią się wartościami pH gleby oraz stężeniem makro- i mikroelementów, a czynnikiem wspólnym dla tych dwóch miejsc jest struktura podłoża (na stanowisku nr 2 – gliniaste, twarde, a na stanowisku nr 5 – kamieniste, z ubitą powierzchnią), w obu miejscach trudno przepuszczalne dla wody. Wyniki sugerują, że właśnie struktura gleby, niedostatek wody i – prawdopodobnie – materii organicznej mogą być główną przeszkodą rozwoju drobnych korzeni drzew, które potencjalnie mogą zostać skolonizowane przez grzyby mykoryzowe oraz rozprzestrzeniania się grzybni mykoryzowej w glebie. Dodatkowo, na stanowisku w Borówcu zarejestrowano pod-

wyższe stężenie chlorków w glebie, a na stanowisku przyulicznym w Bydgoszczy – podwyższone stężenie ołowiu (Tab. 12.1). Działalność człowieka w znacznym stopniu zaburza i utrudnia nawiązywanie funkcjonalnej symbiozy mykoryzowej. Malejące obszary leśne, przy jednoczesnym wzrastającym udziale terenów zurbanizowanych, istotnie redukują naturalne ekosystemy oraz przyczyniają się do zmian klimatycznych mikrośrodków. Degradacja gleby ma bezpośredni wpływ na formowanie mykoryzowych związków symbiotycznych, ograniczając zdolność do tworzenia propagul grzybów, rozprzestrzeniania się grzybni w środowisku oraz nawiązywania symbiozy mykoryzowej. Stwierdzono, że eliminacja ze środowiska roślin-gospodarzy, szczególnie w wyniku pożarów (Dahlberg 2002), czy ekspansywnej wycinki drzew (Visser i in. 1998), powoduje zmniejszenie ilości grzybni ektomykoryzowej w glebie.

Podsumowując, badania pokazały, że warunki glebowe modyfikują związki ektomykoryzowe topoli włoskiej *P. nigra* 'Italica'. Jednak, wyniki badań prowadzonych w warunkach naturalnych dla roślin nie pozwalają poznać bezpośredniego wpływu poszczególnych stresorów na organizmy i ich symbionty mykoryzowe, ponieważ organizmy znajdują się pod wpływem wielu czynników naturalnych i antropogenicznych, a odpowiedź roślin i grzybów mykoryzowych na niekorzystne okoliczności ma charakter addytywny. Dlatego konieczne jest prowadzenie uzupełniających badań w kontrolowanych warunkach doświadczenia.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane ze środków MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego UKW oraz ze środków Unii Europejskiej w ramach Sieci Doskonałości EVOLTREE. Autorki dziękują dr. MJM Rene Smuldersowi z Plant Research International, Wageningen UR Plant Breeding w Holandii za wykonanie analiz molekularnych topoli.

Literatura

- Agerer R. 1987-2002. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Munich.
- Aponte C., García L.V., Marañón T., Gardes M. 2010. Indirect host effect on ectomycorrhizal fungi: Leaf fall and litter quality explain changes in fungal communities on the roots of co-occurring Mediterranean oaks. *Soil. Biol. Biochem.*, 42: 788-796.
- Bååth E., Anderson T.H. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil. Biol. Biochem.*, 35: 955-963.

- Bahram M., Polme S., Kõljalg U., Tedersoo L. 2011. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 75: 313-32.
- Barker S.J., Duplessis S., Tagu D. 2002. The application of genetics approaches for investigations of mycorrhizal symbioses. *Plant Soil*, 244: 85-95.
- Białobok S. (red.). 1973. Topole – *Populus* L. Nasze drzewa leśne. Monografie popularnonaukowe. PWN Poznań-Kórnik.
- Brundrett M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.*, 79: 473-495.
- Cairney J.W.G. 2000. Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften*, 87: 467-475.
- Cousins J.R., Hope D., Gries C., Stutz J.C. 2003. Preliminary assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community structure in a urban ecosystem. *Mycorrhiza*, 13: 319-326.
- Cripps C.L. 2004. Ectomycorrhizal fungi above and below ground in a small, isolated aspen stand: A simple system reveals fungal fruiting strategies and an edge effect., 249-265. [W:] Cripps C.L. (red.), *Fungi in Forest Ecosystems: Systematics, Diversity, and Ecology*. New York Botanical Garden Press.
- Dahlberg A. 2002. Effects of fire on ectomycorrhizal fungi in Fennoscandian boreal forests. *Silvia Fenn.*, 36: 69-80.
- Gardes M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.*, 2: 113-118.
- Gehring C.A., Mueller R.C., Whitham T.G. 2006. Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecol.*, 149: 158-164.
- Głowska N., Frymark-Szymkowiak A., Wilbrandt B. 2013. Grzyby wielkoowocnikowe Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy: wstępne wyniki badań. *Fragm. Florist. Geobot. Polon.*, 20 (2): 371-381.
- Ingleby K., Mason P.A., Last F.T., Fleming L.V. 1990. Identification of ectomycorrhizas. HMSO, London.
- Karliński L., Rudawska M., Kieliszewska-Rokicka B., Leski T. 2010. Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza*, 20: 315-324.
- Karliński L., Rudawska M., Leski T. 2013. The influence of host genotype and soil conditions on ectomycorrhizal community of poplar clones. *Eur. J. Soil. Biol.*, 58: 51-58.
- Khasa P.D., Chakravarty P., Robertson A., Thomas B.R., Dancik B.P. 2002. The mycorrhizal status of selected poplar clones introduced in Alberta. *Biomass Bioenerg.*, 22: 99-104.

- Ławrynowicz M. 1982. Macrofungal flora of Łódź. [W:] Bornkamm R., Lee J.A., Seaward M.R.D. (red.), Urban Ecology, The Second European Ecological Symposium, Berlin 8-12 September, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, 41-47.
- Newbound M., McCarthy M.A., Lebel T. 2010. Fungi and the urban environment: A review. *Landscape Urban Plan.*, 96: 138-145.
- Read D.J. 1993. Appendix C: Mycorrhizas. [W:] Anderson J.M., Ingram J.S.I. (red.) Tropical soil biology and fertility, a handbook of methods. CAB International, Wallingford, UK, 121-131.
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(6): 1589-1596.
- Rudawska M., Leski T., Stasińska M. 2011. Species and functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees on three different sites. *Ann. For. Sci.*, 68: 5-15.
- Seneta W., Dolatowski J. 2000. *Dendrologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Shannon C.E., Weaver W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Smith S.E., Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press, London.
- Visser S., Maynard D., Danielson R.M. 1998. Response of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi to clear-cutting and the application of chipped aspen wood in a mixedwood site in Alberta, Canada, *Appl. Soil. Ecol.*, 7: 257-269.
- Vogt K.A., Persson H. 1991. Measuring growth and development of roots. [W:] Lassoie J.P., Hinckley T.M. (red.), *Techniques and Approaches in Forest Tree Ecophysiology*. CRS Press, 477-501.

Mykoryza kasztanowca białego *Aesculushippocastanum* L. w warunkach miejskich i pozamiejskich

Jolanta Tyburska-Woś* / Barbara Kieliszewska-Rokicka

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Instytut Biologii Środowiska
Katedra Mikologii i Mikoryzy

Al. Ossolińskich 12, 85-093 Bydgoszcz
*e-mail: jola@ukw.edu.pl

Streszczenie

W warunkach miejskich drzewa i grzyby mykoryzowe podlegają negatywnym wpływom czynników środowiska. Rezultatem tego procesu może być ograniczenie rozwoju symbiozy mykoryzowej, która jest istotna dla utrzymania dobrej kondycji drzew. Celem niniejszych badań było porównanie stopnia kolonizacji mykoryzowej korzeni kilkudziesięcioletnich drzew kasztanowca białego, rosnących w zróżnicowanych warunkach środowiska. Próby korzeniowe pobrano w październiku 2012 roku i w maju 2013 roku spod okapu drzew rosnących w Bydgoszczy na stanowiskach o różnym natężeniu antropopresji oraz w Arboretum Kórnickim, reprezentującym środowisko pozamiejskie. W wyniku badań wykazano obecność struktur mykoryzy arbuskularnej (arbuskule, wezikule, zwoje grzybniowe, grzybnia intramatrykalna) w korzeniach kasztanowca na wszystkich stanowiskach badawczych. Stwierdzono wysoką frekwencję i porównywalną obfitość struktur mykoryzowych w korzeniach kasztanowca w warunkach pozamiejskich oraz na stanowiskach miejskich, niezależnie od natężenia czynników stresowych oddziałujących na badane drzewa. Badania udowodniły obecność grzybów arbuskularnych w ekosystemach miejskich, w tym na przyulicznym stanowisku narażonym na działanie stresów związanych z intensywnym ruchem ulicznym oraz pokazały, że na stopień skolonizowania korzeni przez grzyby arbuskularne silniej wpływają czynniki klimatyczne, związane z porą roku, niż czynniki antropogenne.

Słowa kluczowe: grzyby arbuskularne, ekosystem miejski, arboretum, warunki glebowe

13.1. Wstęp

Drzewa są niezwykle ważnym elementem krajobrazu ze względu na duże walory estetyczne i ekologiczne. Stanowią barierę ograniczającą migrację zanieczyszczeń powietrza i gleby, absorbują i magazynują węgiel, są źródłem tlenu, regulują wilgotność i obniżają temperaturę powietrza w upalne dni. Sadzone w mieście, chronią ulice przed przegrzaniem, oddzielają budynki od ruchu ulicznego, zanieczyszczeń i hałasu, wpływają korzystnie na klimat miasta oraz na jakość życia jego mieszkańców. Jednak zanieczyszczenia powietrza i gleby, swoisty mikroklimat obszarów miejskich, niewłaściwa struktura gleby, niedobór pierwiastków odżywczych, prowadzą do zamierania drzew, szczególnie przy głównych ulicach (Dmuchowski i in. 2001; Borowski, Lachota 2006). Zamiera wiele drzew nowo posadzonych. Chociaż w pewnych enklawach miejskich drzewa rosną dobrze, osiągają wiek dojrzały i pomnikowe rozmiary, to średnia długość życia drzew w miastach jest znacząco krótsza, niż drzew tych samych gatunków w warunkach naturalnych (Borowski 2008).

Badania drzew miejskich, prowadzone na świecie i w Polsce, dotyczyły najczęściej parametrów wzrostowych, widocznych uszkodzeń i składu chemicznego liści oraz aktywności fotosyntetycznej (Borowski 2008), a tylko nieliczne obejmowały ocenę korzeni (Nielsen, Rasmusen 1999; Łukasiewicz 2002; Timonen, Kaupinnen 2008; Bainard i in. 2011; Tyburska i in. 2013; Karliński i in. 2014). Tymczasem zrównoważony wzrost i rozwój drzew zależy od funkcjonowania systemów korzeniowych, które w warunkach miejskich często zajmują ograniczoną przestrzeń i mają niedostateczny dostęp do wody i związków mineralnych (Borowski 2008). Prawidłowy wzrost i rozwój roślin jest wspomagany przez mikroorganizmy glebowe, w tym grzyby mykoryzowe.

Mykoryza jest to związek symbiotyczny, niezbędny dla obu partnerów, zachodzący między grzybem (wyspecjalizowanym do życia w glebie i w roślinie) a korzeniem (lub innym organem kontaktującym się z podłożem) żywej rośliny, odpowiedzialnym za przekazywanie pokarmów. Mykoryzy tworzą się w wyspecjalizowanych organach rośliny (najczęściej w najdrobniejszych korzeniach żywiących), gdzie bliski kontakt komórek organizmów symbiotycznych jest wynikiem synchronizacji rozwoju rośliny i grzyba (Brundrett 2004). Grzyby mykoryzowe otrzymują od rośliny węgiel, a w zamian dostarczają pobrane z gleby pokarmy mineralne. Pełnią także inne funkcje, takie jak poprawa struktury gleby poprzez tworzenie agregatów oraz ochrona rośliny przed suszą, patogenami i chemicznymi zanieczyszczeniami. Degradacja warunków środowiska działa niekorzystnie na symbiozę mykoryzową, bezpośrednio przez wpływ czynników glebowych na grzyby mykory-

zowe lub pośrednio przez obniżenie aktywności fotosyntetycznej i dopływu węglowodanów do korzeni (Smith, Read 2008).

Jednym z najpopularniejszych drzew miejskich jest kasztanowiec biały *Aesculus hippocastanum* L., zwany także kasztanowcem zwyczajnym lub pospolitym. Kasztanowiec jest dużym drzewem liściastym, występującym naturalnie na Półwyspie Bałkańskim (Seneta, Dolatowski 2007). Gatunek ten, z uwagi na wyjątkowe walory estetyczne, jest uprawiany w całej Europie, w tym także w Polsce i stanowi stały, niezwykle ważny element krajobrazu zurbanizowanego (Pauleit, Jones 2002; Seneta, Dolatowski 2007). Kasztanowiec rośnie prawie we wszystkich glebach miejskich, w tym zasadowych, na obszarach zabudowanych o zredukowanej wolnej powierzchni wokół drzew (Gilman, Watson 1993). Kasztanowiec zaliczono do drzew mało odpornych na kompleksowe skażenia miejskie (Łukasiewicz 1978). Jest wrażliwy na suszę (Gilman, Watson 1993), natomiast odporny na mróz (Wilczyński, Podlaski 2007).

Badania prowadzone w Polsce i na świecie wskazują, że zbiorowiska grzybów mykoryzowych w warunkach miejskich są uboższe od zbiorowisk grzybów w warunkach naturalnych (Ławrynowicz 1982; Newbound i in. 2010). Stawiane są hipotezy, że ograniczony rozwój grzybów mykoryzowych i mykoryz w systemach korzeni drobnych drzew rosnących w ekosystemach miejskich wpływa niekorzystnie na odżywienie i stosunki wodne drzew, a w konsekwencji przyczynia się do obniżenia ich zdrowotności i żywotności. Wiadomo, że kasztanowiec biały nawiązuje symbiozę mykoryzową z grzybami arbuskularnymi, ale prace badawcze dotyczące stanu mykoryzy tego gatunku były dotąd nieliczne (Bainard i in. 2011; Tyburska i in. 2013; Karliński i in. 2014). Celem niniejszych badań było porównanie stopnia kolonizacji mykoryzowej korzeni kilkudziesięcioletnich drzew kasztanowca białego rosnących w zróżnicowanych warunkach środowiska.

13.2. Teren badań

Badania prowadzono w Bydgoszczy, dużym mieście położonym w północnej Polsce (53°07'N, 18°00'E) oraz w zlokalizowanym 25 km na południe od Poznania Kórniku (52°15'N, 17°04'E). Próby korzeniowe na terenie Bydgoszczy pobierano ze stanowisk o różnym stopniu antropopresji: na stanowisku przyulicznym oraz w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego (UKW). Oba stanowiska badań położone są w centrum miasta. Stanowisko przyuliczne znajduje się w pasie zieleni przyulicznej, otoczonej z czterech stron ciągami komunikacyjnymi. Ogród Botaniczny UKW (powierzchnia 2,33 ha) natomiast sąsiaduje z zabudowa-

niami Uniwersytetu oraz ruchliwymi ulicami. W Ogrodzie rośnie ponad 600 gatunków oraz odmian drzew i krzewów, zarówno krajowych, jak i obcego pochodzenia. W rejonie Kórnika, który jest niewielkim miastem, znajdują się głównie tereny rolnicze. Próby korzeniowe pobierano w należącym do Instytutu Dendrologii PAN Arboretum Kórnickim (powierzchnia 50 ha). Arboretum Kórnickie zalicza się do najstarszych kolekcji drzew i krzewów w Europie. Liczy ok. 3500 gatunków i odmian. Położone jest w granicach miasta Kórnik, w bliskim sąsiedztwie Jeziora Kórnickiego, od którego oddziela je ulica Zamkowa oraz wąski pas zieleni.

13.3. Materiał i metody

13.3.1. Pobór prób

Próby korzeniowe pobrano w październiku 2012 roku oraz w maju 2013 roku z głębokości 0-10 cm w odległości ok. 100 cm od pnia dorosłych drzew kasztanowca białego. Spod każdego drzewa, przy pomocy łopatką, pobrano po trzy próby glebowe oraz trzy próby korzeniowe, które umieszczono w woreczkach plastikowych i do czasu badań przechowywano w temperaturze -18°C.

13.3.2. Badanie kolonizacji mykoryzowej

Korzenie drobne pocięto na fragmenty o długości 1 cm i płukano pod bieżącą wodą na sicie o średnicy oczek równej 2 mm. Losowo wybrane próby o masie około 0,5 g umieszczono w szklanych próbkówkach, zalano 10% roztworem KOH i pozostawiono na 24 godziny. W celu wizualizacji struktur wytwarzanych w korzeniach przez grzyby arbuskularne, próby korzeniowe poddano procedurze barwienia według zmodyfikowanej metody Kormanik i McGraw (1982). Macerację korzeni prowadzono w 10% roztworze KOH w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 1 godzinę, odbarwianie korzeni w roztworze alkalicznej wody utlenionej w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, a barwienie grzybów w korzeniach w 0,05% roztworze błękitu trypanu w temperaturze 90°C przez 6 minut. Wybarwione korzenie przechowywano w roztworze konserwującym (gliceryna-kwas mlekowy-woda, w proporcji 1:1:1). Ocenę kolonizacji mykoryzowej prowadzono na 30 fragmentach korzeni z każdej pobranej próby korzeniowej. Obserwacje prowadzono przy pomocy mikroskopu optycznego Axiostar plus firmy Zeiss przy powiększeniu 100-400×. Dokumentację fotograficzną sporządzono przy pomocy aparatu cyfrowego firmy Canon (model PowerShot G5) oraz kamery cyfrowej (Mikroskopkame-

raAxioCamERc 5s firmy Zeiss). Ocenę stopnia kolonizacji mykoryzowej przeprowadzono metodą Trouvelot i in. (1986). Do obliczenia stopnia kolonizacji mykoryzowej wykorzystany został program komputerowy, MycoCalc (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html>).

W badaniach analizowano następujące parametry: F% – frekwencja mykoryzowa w systemie korzeniowym, M% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym, m% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych, A% – obfitość arbuskul w systemie korzeniowym, a% – obfitość arbuskul w skolonizowanych fragmentach korzeniowych.

13.3.3. Pomiar pH gleby

Odczyn każdej próby glebowej mierzono w wodzie destylowanej i w 1M roztworze KCl, według Bednarek i in. (2004). Analizowano trzy próby glebowe spod każdego drzewa. Odczyn pH gleby mierzono przy pomocy pHmetru PH 25+ firmy Crison.

13.3.4. Pomiar zawartości wody w glebie

Zawartość wody w glebie (%) oznaczano metodą Hausenbuillera (1975). Próby glebowe, o znanej świeżej masie, umieszczano w cieplarni w temperaturze 105°C na 24 godziny. Zawartość wody w glebie (%) obliczano według wzoru: zawartość wody w glebie (%) = (świeża masa próby – sucha masa próby)/sucha masa próby ×100%.

13.3.5. Analiza statystyczna wyników

Analizie statystycznej poddano wartości parametrów kolonizacji mykoryzowej korzeni kasztanowca, pH gleby i zawartość wody w glebie. Test RIR (rozsądnej istotnej różnicy) Tukeya zastosowano w celu zbadania istotnych różnic między stanowiskami badań. Przy pomocy wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), sprawdzono wpływ miejsca badań i terminu badań na wyżej wymienione parametry przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Jednoczynnikową analizę wariancji zastosowano w celu zbadania wpływu miejsca badań na badane parametry w poszczególnych terminach przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Dane procentowe standaryzowano przekształcając je według formuły Bliss (Snedecor i Cochran 1976). W celu określenia zależności pomiędzy kolonizacją mykoryzową a zawartością wody w glebie, obliczono współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie Statistica 9.0 (StartSoft Inc.).

13.4. Wyniki

Korzenie wszystkich badanych drzew kasztanowca białego były skolonizowane przez mykoryzowe grzyby arbuskularne, które wykształciły się w charakterystyczne struktury mykoryzowe (arbuskule, wezikule, zwoje grzybniowe, grzybnia intramatrykalna) na wszystkich stanowiskach badawczych i w obu terminach badań. Test istotności różnic RIR Tukeya wykazał, że badane stanowiska różniły się istotnie pod względem kolonizacji mykoryzowej korzeni kasztanowców oraz pod względem zawartości wody w glebie, natomiast nie różniły się pod względem pH gleb. Wieloczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny statystycznie wpływ stanowiska badawczego oraz terminu badań na frekwencję mykoryzową w systemie korzeniowym (F%), a także istotny statystycznie wpływ stanowiska badawczego na intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym (M%), intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych (m%) i obfitość arbuskul w systemie korzeniowym (A%) (Tab. 13.1.). Jednoczynnikowa analiza wariancji wyników wykazała, że jesienią 2012 roku wartości F%, M%, m%, A%, określające stopień kolonizacji mykoryzowej korzeni kasztanowców, nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy poszczególnymi stanowiskami badawczymi. Wiosną 2013 roku frekwencja mykoryzowa (F%) była istotnie wyższa w Arboretum Kórnickim niż w Ogrodzie Botanicznym w Bydgoszczy. Natomiast frekwencja mykoryzowa (F%) pomiędzy pozostałymi stanowiskami nie różniła się istotnie (Tab. 13.2.). Wartości intensywności kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym (M%), jak i intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych (m%), były istotnie statystycznie wyższe w Arboretum Kórnickim niż na stanowiskach w Bydgoszczy (Tab. 13.2.). Obfitość arbuskul w systemie korzeniowym (A%), zarówno jesienią 2012 roku, jak i wiosną 2013 roku była najniższa w Arboretum Kórnickim (Tab. 13.2.). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic obfitości arbuskul w skolonizowanych fragmentach korzeniowych (a%) pomiędzy poszczególnymi stanowiskami badawczymi w żadnym z badanych terminów (Tab. 13.2.).

Pomiędzy poszczególnymi stanowiskami badawczymi i terminami badań, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odczynie gleb, który był lekko zasadowy (Tab. 13.3.). Zawartość wody w glebie (%) w obu badanych terminach różniła się istotnie statystycznie pomiędzy poszczególnymi stanowiskami badawczymi. Najniższą zawartość wody obserwowano w glebie na stanowisku przyulicznym, natomiast najwyższą – w Arboretum Kórnickim (Tab. 13.3.). Analiza korelacji Pearsona wykazała istotną ujemną korelację pomiędzy zawartością wody w glebie (%) a obfitością arbuskul w systemie korzeniowym (A%) (Tab. 13.4.).

Tabela 13.1. Wyniki analizy wariancji ANOVA parametrów kolonizacji mykoryzowej korzeni kasztanowca białego *A. hypocaustum*

| Rodzaj badania | F% | | M% | | m% | | A% | | a% | |
|-----------------------|------|-------------------|------|-------------------|-------|-------------------|------|-------------------|------|------|
| | F | p | F | P | F | p | F | p | F | P |
| ANOVA wieloczynnikowa | | | | | | | | | | |
| termin | 6,79 | 0,01 ^a | 0,08 | 0,77 | 0,07 | 0,78 | 1,45 | 0,23 | 1,72 | 0,19 |
| miejsce | 4,75 | 0,01 ^a | 9,56 | 0,00 ^a | 10,01 | 0,00 ^a | 7,42 | 0,00 ^a | 0,35 | 0,70 |
| termin × miejsce | 1,00 | 0,37 | 1,63 | 0,21 | 1,854 | 0,17 | 2,35 | 0,11 | 0,53 | 0,59 |
| ANOVA jednoczynnikowa | | | | | | | | | | |
| Jesień 2012 | 1,61 | 0,23 | 2,48 | 0,11 | 2,67 | 0,10 | 4,57 | 0,02 ^a | 0,99 | 0,15 |
| miejsce | | | | | | | | | | |
| Wiosna 2013 | 5,54 | 0,01 ^a | 9,06 | 0,00 ^a | 8,91 | 0,00 ^a | 5,26 | 0,01 ^a | 0,39 | 0,85 |
| miejsce | | | | | | | | | | |

Objaśnienia: ^a – oznacza istotność statystyczną ($p < 0,05$); F% – frekwencja mykoryzowa, M% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym, m% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych, A% – obfitość arbuskul w systemie korzeniowym, a% – obfitość arbuskul w skolonizowanych fragmentach korzeniowych.

Źródło: badania własne.

Tabela 13.2. Kolonizacja mykoryzowa korzeni kasztanowca białego *A. hypocaustum* L. na stanowiskach w Bydgoszczy (stanowisko przyuliczne, Ogród Botaniczny UKW) i w Arboretum Kórnickim

| Termin i miejsce badania | F% | M% | m% | A% | a% |
|--------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Jesień 2012 | | | | | |
| Stanowisko przyuliczne | 73,33 ^a | 1,89 ^a | 2,31 ^a | 2,44 ^b | 0,02 ^a |
| Ogród Botaniczny UKW | 76,85 ^a | 4,07 ^a | 4,57 ^a | 0,69 ^{ab} | 0,00 ^a |
| Arboretum Kórnickie | 91,48 ^a | 5,10 ^a | 5,52 ^a | 0,34 ^a | 0,01 ^a |
| Wiosna 2013 | | | | | |
| Stanowisko przyuliczne | 66,66 ^{ab} | 1,32 ^a | 1,89 ^a | 2,24 ^b | 0,02 ^a |
| Ogród Botaniczny UKW | 56,91 ^a | 2,27 ^a | 3,35 ^a | 2,24 ^b | 0,02 ^a |
| Arboretum Kórnickie | 82,77 ^b | 7,57 ^b | 8,90 ^b | 0,44 ^a | 0,03 ^a |

Objaśnienia: F% – frekwencja mykoryzowa, M% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym, m% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych, A% – obfitość arbuskul w systemie korzeniowym, a% – obfitość arbuskul w skolonizowanych fragmentach korzeniowych. Wyniki są wartościami średnimi ($n=3$). Różnymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice w wartościach kolonizacji mykoryzowej między stanowiskami badawczymi (test Tukeya, $p < 0,05$).

Źródło: badania własne.

Tabela 13.3. Odczyn gleby i zawartość wody w glebie (%) na stanowiskach badawczych jesienią 2012 i wiosną 2013 roku

| Termin i miejsce badania | pH _{H2O} | pH _{KCl} | Zawartość wody (%) |
|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Jesień 2012 | | | |
| Stanowisko przyuliczne | 7,78 ^a | 6,39 ^a | 1,87 ^a |
| Ogród Botaniczny UKW | 7,81 ^a | 6,32 ^a | 9,92 ^b |
| Arboretum Kórnickie | 7,96 ^a | 6,52 ^a | 31,46 ^c |
| Wiosna 2013 | | | |
| Stanowisko przyuliczne | 7,65 ^a | 6,49 ^a | 5,65 ^a |
| Ogród Botaniczny UKW | 7,65 ^a | 7,01 ^a | 13,89 ^b |
| Arboretum Kórnickie | 7,49 ^a | 6,91 ^a | 31,26 ^c |

Objaśnienia: Wyniki są wartościami średnimi (n=3). Różnymi literami oznaczono statystycznie istotne różnice w wartościach parametrów glebowych pomiędzy stanowiskami badawczymi (test Tukeya, p<0,05).

Źródło: badania własne.

Tabela 13.4. Zależność między zawartością wody w glebie na stanowiskach miejskich (Bydgoszcz) i pozamiejskim (Arboretum Kórnickie) a kolonizacją mykoryzową korzeni kasztanowca białego *A. hippocastanum*

| Parametr | Współczynnik korelacji Pearsona | | | | |
|--------------------|---------------------------------|-------|-------|---------------------|-------|
| | F% | M% | m% | A% | a% |
| Zawartość wody (%) | 0,306 | 0,118 | 0,115 | -0,428 ^a | 0,051 |

Objaśnienia: ^a – oznacza istotność statystyczną, p<0,05; F% – frekwencja mykoryzowa, M% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym, m% – intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmentach korzeniowych, A% – obfitość arbuskul w systemie korzeniowym, a% – obfitość arbuskul w skolonizowanych fragmentach korzeniowych.

Źródło: badania własne.

13.5. Dyskusja

Wraz ze wzrastającą świadomością wpływu czynników antropogennych na ekosystemy miejskie i zadrzewienia terenów zurbanizowanych, poszukiwane są sposoby zachowania właściwej kondycji drzew miejskich. Drzewa rosnące w naturalnych warunkach, żyją w stałych związkach symbiotycznych z grzybami mykoryzowymi, które zwiększają tolerancję roślin na stesy abiotyczne i biotyczne. Wyniki badań wskazujące na niższą różnorodność gatunkową grzybów w środowisku miej-

skim, w porównaniu do stanowisk naturalnych (np. Ławrynowicz 1982; Newbound i in. 2010), zwróciły uwagę na możliwy brak odpowiednich symbiontów mykoryzowych w glebach miejskich i konieczność podjęcia ochrony biernej lub czynnej grzybów mykoryzowych. Ochrona czynna grzybów powinna być poprzedzona oceną stanu mykoryzy drzew w ekosystemach miejskich oraz wskazaniem czynników szkodliwych i korzystnych dla rozwoju symbiozy mykoryzowej najważniejszych gatunków drzew rosnących w miastach. Jednym z pierwszych doniesień na temat mykoryzy drzew miejskich była praca Nielsena i Rasmussen (1999), którzy porównali stan ektomykoryz lipy *Tilia cordata* z różnych stanowisk miejskich i leśnych w Danii. Stwierdzili, że lipy rosnące w ekosystemach miejskich i leśnych miały podobny udział procentowy (75%) żywych ektomykoryz w systemach korzeniowych, ale różniły się składem typów morfologicznych ektomykoryz. Obniżanie liczby korzeni ektomykoryzowych oraz malejące zróżnicowanie gatunkowe grzybów tworzących ektomykoryzy, wraz ze wzrostem urbanizacji, stwierdzili Timonen i Kauppinen (2008) u lip *Tilia* sp. oraz Karpati i in. (2011) u dębu *Quercus rubra*.

W USA, na terenie Phoenix – największego miasta stanu Arizona, oraz na otaczającej je pustyni Sonora prowadzono badania nad wpływem sposobu wykorzystywania gleby na stan ilościowy oraz zróżnicowanie populacji grzybów arbuskularnych (Stabler, Martin 2001). Stanowiska badawcze zlokalizowane były w pobliżu ulic, na terenie farm, pól uprawnych, parku otaczającego miasto, prywatnych działek, pastwisk, osiedli mieszkaniowych, pola golfowego, boiska szkolnego oraz nienaruszonych terenów pustynnych. Wykazano, że kolonizacja mykoryzowa korzeni drzew *Parkinsonia microphylla*, *Larrea tridentate*, *Ambrosia deltoidea* oraz liczba zarodników i zróżnicowanie gatunkowe grzybów arbuskularnych były niższe na terenach miejskich niż na stanowiskach pozamiejskich (Stabler, Martin 2001). Bainard i in. (2011) porównali kolonizację mykoryzową 26 gatunków drzew rosnących w warunkach miejskich i pozamiejskich w Kanadzie. Dziesięć gatunków drzew wykazywało istotnie niższą kolonizację korzeni przez grzyby arbuskularne w warunkach miejskich niż w pozamiejskich, a dwa gatunki drzew miały w warunkach miejskich niższy stopień kolonizacji ektomykoryzowej. W przypadku pozostałych gatunków (m.in. kasztanowca białego), stopień kolonizacji mykoryzowej nie różnił się istotnie między stanowiskami miejskimi i pozamiejskimi (Bainard i in. 2011).

Wyniki obecnej pracy pokazały, że środowisko istotnie wpływa na frekwencję i obfitość kolonizacji mykoryzowej kasztanowca, ale duże znaczenie dla stopnia kolonizacji miał termin badań (Tab. 13.1.). Frekwencja mykoryzowa w systemie korzeniowym (F%), intensywność kolonizacji mykoryzowej w systemie korzeniowym (M%), intensywność kolonizacji mykoryzowej w skolonizowanych fragmen-

tach korzeniowych (m%) i obfitość arbuskul w systemie korzeniowym (A%) były istotnie wyższe w środowisku pozamiejskim (Arboretum Kórnickie) niż w Bydgoszczy, ale tylko w terminie wiosennym 2013 roku. Jesienią 2012 roku z kolei jedynie obfitość arbuskul w systemie korzeniowym (A%) była wyższa w Kórniku niż na stanowiskach miejskich w Bydgoszczy. Frekwencja mykoryzowa w korzeniach była niższa niż na stanowisku w Kórniku, jednakże tylko wiosną 2013 roku różnice te były istotne statystycznie (Tab. 13.2.). Wcześniejsze badania przeprowadzone w Bydgoszczy i w Kórniku w maju i październiku 2010 roku wykazały w obu terminach niższą frekwencję mykoryzową w korzeniach kasztanowca na stanowiskach miejskich niż na stanowiskach w Arboretum Kórnickim (Tyburska i in. 2013).

W przeciwieństwie do wyników prezentowanych w pracy, Karliński i in. (2014), badając korzenie kasztanowca białego pobrane w jednym terminie w listopadzie 2009 roku, zaobserwowali niższą kolonizację mykoryzową na stanowiskach pozamiejskich w porównaniu do kolonizacji mykoryzowej kasztanowców rosnących w Poznaniu. Autorzy tej pracy zaznaczyli, że stanowiska pozamiejskie były zlokalizowane na nawożonych obszarach rolniczych, a nawożenie mogło zahamować rozwój mykoryzy. Grzyby mykoryzowe transportują jony makro- i mikroprzewodników z gleby do komórek rośliny, tak więc symbioza mykoryzowa poprawia zaopatrzenie roślin rosnących na glebach ubogich w przyswajalne formy pierwiastków. Z drugiej strony, stężenia fosforu i azotu w glebie i tkankach rośliny wpływają na kolonizację mykoryzową i funkcjonowanie mykoryzy. Niekorzystny wpływ nawożenia na kolonizację mykoryzową korzeni jest dobrze znany (Hepper 1983; Abbott i in. 1984). Badania ostatnich lat pokazały, że istnieje mechanizm, który pozwala roślinie kontrolować funkcjonowanie symbiontów mykoryzowych w zależności od zapotrzebowania na pokarmy mineralne i ich dostępność. Podwyższone stężenia przyswajalnych form fosforu i azotu wywołują zahamowanie rozwoju mykoryzy arbuskularnej. Prawdopodobnie działa w takich wypadkach złożony mechanizm sprzężenia zwrotnego, który promuje lub ogranicza kolonizację mykoryzową w zależności od potrzeb (Nouri i in. 2015). Jeżeli roślina może uzyskać potrzebne pierwiastki mineralne bez pośrednictwa grzybów mykoryzowych, nie inwestuje związków węgla w utrzymanie symbiozy. Przyczyną istotnie niższej frekwencji mykoryzowej korzeni kasztanowców rosnących w Ogrodzie Botanicznym UKW w Bydgoszczy (Tab. 13.2.), w porównaniu do pozostałych stanowisk, mogło być nawożenie rabat pod drzewami, pod którymi posadzono rośliny zielne. Różnice kolonizacji mykoryzowej między terminami badań w obecnej pracy (Tab. 13.1., 13.2.) oraz wcześniejsze wyniki (Tyburska i in. 2013) sugerują, że związane z terminem badań warunki klimatyczne mają duży wpływ na kolonizację korzeni kaszta-

nowca przez mykoryzowe grzyby arbuskularne. Dlatego badania mykoryzy powinny być prowadzone przez kilka sezonów wegetacyjnych.

O funkcjonowaniu mykoryzy arbuskularnej świadczy obecność arbuskul i/lub zwoi grzybni w komórkach korzeni, ponieważ struktury te są miejscem wymiany pokarmów między komórką rośliny a grzybem mykoryzowym. W obecnej pracy odnotowano obecność arbuskul na wszystkich badanych stanowiskach, zarówno jesienią, jak i wiosną. Najniższa obfitość arbuskul w systemie korzeniowym (A%) została odnotowana w Arboretum Kórnickim, a wyższa na obu badanych stanowiskach miejskich. Na rozwój struktur mykoryzy arbuskularnej wpływa też dostępność wody w glebie. Prezentowane w tym miejscu badania wykazały ujemną korelację pomiędzy zawartością wody w glebie (%) a obfitością arbuskul w systemie korzeniowym (Tab. 13.4.). Badania prowadzone w roku 2010 (Tyburska i in. 2013) pokazały arbuskule wiosną tylko w Arboretum Kórnickim, natomiast jesienią arbuskule zaobserwowano tylko na stanowiskach w Bydgoszczy. Karliński i in. (2014) nie odnotowali obecności arbuskul w korzeniach kasztanowca białego na żadnym z badanych stanowisk miejskich i wiejskich (być może ważnym powodem braku tych struktur był późny termin badań (listopad), kiedy opad liści hamuje aktywność fotosyntetyczną i redukuje transport cukrów do korzeni). Obserwowali natomiast wezikule, których obfitość była niższa na stanowisku pozamiejskim niż w mieście.

Podsumowując można stwierdzić, że w każdym z badanych siedlisk występują populacje autochtonicznych grzybów arbuskularnych, które są tolerancyjne na warunki danego środowiska i nawiązują funkcjonującą mykoryzę z kasztanowcem białym. Wyniki sugerują, że czynnik klimatyczny może silniej wpływać na mykoryzę kasztanowca niż stresy antropogenne, szczególnie oddziałujące na drzewa i mikroorganizmy glebowe w środowisku miejskim. Dodatkowe badania, prowadzone w kontrolowanych warunkach mogą dokładniej określić wpływ najważniejszych czynników środowiska na mykoryzę kasztanowca.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane ze środków MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego UKW.

Literatura

- Abbott L.K., Robson A.D., De Boer G. 1984. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *New Phytol.*, 97: 437-446.
- Bainard L.D., Klironomos J.N., Gordon A.M. 2011. The mycorrhizal status and colonization of 26 tree species growing in urban and rural environments. *Mycorrhiza*, 21: 91-96.
- Bednarek R., Dziadowiec H., Pokojska U., Prusinkiewicz Z. 2004. *Badania ekologiczno-gleboznawcze*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Borowski J. 2008. *Wzrost rodzimych gatunków drzew przy ulicach Warszawy*. Wydawnictwa Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Rozprawy Naukowe i Monografie, Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Borowski J., Lachota P. 2006. Dobór drzew i krzewów do warunków przyulicznych Warszawy i miast centralnej Polski – Trees and shrubs suitable for street conditions in Warsaw and other cities in central Poland. *Rocznik Dendrologiczny*, 54: 83-93.
- Brundrett M.C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 79: 473-495.
- Dmuchowski W., Kurczyńska E., Chmielewski W., Badurek M. 2001. *Wzrost i rozwój lipy krymskiej w nasadzeniach przyulicznych*. [W:] R. Siwecki (red.), *Reakcje Biologiczne Drzew na Zanieczyszczenia Przemysłowe*. Wyd. Bogucki, Poznań, 629-635.
- Gilman E.F., Watson D.G. 1993. *Aesculus hippocastanum*. Fact Sheet ST-61, a series of the Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Hepper C.M. 1983. The effect of nitrate and phosphate on the vesicular arbuscular mycorrhizal infection of lettuce. *New Phytol.*, 93: 389-399.
- Hausenbuiller R.L. 1975. *Soil Science Principles and Practice*, 4th printing 1975.
- Karliński L., Jagodziński A.M., Leski T., Butkiewicz P., Brosz M., Rudawska M. 2014. Fine root parameters and mycorrhizal colonization of horse chestnut trees (*Aesculus hippocastanum* L.) in urban and rural environments. *Landscape Urban Plan.*, 127: 154-163.
- Karpati A.S., Handel S.N., Dighton J., Horton T.R. 2011. *Quercus rubra* – associated ectomycorrhizal fungal communities of disturbed urban sites and mature forests. *Mycorrhiza*, 21: 537-547.
- Kormanik P.P., McGraw A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. [W:] Schenck NC (red.), *Methods and principles of mycorrhizal research*. AmerPhytopatholSoc, St. Paul, 37-45.
- Ławrynowicz M. 1982. *Macrofungal flora of Łódź* [W:] Bornkamm R., Lee J.A., Seaward M.R.D. (red.), *Urban Ecology*, 2nd Eur. Ecol. Symp. Berlin 8-12 September, Blackwell Sci. Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne: 41-47.

- Łukasiewicz A. 1978. Rozwój drzew i krzewów na terenie miasta Poznania. PTPN. Wyd. Mat. Przyr. Kom.-Biol.
- Łukasiewicz Sz. 2002. Wpływ wybranych czynników na rozwój kasztanowca białego *Aesculus hippocastanum* L. w warunkach miejskich Poznania. Rozprawa doktorska. Wydział Biologii UAM. Poznań (mskr.).
- Newbound M., McCarthy M.A. & Lebel T. 2010. Fungi and the urban environment: A review. *Landscape Urban Plan.*, 96: 138-145.
- Nielsen J.S., Rasmussen H.N. 1999. Mycorrhizal status and morphotype diversity in *Tiliacordata* – a pilot study of nurseries and urban habitats. *Acta Hort.*, 496: 451-460.
- Nouri E. Breuillin-Sessoms F., Feller U., Reinhardt D. 2015. Correction: Phosphorus and Nitrogen Regulate Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE* 10(4): e0127472. doi:10.1371/journal.pone.0127472.
- Pauleit S., Jones N., Garcia-Martin G., Garcia-Valdecantos J.L., Rivière L.M., Vidal-Beaudet L., Bodson M., Randrup T.B. 2002. Tree establishment practice in towns and cities – results from a European survey. *Urban For Urban Gree.*, 1: 83-96.
- Seneta W., Dolatowski J. 2007. *Dendrologia*, PWN. Warszawa.
- Smith S.E. & Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press, London.
- Snedecor W., Cochran W.G. 1976. *Statistical methods*, 6. wyd. The Iowa State University Press, Ames, str. 327-329.
- Stabler L.B., Martin C.A. & Stutz J.C. 2001. Effect of urban expansion on arbuscular mycorrhizal fungal mediation of landscape tree growth. *J. Arboric.*, 27:193-202.
- Timonen S., Kauppinen P. 2008. Mycorrhizal colonisation patterns of *Tilia* trees in street, nursery and forest habitats in southern Finland. *Urban For Urban Gree.*, 7: 256-276.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. *Measure du taux de mycorrhization VA d' un système radiculaire. Recherche de méthodes d' estimation ayant une signification fonctionnelle.* [W:] Gianinazzi-Pearson V. Gianinazzi S. (red.), *Psychological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, INRA, Paris, France.
- Tyburska J., Frymark-Szymkowiak A., Kulczyk-Skrzeszewska M., Kieliszewska-Rokicka B. 2013. Mycorrhizal status of forest trees grown in urban and rural environments in Poland. *Ecological Questions*, 18: 49-57.
- Wilczyński S., Podlaski R. 2007. The effect of climate on radial growth of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) in the Świętokrzyski National Park in central Poland. *J. Forest Res-JPN.*, 12: 24-33.
- Strona internetowa: <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>.

Ewa Oleńska

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: chwelat@uwb.edu.pl

Streszczenie

Bobowate (*Fabaceae*) stanowią rodzinę roślin, której sukces ewolucyjny w istotnym stopniu ma związek z możliwością tworzenia relacji mutualistycznych z tak zwanymi bakteriami brodawkowymi (ryzobiami). Ryzobia są grupą taksonomiczną tlenowych, Gram-ujemnych pałeczek, złożoną z kilku rodzajów, tj. *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Ensifer* sp. (*Sinorhizobium*) i *Neorhizobium* sp., które powszechnie występują w glebie w postaci wolno żyjących form saprofitycznych. W okresie kwitnienia roślin, ryzobia inicjują rozwój organów symbiozy – brodawek korzeniowych lub łodygowych, zależnie od rodzaju bakterii. Proces brodawkowania jest złożony, specyficzny gatunkowo oraz jest determinowany genetycznie.

W powstałych z tkanek rośliny brodawkach, ryzobia przekształcone w bakteroidy, redukują nieprzyswajalny roślinom azot atmosferyczny do amoniaku, pod wpływem kompleksu enzymatycznego nitrogenazy, składającego się z dinitrogenazy i reduktazy dinitrogenazowej. W wyniku mutualistycznej interakcji, mikrosymbiont zyskuje odpowiednie warunki do wiązania azotu oraz korzysta z produktów fotosyntezy, głównie cukrów, dostarczanych przez makrosymbionta, natomiast roślinny gospodarz uzyskuje w zamian przyswajalne formy azotu, które może wykorzystywać do budowy białek, kwasów nukleinowych, porfiryń, hormonów roślinnych, metabolitów wtórnych, a także związków wysokoenergetycznych.

Słowa kluczowe: azot, brodawki korzeniowe, diazotrofia, kompleks nitrogenazy, znaczenie bobowatych

14.1. Wstęp – systematyka i znaczenie gospodarcze bobowatych

Bobowate (*Fabaceae* Lindl.), dawniej motylkowate, strączkowate (*Papilionaceae* Hall., *Leguminosae* Juss.) stanowią trzecią co do ilości taksonów rodzinę roślin naczyniowych, która obejmuje 600-700 rodzajów i ok. 18 tys. gatunków. Rodzina ta jest szeroko rozpowszechniona na wszystkich kontynentach, występuje powszechnie we wszystkich strefach klimatycznych, stanowiąc komponent zbiorowisk leśnych, krzewiastych, stepowych, sawannowych i pustynnych (Wielka Encyklopedia Przyrody 1998). Flora naczyniowa Polski liczy 108 gatunków roślin zielnych z tej rodziny, a większość to rośliny dziko rosnące w zbiorowiskach naturalnych, półnaturalnych oraz antropogenicznych (Szoszkievicz i in. 2003).

Rośliny bobowate zaliczane są do klasy dwuliściennych (*Dicotyledoneae*), podklasy różowych (*Rosidae*), rzędu bobowców (*Fabales*) i rodziny bobowatych, która obejmuje trzy podrodziny. Najstarszą podrodziną motylkowatych, występującą już w górnej kredzie, są brezylkowate (*Caesalpinioideae*). Przedstawiciele tej podrodziny występują głównie w obszarze tropikalnym i subtropikalnym. Jest to grupa złożona z ok. 2000 gatunków, głównie drzew, krzewów i lian, bardzo rzadko roślin zielnych, skupionych w 150 rodzajach, będących zasadniczym komponentem deszczowych lasów tropikalnych. Cechą charakterystyczną brezylkowatych jest brak wchodzenia w asocjacje mutualistyczne z bakteriami brodawkowymi. Wyjątkiem są przedstawiciele rodzaju *Cassia*, np. *C. tora* i *C. occidentalis*. Brezylkowate składają się z kilku plemion. Rośliny z plemienia *Caesalpinieae* są wykorzystywane w garbarstwie (*Caesalpinia coriaria*), snycerstwie, przemyśle drzewnym (brezyłka ciernista *C. echinata*), są cennym źródłem barwników, np. brezyliny czy hematoksyliny (*Haematoxylum campechianum*) oraz posiadają zastosowanie pokarmowe (rośliny z plemion *Cassieae*, *Cercideae*, *Detarieae* czy *Amherstieae*) (Wielka Encyklopedia Przyrody 1998; Das, Parida 2014).

Podrodzina mimozowate (*Mimosoideae*) obejmuje 3000 gatunków skupionych w 50-60 rodzajach roślin stref gorących, głównie terenów suchych (sawann, suchych lasów i zarośli) oraz lasów deszczowych i górskich. Przedstawiciele tej podrodziny są cennym surowcem gospodarczym. Na przykład, nasiona *Parkia speciosa* z plemienia *Parkieae* są stosowane jako przyprawa, strąki *Leucaena leucocephala* z plemienia *Mimoseae* są spożywane jako warzywo, wykorzystywane jako pasza oraz używane jako zielony nawóz, a *Prosopis juliflora* był i jest obecnie wykorzystywany w krajach latynoamerykańskich do wyrobu pieczywa. Rośliny z rodzaju *Acacia* sp. z plemienia *Acacieae* są cenione ze względu na: drewno, garbniki (*A. mearnsii*,

A. catechu), olejki eteryczne (*A. farnesiana*) i gумы (*A. senegal*), natomiast strąki *Inga feuillei* z plemienia *Ingeae* są uprawiane w Peru dla celów spożywczych (Wielka Encyklopedia Przyrody 1998; de Faria i in. 1989).

Trzecią, najbogatszą w gatunki (ok. 12 tys.) i rodzaje (400-500) podrodziną roślin bobowatych są bobowate (*Papilionoideae*). Przedstawiciele tej podrodziny występują we wszystkich strefach klimatycznych świata. Wiele gatunków należących do tej podrodziny są to rośliny użytkowe i uprawne, o znaczeniu ogólnosiwiatowym (Tab. 14.1) (Podbielkowski 1992; Voisin i in. 2014).

Tabela 14.1. Znaczenie gospodarcze podrodziny bobowatych

| Plemię | Gatunek | Znaczenie gospodarcze |
|---|--|---|
| Swartzieae | <i>Swartzia madagascariensis</i> | ciemnoczerwone drewno do wyrobu mebli, instrumentów muzycznych |
| | <i>Zollernia paraensis</i> | snycerstwo (boazerie), wyrób kul bilaradowych |
| Sophoreae | <i>Myroxylon balsamum</i> var. <i>balsamum</i> | Balsam „Tolu” |
| | <i>Myroxylon balsamum</i> var. <i>pereirae</i> | Balsam „Peru” stosowany w dermatologii, przemyśle perfumeryjnym, utrwalaacz preparatów mikroskopowych |
| Dipteryxae | <i>Dipteryx odorata</i> | aromat tytoniu i tabaki |
| Dalbergieae | <i>Dalbergia variabilis</i> , <i>D. sissoo</i> , <i>D. latifolia</i> | drewno do wyrobu mebli, snycerstwo, stolarstwo artystyczne, budowa łodzi |
| Abreae | <i>Abrus precatorius</i> | ozdoby |
| Tephrosieae | <i>Lonchocarpus utilis</i> , <i>Derris elliptica</i> , <i>Tephrosia vogelii</i> , <i>Mundulea sericea</i> , <i>Milletia ferruginea</i> | insektycydy (obecność izoflawonoidu rotenonu) |
| Robinieae | <i>Robinia pseudoacacia</i> | roślina miododajna |
| Indigofereae | <i>Indigofera tinctoria</i> , <i>I. fruticosa</i> , <i>I. arrecta</i> | indygo – niebieski barwnik używany w tkalnictwie |
| Desmodieae | <i>Desmodium tortuosum</i> | roślina pastewna, zielony nawóz |
| Phaseoleae podplemię Erythrininae | <i>Mucuna deeringiana</i> , <i>M. cochinchinensis</i> , <i>M. utilis</i> | warzywo, pasza, nawóz zielony |
| Phaseoleae podplemię Diocleinae | <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>C. gladiata</i> | warzywo |
| Phaseoleae | <i>Glycine max</i> | uprawna roślina jadalna |

| | | |
|--|--|---|
| podplemię <i>Glycininae</i> | <i>Pueraria lobata</i> | uprawna roślina włóknista |
| <i>Phaseoleae</i> podplemię <i>Clitoriinae</i> | <i>Clitoria ternatea</i> | roślina paszowa |
| <i>Phaseoleae</i> podplemię <i>Phaseolinae</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>Vigna subterranea</i> , <i>Macrotyloma</i> <i>geocarpa</i> | warzywo |
| <i>Aeschynomeneae</i> | <i>Arachis hypogaea</i> | uprawna roślina oleista |
| <i>Galegeae</i> | <i>Astragalus gummifer</i> , <i>A. adscendes</i> | lepki płyn z nacięć kory wykorzystywany jako środek wiążący i emulgator w przemyśle tekstylnym, farmaceutycznym i farbiarskim |
| <i>Hedysareae</i> | <i>Hedysarum coronarium</i> | roślina paszowa |
| <i>Coronilleae</i> | <i>Ornithopus sativus</i> | roślina pastewna |
| | <i>Coronilla varia</i> | roślina lecznicza |
| <i>Loteae</i> | <i>Anthyllis vulneraria</i> | roślina pastewna |
| | <i>Lotus corniculatus</i> | roślina paszowa |
| <i>Vicieae</i> | <i>Vicia sativa</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Lathyrus sp.</i> , <i>Pisum sativum</i> | warzywo, pasza |
| <i>Cicereae</i> | <i>Cicer arietinum</i> | warzywo |
| <i>Trifolieae</i> | <i>Trigonella caerulea</i> , <i>T. foenum-graecum</i> | przyprawa |
| | <i>Medicago sativa</i> , <i>M. varia</i> , <i>M. lupulina</i> | roślina uprawna, paszowa |
| | <i>Trifolium repens</i> , <i>T. hybridum</i> , <i>T. incarnatum</i> , <i>T. alexandrinum</i> , <i>T. resupinatum</i> | roślina uprawna |
| <i>Crotalalarieae</i> | <i>Aspalathus contaminatus</i> | liście do przygotowania herbaty |
| | <i>Crotalaria anagyroides</i> , <i>C. zanzibarica</i> | zielony nawóz |
| <i>Genisteeae</i> | <i>Lupinus luteus</i> , <i>L. angustifolius</i> | roślina uprawiana na paszę |

Źródło: Podbielkowski 1992; Wielka Encyklopedia Przyrody 1998; Voisin i in. 2014

Rośliny należące do rodziny bobowatych są powszechnie wykorzystywane przez człowieka ze względu na liczne walory estetyczne, użytkowe i ekologiczne (Szoszkievicz i in. 2003). Ze względu na dekoracyjność kwiatów, bobowate są powszechnym komponentem mieszanek wysiewanych na trawniki miejskie, nato-

miast z uwagi na morfologię drzewiastych i krzewiastych przedstawicieli tej rodziny, są one elementami parków, zielenców, ogródków przydomowych (np. złotokarp zwyczajny *Laburnum anagyroides*, karagana syberyjska *Caragana arborescens*) oraz żywopłotów obronnych (np. robinia akacja *Robinia pseudoacacia*, gledicja trójcierniowa *Gleditsia triacanthos*).

Wysoka zawartość białka bogatego w aminokwasy egzogenne w nasionach i organach wegetatywnych (zielonka) bobowatych jest kluczowa w wykorzystaniu tych roślin jako pokarm dla człowieka, pasza dla zwierząt gospodarskich, składnik pasz treściwych oraz surowiec stosowany w wielu dziedzinach przemysłu przetwórczego. Średnia zawartość białka w nasionach bobowatych może wynosić 240-440 g kg⁻¹ (Szejnkowska, Szempliński 2012). W kompleksie białkowym tych nasion dominują globuliny (60-75%), z których wiciliny i leguminy o różnym składzie aminokwasów egzogennych (głównie lizyny, tryptofanu, treoniny i aminokwasów siarkowych), determinują wartość pokarmową nasion. Szczególną wartość odżywczą posiadają nasiona soi warzywnej (*Glycine max*), zawierające ok. 40% białka i 20% tłuszczu (Wielka Encyklopedia Przyrody 1998; Szejnkowska, Szempliński 2012). Zielonka z roślin bobowatych może zawierać ok. 150-200 g kg⁻¹ s.m. białka, i jest bogata w witaminę A (Szejnkowska, Szempliński 2012). W Polsce, w celu żywienia ludzi, jest uprawiana: fasola zwykła (*Phaseolus vulgaris*), groch siewny (*Pisum sativum*), bób (*Vicia faba*), soczewica (*Lens culinaris*) czy lędźwian siewny (*Lathyrus sativus*). W żywieniu zwierząt cenne są nasiona: bobiku (*Vicia faba* ssp. *minor*), łubinu (*Lupinus* sp.), wyki siewnej (*Vicia sativa*), grochu polnego (*Pisum arvense*), górne części pędu uprawnych bobowatych, tj. koniczyny białej (*Trifolium repens*), łąkowej (*T. pratense*), białoróżowej (*T. hybridum*), perskiej (*T. resupinatum*) oraz krwistoczerwonej (*T. incarnatum*), lucerny siewnej (*Medicago sativa*) i nerkowatej (*M. lupulina*), seradeli (*Ornithopus sativus*) i komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*) oraz górne części pędu roślin dziko żyjących, np. wyka ptasia (*Vicia cracca*), wyka płotowa (*V. sepium*), komonica błotna (*Lotus uliginosus*), groszek łąkowy (*Lathyrus pratensis*) czy koniczyna drobnogłówkowa (*Trifolium dubium*).

Z ekologicznego punktu widzenia, obecność roślin bobowatych sprzyja ograniczeniu erozji wodnej oraz wietrznej: ich rozbudowany, palowy i głęboki system korzeniowy ułatwia przesiąkanie wód opadowych w głąb profilu glebowego, ograniczając spływy powierzchniowe wody, a duża masa nadziemnej części roślin sprzyja zadarnianiu gleby. Rośliny te przyczyniają się do wzbogacenia gleby w próchnicę, wzrostu jej aktywności biologicznej (w szczególności dżdżownic, pierwotniaków i bakterii) oraz ułatwienia transportu składników mineralnych (głównie fosforu i potasu) do powierzchniowych warstw gleby, z warstw i związków trudno dostępnych

innym roślinom (Voisin i in. 2014). Najistotniejszą korzyścią ekologiczną stosowania bobowatych jest wzbogacanie gleby w przyswajalny azot, co istotnie obniża koszty nawożenia mineralnego oraz redukuje ryzyko towarzyszącego mu zanieczyszczenia środowiska, głównie metalami ciężkimi.

14.2. Azot – występowanie i procesy mikrobiologicznej transformacji pierwiastka

Azot jest pierwiastkiem biogennym, niezbędnym do życia wszystkich organizmów żywych (Paul, Clark 2000). Wchodzi on w skład kluczowych makrocząstecek komórkowych, tj. kwasy nukleinowe, białka, chityna i peptydoglikan, będących składnikami ściany komórkowej mikroorganizmów, oraz jest elementem strukturalnym wielu innych związków organicznych tj. amin, związków amoniowych, aminocukrów, aminoalkoholi, związków porfirynowych (np. chlorofile, hem, hemocyjanina, cytochromy) i makroergicznych, witamin z grupy B, mocznika, kwasu moczowego, alantoiny, hydantoiny, tłuszczowców złożonych, alkaloidów, N-glikozydów, barwników (pterynowych, indolowych, pirolowych, lipofuscynowych), heparyny, chityny, kwasów (sjalowych, hialuronowych, chondroitynosiar-kowych) niektórych hormonów czy antybiotyków (Czerpak 1993).

Na Ziemi, na której całkowita ilość azotu jest szacowana na około $1,6 \times 10^{17}$ t, główne zasoby tego pierwiastka występują w: atmosferze (ok. $3,86 \times 10^{15}$ t), litosferze (ok. $1,64 \times 10^{15}$ t) oraz biosferze (ok. $2,8 \times 10^{11}$ t) (Błaszczuk 2010). Większość azotu (98%) zlokalizowanego w geosferze stanowią formy nieprzyswajalne przez organizmy żywe, natomiast zaledwie 2% tego pierwiastka może zostać przez nie wykorzystana bezpośrednio lub po uprzedniej transformacji. Do takich biodostępnych rezerwarów azotu należą: (1) atmosfera, w której azot gazowy występuje głównie w formie cząsteczkowej (N_2) oraz w związkach z tlenem (N_2O , NO , NO_2), (2) gleba, w której azot występuje w postaci organicznej i nieorganicznej (azotany (NO_3^-), azotyny (NO_2^-) i jony amonowe (NH_4^+) (ok. $3,0 \times 10^{11}$ t) oraz (3) organizmy żywe (ok. 10^{11} t) (Paul i Clark 2000; Krug, Winstanley 2002; Wielbo, Skorupska 2003).

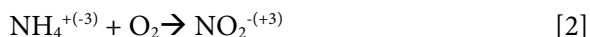
Uwolnienie do środowiska azotu w formie aktywnej chemicznie odbywa się w wyniku przeprowadzanych przez bakterie kilku rodzajów procesów chemicznych, tj. amonifikacja, nitryfikacja, denitryfikacja oraz diazotrofia (Wielbo i Skorupska 2003).

Amonifikacja jest procesem mineralizacji azotu zawartego w związkach organicznych. Polega na degradacji białek, aminokwasów i kwasów nukleinowych na

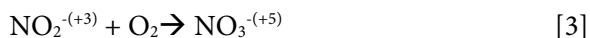
drodze hydrolizy azotu do formy mineralnej – amoniaku, zgodnie z reakcją [1] pod wpływem heterotrofów, przy wykorzystaniu enzymów proteinaz, proteaz, peptydaz czy chitynaz (Paul i Clark 2000).



Na przykład, mineralizacja azotu z chityny polega na uwolnieniu, pod wpływem chitynazy, monomerów acetyloglukozoaminy, która jest rozkładana pod wpływem kinazy, przenoszących na nią grupę fosforanową z ATP do glukozoamino-6-fosforanu ulegającego deaminacji z uwolnieniem NH_4^+ . Proces nityfikacji polega na utlenieniu jonu amonowego do jonu azotynowego lub/i azotanowego zgodnie z reakcjami [2 i 3], gdzie donorem elektronów są: NH_4^+ i NO_2^- , natomiast akceptorem jest O_2 .

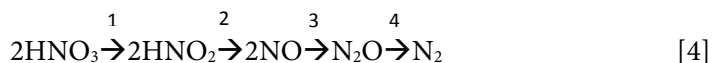


(*Nitrosomonas europaea*, *Nitrospira briensis*, *Nitrosococcus nitrosus*,
N. oceanus, *N. mobinus*, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosovibrio tenuis*)



(*Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrospira gracilis*, *Nitrococcus mobilis*)

Denitryfikacja jest procesem redukcji azotanów lub azotynów do azotu cząsteczkowego pod wpływem bakterii: *Bacillus* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. celcis*, *Achromobacter denitryficans*. Proces ten wymaga warunków beztlenowych i przebiega zgodnie z reakcją:



gdzie: 1 – reduktaza azotanowa (NAR), 2 – reduktaza azotynowa (NIR), 3 – reduktaza tlenku azotu (NOR), 4 – reduktaza podtlenku azotu.

Diazotrofia jest procesem biologicznej redukcji azotu cząsteczkowego. Zdolność wiązania azotu cząsteczkowego wykazują różne mikroorganizmy, np. wolno żyjące w glebie *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* (Kaminski i in. 1998) czy też ryzobia zdolne do asymilacji N_2 wyłącznie podczas symbiozy z roślinami bobowatymi.

14.3. Ryzobia – charakterystyka

Ryzobia są grupą bakterii symbiotycznych zasiedlających tkanki, głównie korzenie roślin bobowatych. Są to Gram-ujemne, urzęsione, tlenowe, drobne – o wymiarach $0,5-0,9 \times 1,2-3,0 \mu\text{m}$ ruchliwe pałeczki, które nie tworzą przetrwalników. Całymi latami mogą występować w glebie w stanie wolnym, nie wiążąc w tym czasie N_2 , preferują obojętne lub lekko zasadowe środowisko, a na podłożach hodowlanych tworzą śluzowate kolonie. Ryzobia należą do klasy α - i β -Proteobacteria (większość to α -Proteobacteria), i rodziny *Rhizobiaceae*, obejmującej rodzaje: *Rhizobium* sp., *Ensifer* sp. (dawniej *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Azorhizobium* sp. i *Neorhizobium* sp. (van Berkum, Eardly 1998; Willems 2006). Ryzobia wykazują specyficzność gospodarza, i tak: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* tworzy asocjacje symbiotyczne z rodzajami bobowatych: *Pisum* sp., *Vicia* sp., *Lathyrus* sp., *Lens* sp.; *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z *Trifolium* sp., *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z *Phaseolus* sp.; *R. etli* z *Phaseolus* sp., *R. tropici* z *Leucaena* sp., *Phaseolus* sp., *Medicago* sp., *Macroptileum* sp.; *Sinorhizobium meliloti* z *Medicago* sp., *Melilotus* sp., *Trigonella* sp.; *Sinorhizobium fredii* z *Glycine* sp., *Vigna* sp.; *Mesorhizobium loti* z *Lotus* sp., *Anthyllis* sp., *Lupinus* sp.; *Bradyrhizobium japonicum* z *Glycine* sp., *Macroptilium* sp., *Vigna* sp.; *Bradyrhizobium elkanii* z *Glycine* sp., *Macroptilium* sp., *Vigna* sp.; *Azorhizobium caulinodans* z *Sesbania rostrata* (Hadri i in. 1998).

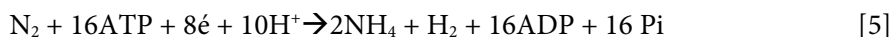
Etymologia słowa ryzobium wywodzi się z języka łacińskiego, gdzie *rhizos* oznacza korzeń, natomiast *bios* – życie, zatem pojęcie to określa organizm żyjący w korzeniu. Większość asocjacji symbiotycznych ryzobiów z bobowatymi ma postać brodawek w systemie korzeniowym roślin bobowatych. Wyjątkiem jest interakcja z *Azorhizobium*, który indukuje rozwój brodawek łodygowych. Brodawki powstają zaledwie u 23% gatunków podrodziny *Ceasalpinioideae*, natomiast u *Mimosoideae* i *Papilionoideae* odpowiednio 90 i 97% gatunków (de Faria i in. 1989).

14.4. Symbiotyczne przyswajanie azotu cząsteczkowego

Biologiczna transformacja wolnego azotu atmosferycznego (N_2) w przyswajalne jony amonowe (NH_4^+) jest procesem wysoce energochłonnym (Ramos, Bisseling 2004; Geetanjali 2007). Cząsteczka azotu, z powodu obecności potrójnego wiązania kowalencyjnego pomiędzy dwoma atomami tego pierwiastka, jest bardzo trwała

i nieaktywna chemicznie. Azot dwuatomowy dysocjuje w bardzo wysokich temperaturach, ok. 3000°C i przy normalnym ciśnieniu. Energia trzech kowalencyjnych wiązań występujących w cząsteczce azotu wynosi odpowiednio: N-N 37 000 cal/mol, N=N 100 000 cal/mol, N≡N 224 500 cal/mol. Do rozerwania pierwszego, najsilniejszego wiązania w cząsteczce azotu musi być zużyta energia, ok. 124 500 cal/mol. Obniżenie energii aktywacji i redukcja azotu cząsteczkowego odbywa się u diazotrofów, w tym u ryzobiów przy udziale enzymatycznego kompleksu dinitrogenazy zgodnie z reakcją [5] (Thorneley, Lowe 1996; Vance 1998).

MgH



Kompleks enzymu składa się z dwóch białek: komponentu I – dinitrogenazy, białka molibdenowo-żelazowego (MoFe) oraz komponentu II – reduktazy dinitrogenazowej, białka żelazowego (Fe). Białko MoFe jest tetramerem ($\alpha_2\beta_2$) o masie cząsteczkowej 220 kD, gdzie podjednostka α ma wielkość 56 kD, natomiast β 60 kD (Hu, Ribbe 2014). Jedna cząsteczka białka MoFe zawiera 2 atomy Mo i 24-32 atomy Fe i S. Komponent I zawiera 4 klaster [4Fe-4S] oraz dwa klaster [MoFe⁶S⁸], stanowiące kofaktor MoFe i miejsce katalityczne redukcji N₂. Rolą białka MoFe jest transfer elektronów do N₂ i H⁺ (Kaminski 1998; Vance 1998). Komponent II jest homodimerem o masie cząsteczkowej 60-64 kD, zawierającym cztery atomy żelaza i siarki, tworzących pojedynczy klaster [4Fe-4S]. Białko Fe posiada dwa miejsca wiążące ATP. Gdy ATP przyłącza się do białka Fe, następuje zredukowanie klasteru [4Fe-4S], umożliwiając białku Fe przekazanie elektronów do białka MoFe. Dinitrogenaza w obecności donora elektronów (i protonów) redukuje N₂ do NH₃, po czym jest regenerowana do postaci zredukowanej przez reduktazę dinitrogenazową (Heridge i in. 2008). Miejszem przyswajania azotu cząsteczkowego w asocjacji bobowatych z ryzobiami jest wyspecjalizowany organ symbiozy o złożonej strukturze anatomicznej i cytologicznej – brodawka (Sujkowska 2009).

14.5. Typy brodawek

Generalnie u roślin bobowatych wyróżnia się dwa typy brodawek, w zależności od kształtu, aktywności merystematycznej oraz formy transportu zredukowanego azotu: nieograniczone (niezdeteminowane) i ograniczone (zdeterminowane) (Hadri i in. 1998; Łotocka 2008). Brodawki typu niezdeteminowanego, obecne m.in. u *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, czy *Trifolium* sp. charakteryzują się stałym

podziałem komórek merystematycznych, w wyniku czego następuje wzrost liczby komórek i całej brodawki, a struktury te zyskują wydłużony, cylindryczny kształt; transportują związany N_2 w postaci amidów (pochodne aminokwasów). W brodawkach tego typu występuje gradient dojrzałości komórek od merystemu obecnego na szczycie brodawki, do starzejącej się tkanki bakteroidalnej. Dojrzałą brodkę niezdeteminowaną charakteryzuje pięć stref komórek: (1) wierzchołkowa strefa merystematyczna pozbawiona bakterii, (2) strefa infekcyjna z licznymi nićmi infekcyjnymi i bakteriami uwalnianymi do komórek, (3) strefa wiązania azotu o charakterystycznym różowym zabarwieniu, zawierająca leghemoglobinę i bakteroidy w różnych stadiach rozwoju, (4) strefa późnej symbiozy o zmniejszonej aktywności wiązania azotu, oraz (5) strefa obumierania (Sujkowska 2009). Z kolei, zdeterminowany typ brodawek, typowy dla *Glycine max* czy *Phaseolus vulgaris* charakteryzuje się ograniczoną aktywnością merystematyczną do początkowego etapu powstawania brodawki, kulistym kształtem, a formą transportowanego zredukowanego azotu są ureidy (pochodne mocznika). Ten typ brodawki charakteryzuje brak strefowości.

Generalnie, zielne bobowate tworzą brodawki typu zdeterminowanego. Wyjątkiem jest *Lotus* sp., który posiada brodawki sferyczne, a formą transportowanego azotu są amidy, z kolei jednoroczne *Pisum* sp., *Lens* sp. czy *Vicia* sp. tworzą niezdeteminowane, cylindryczne brodawki i transportują azot w postaci ureidów (Vance 1998).

14.6. Strategie życiowe ryzobiów i morfogeneza brodawek

Występowanie brodawek nie zawsze jest związane z obecnością w nich efektywnych ryzobiów. Ryzobia, oprócz mutualizmu, mogą realizować inne strategie życiowe, takie jak: pasożytnictwo, polegający na zdolności infekowania rośliny przy niskiej efektywności asymilacji azotu czy pasożytnictwo (Denison, Kiers 2004). Według Hiltnera (Hartmann i in. 2008), można wyróżnić sześć typów współżycia ryzobiów z roślinami bobowatymi: (1) bakterie nie mogą wnikać do systemu korzeniowego rośliny, gdyż jest ona odporna na infekcję; (2) roślina nie jest tak odporna, aby uniemożliwić wniknięcie bakterii, lecz jest na tyle silna, że niszczy wnikające komórki bakterii; (3) roślina tworzy brodawki korzeniowe po wniknięciu bakterii, które jednak słabo asymilują azot atmosferyczny i ich komórki są stopniowo niszczone przez roślinę; (4) nawiązanie właściwej symbiozy – rozwój bakterii w brodawkach i wiązanie N_2 ; (5) nadmierna zjadliwość bakterii powoduje niszcze-

nie tkanki roślinnej – pasożytnictwo bakterii wobec roślinnego gospodarza; (6) całkowite pasożytnictwo bakterii w roślinie powoduje jej stopniowe zamieranie.

Asocjacje ryzobiów z roślinami motylkowatymi obejmują kilka stadiów: (1) atak rośliny przez bakterie – obrona rośliny do momentu wytworzenia naczyń przewodzących do brodawki; (2) właściwe współżycie, oraz (3) stadium pasożytnictwa – zmniejszony dopływ asymilatów do brodawek, związany ze starzeniem się rośliny, stopniowo zamienia symbiozę w pasożytnictwo.

Mechanizm powstawania brodawek korzeniowych jest determinowany genetycznie (Nandasena i in. 2004) i jest realizowany jako ciąg specyficznych zdarzeń skoordynowanych z genomem mikrosymbionta (Long 2001; Łotocka 2008). Morfogenezę brodawek inicjuje etap rozpoznania partnerów symbiozy, który polega na wzajemnej wymianie sygnałów chemicznych. Roślina wydziela do roztworu glebowego flawonoidy, które specyficznie dla gatunku bakterii, indukują ekspresję ryzobiowych genów brodawkowania (*nod*, *noe*, *nol*), zwanych ogólnie genami *nod* (ang. *nodulation genes*), determinującymi tzw. czynniki Nod odpowiedzialne za brodawkowanie, począwszy od etapu deformacji korzenia, aż do wytworzenia w pełni funkcjonalnej brodawki (Jain, Nainawatee 2002; Han i in. 2010). Czynniki Nod są specyficznymi gatunkowo cząsteczkami sygnałowymi o budowie lipochitoooligosacharydowej, gdzie wspólny wszystkim ryzobiom szkielet, składa się z 3-6 reszt N-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniem β -(1-4)-glikozydowym z przyłączonym, w pozycji C2 nieredukującego końca, łańcuchem acylowym. Innymi czynnikami bakteryjnymi, uczestniczącymi w rozpoznaniu partnera roślinnego, są: egzo- i lipopolisacharyd oraz polisacharyd kapsularny. Gdy specyficzni sobie partnerzy symbiozy rozpoznają się, następuje adsorpcja ryzobiów na powierzchni korzenia, zazwyczaj na szczycie młodych, rosnących, jednokomórkowych włosników korzeniowych. Etap przylegania jest dwufazowy: (1) faza odwracalna, polega na adsorpcji bakterii specyficznych, jak i niespecyficznych wobec gospodarza roślinnego; (2) faza nieodwracalna polega na adsorpcji tylko bakterii specyficznych. Reakcją bakterii na związanie z włosnikiem jest wydzielanie czynnika Nod, który zapoczątkowuje deformację włosnika korzeniowego, spowodowaną nierównomiernym wzrostem ściany komórkowej, w wyniku czego bakterie zostają zamknięte w przestrzeni ograniczonej ścianą komórkową zdeformowanego włosnika, a sam włosnik przyjmuje kształt łaski pasterskiej. Zdolność skręcania się włosników jest uwarunkowana genami wspólnymi *nodABC* (ang. *common nod genes*) oraz genami specyficzności gospodarza *hsn* (ang. *host-specificity nodulation genes*), np. *nodH* (Long 2001).

Następnie ryzobia infekują komórki rośliny gospodarza na szczycie włosnika i jako wynik reakcji obronnej makrosymbionta, powstaje nić infekcyjna, którą

stanowią błona i ściana komórkowa otaczające bakterie. Nic infekcyjna wzrasta wewnątrz włośnika ku jego podstawie, a po połączeniu ściany nici ze ścianą komórkową, dochodzi do jej wzrostu w sąsiadujących warstwach komórek kory w kierunku primordium – zawiązka brodawki. Zawiązek brodawki powstaje z komórek kory pierwotnej korzenia, które dzielą się równolegle w kierunku wzrastającej nici infekcyjnej.

Funkcją nici infekcyjnej jest przetransportowanie bakterii przez korę pierwotną korzenia do primordium i uwolnienie ich do cytoplazmy komórek makrosymbionta. Primordium zwykle lokalizuje się naprzeciw wiązek protoksylemu na terenie kory wewnętrznej (w przypadku brodawek typu niezdeteminowanego) lub kory zewnętrznej korzenia (brodawki typu zdeterminowanego). Komórki primordium, przez które nie przeszły nici infekcyjne, różnicują się w kierunku funkcji merystematycznej. Merystem brodawek typu niezdeteminowanego nie podlega infekcji, stale różnicuje nowe komórki i oddala się od korzenia. W kierunku oddalającego się merystemu rosną nici infekcyjne, które tuż pod nim tworzą strefę penetracji nici. W przypadku brodawek typu zdeterminowanego, merystem podlega infekcji i funkcjonuje bardzo krótko. Ostatecznie, ryzobia uwolnione z nici infekcyjnych do komórek kory pierwotnej korzenia, są otaczane błoną perykobakteroidalną pochodzenia roślinnego, tworząc symbiosomy, w których formy wegetatywne bakterii przekształcają się w formy bakteroidalne, zdolne do wiązania N_2 , a zawiązek brodawki przekształca się w dojrzałą brodawkę korzeniową (Hadri i in. 1998).

14.7. Podsumowanie

Biologiczne wiązanie niedostępnego roślinom a koniecznego do życia azotu, odbywa się przy udziale bakterii brodawkowych na terenie organów symbiozy – brodawek. Asocjacja tych bakterii z roślinami bobowatymi przynosi korzyści nie tylko bezpośrednio obu mutualistycznym partnerom symbiozy (bakterie korzystają ze źródła węgla, zasiedlając specyficzną niszę o obniżonej konkurencji o nutrieny, a rośliny-gospodarze są zaopatrywane w przyswajalne formy biogenne azotu), ale też posiada kluczową rolę w obiegu tego pierwiastka w przyrodzie, co jest nieocenione w gospodarce rolnej oraz funkcjonowaniu ekosystemów lądowych.

Literatura

- Błaszczak M.K. 2010. Mikrobiologia środowisk. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Czerpak R. 1993. Biochemia ogólna Część I. Biochemia strukturalna. Instytut Biologii Filii UW w Białymstoku, Białystok.
- Das A., Parida S.K. 2014. Advances in biotechnological applications in three important food legumes. *Plant Biotechnol. Rep.*, 8: 83-99.
- de Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I., Sutherland J.M. Gunn C.R., Wiersema J.H., Ritchie C.A., Kirkbride J.H. 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytol.*, 111: 607-619.
- Denison R.F., Kiers E.T. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237: 187-193.
- Geetanjali N.G. 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agron. Sustain. Div.*, 27: 59-68.
- Hadri A-E., Spaink H.P., Bisseling T., Brewin N.J. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. [W:] Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.), *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 347-359.
- Han T.X., Tian Ch.F., Wang E.T., Chen W.X. 2010. Associations among rhizobial chromosomal background, *nod* genes, and host plants based on the analysis of symbiosis of indigenous rhizobia and wild legumes native to Xinjiang. *Microb. Ecol.*, 59: 311-323.
- Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312: 7-14.
- Herridge D. F., Peoples M.B., Boddey R.M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311: 1-18.
- Hu Y., Ribbe M.W. 2014. A journey into the active center of nitrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19: 731-736.
- Jain V., Nainawatee H.S. 2002. Plant flavonoids: signals to legume nodulation and soil microorganisms. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 11: 1-10.
- Kaminski P.A. Batut J., Boistard P. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. [W:] Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 431-456.
- Krug E.C. Winstanley D. 2002. The need for comprehensive and consistent treatment of the nitrogen cycle in nitrogen cycling and mass balance studies: I. Terrestrial nitrogen cycle. *Sci. Total. Environ.*, 293: 1-29.
- Long S.R. 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.*, 125: 69-72.

- Łotocka B. 2008. Anatomia rozwojowa i ultrastruktura brodawek korzeniowych o nieograniczonym wzroście i jej specyfika u roślin z plemienia *Genisteeae*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Nandasena K.G., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Yates R.J., Kishinevsky B.D., Howieson J.G. 2004. Symbiotic relationships and root nodule ultrastructure of the pasture legume *Biserrula pelcinus* L. – a new legume in agriculture. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1309-1317.
- Paul E.A., Clark F.E. 2000. Mikrobiologia i biochemia gleb. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
- Podbielkowski Z. 1992. Rośliny użytkowe. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa.
- Ramos J., Bisseling T. 2004. Symbiotic nitrogen fixation. [W:] Amâncio S., Stulen I. Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 99-131.
- Sujkowska M. 2009. Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate-*Rhizobium*. *Wiad. Bot.*, 1/2: 35-53.
- Szwejkowska B., Szempliński W. 2012. Rośliny bobowate (motylkowate). [W:] Szempliński W. (red.), Rośliny rolnicze. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn.
- Szoszkiewicz J., Zbierska J., Dembek R., Szoszkiewicz K., Staniszewski R. 2003. Występowanie oraz znaczenie ekologiczne i rolnicze motylkowatych w zbiorowiskach łąkowych środkowej Polski. Wydawnictwo AR, Poznań.
- Thorneley R.N.F., Lowe D.J. 1996. Nitrogenase: substrate binding and activation. *JBIC*, 1: 576-580.
- van Berkum P., Eardly B.D. 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. [W:] Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.), *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 2-21.
- Vance C.P. 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. [W:] Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P. (red.), *The Rhizobiaceae*, Springer Netherlands, 509-528.
- Voisin A-S., Guéguen J., Huyghe Ch., Jenffroy M-H., Magrini M-B., Meynard J-M., Mougél Ch. Pellerin S., Pelzer E. 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 34: 361-380.
- Wielbo J., Skorupska A. 2003. Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowate. *Post. Mikrobiol.*, 3: 263-283.
- Wielka Encyklopedia Przyrody. Rośliny kwiatowe 1. 1998, Wydawnictwo Muza S. A., Warszawa.
- Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287: 3-14.

Bożena Kiziewicz* / Adam Kamil Trzszczkowski* /
Anna Godlewska* / Elżbieta Muszyńska* / Natalia Rogoz**

* Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Biologii Ogólnej

ul. A. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok
email: bozena.kiziewicz@umb.edu.pl

** Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Biologii Ogólnej – studia doktoranckie
ul. A. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok

Streszczenie

Celem podjętych badań było określenie składu gatunkowego grzybów ze szczególnym uwzględnieniem grzybów, potencjalnie chorobotwórczych dla zwierząt i człowieka, w wodzie czterech fontann (wodotrysków) w centrum Białegostoku.

Badania monitoringowe grzybów prowadzono w latach 2014/2015. W badaniach wykorzystano metodę przynęt z wykorzystaniem nasion gryki i konopi, celofanu oraz skóry węża i ikry karasia pospolitego. W badanych próbkach wody, pobranej z czterech stanowisk w każdym z czterech zbiorników – fontann, stwierdzono łącznie 23 gatunki grzybów, w tym 9 gatunków należało do królestwa grzyby – *Fungi* z klas: *Chytridiomycetes* (1 gatunek), *Monoblepharidiomycetes* (1 gatunek), *Ascomycetes* (6), *Basidiomycetes* (1 gatunek). 13 gatunków były to grzyby z królestwa *Chromista*, przedstawiciele klasy *Oomycetes* oraz mikroorganizmy należące do królestwa *Protozoa* klasy *Plasmodiophoromycetes* (1 gatunek). W przedstawianych w pracy badaniach dominowały mikroorganizmy z klasy *Oomycetes*. Należały do nich takie pospolite gatunki jak: *Saprolegnia ferax* i *S. torulosa*. Częstość występowania dla tych dwóch gatunków wynosiła 17,39%. Podobne zależności stwierdzono dla *Catenophlyctis variabilis* z innej klasy *Chytridiomycetes*, gdzie częstość występowania wynosiła 17,39%. Nieco niższą częstość występowania, wynoszącą 13,04% oraz 8,69% wykazano dla następujących gatunków: *Woronina polycystis*, *Olpidiopsis varians*, *Pythium epigynum* i *P. rostratum* oraz *Achlya orion*. Spośród zidentyfikowanej mikrobioty, do gatunków stanowiących zagrożenie w gospodarce rybackiej, zaliczono: *Achlya orion*, *Saprolegnia ferax*, *S. monoica* i *S. torulosa*. Do potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka grzybów należały: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niveus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum* oraz *Rhodotorula glutinis*.

Słowa kluczowe: monitoring grzybów, zbiorniki wodne, Park Pałacowy Branickich, Białystok

15.1. Wstęp

Woda powierzchniowa jako element biosfery jest miejscem występowania różnorodnych organizmów, w tym także grzybów wodnych. Bogata różnorodność gatunkowa grzybów, obok innych organizmów (m.in. bakterii) jest gwarantem obiegu materii i przepływu energii oraz utrzymania równowagi ekologicznej. Różnorodność i liczebność organizmów ma istotny wpływ na jakość wody. Ilościowe aspekty ekologii grzybów wodnych stanowią jedną z najsłabiej poznanych dziedzin hydromykologii. Badania nad liczebnością grzybów wodnych są bardzo rzadko stosowane. W metodach ilościowych wymaga się ustalenia przynajmniej jednego z następujących parametrów: liczebności zarodników, przetrwalników lub fragmentów grzyba w próbkach wody, liczebności plech wegetatywnych grzyba w podłożu oraz stopnia wykorzystania podłoża przez grzyb (Batko 1975; Müller, Loeffler 1987; Dick 2001). Takie ekosystemy jak, między innymi, fontanny często zlokalizowane w parkach, pełnią funkcję miejsc rekreacji dla ludzi mieszkających w dużych aglomeracjach miejskich. Przebywanie ludzi i zwierząt w otoczeniu wód stanowić może niebezpieczeństwo infekcji grzybiczych wchodzącymi w skład bioaerozoli mieszanych. Skład takich aerozoli mogą stanowić zarówno drobnoustroje saprotroficzne, jak i patogenne. Ta druga grupa mikroorganizmów jest klasyfikowana jako czynniki biologiczne szkodliwe dla zdrowia człowieka (Biedunkiewicz 2009; Kiziewicz 2012).

Ekosystemy wodne posiadają specjalne mechanizmy przeciwdziałania zanieczyszczeniom, do których to mechanizmów należy proces samooczyszczania. Samooczyszczanie wód polega na rozcieńczeniu, sedymentacji, adsorpcji i biodegradacji dopływających zanieczyszczeń. Bardzo ważną rolę w samooczyszczaniu zbiorników wodnych odgrywa biodegradacja. Jednak, aby mogła ona zachodzić intensywnie, musi nastąpić obniżenie stężenia zanieczyszczeń do określonego poziomu. Dopływ substancji toksycznych znacznie spowalnia lub nawet zatrzymuje proces samooczyszczania poprzez stopniowe zatrucie mikroorganizmów biorących udział w rozkładzie materii organicznej (Batko 1975; Alexopoulos i in. 1996). Biodegradacja z kolei polega na rozkładzie, w obecności tlenu rozpuszczonego w wodzie, związków organicznych na składniki prostsze przy udziale bakterii, pierwotniaków, bezkręgowców, a także grzybów.

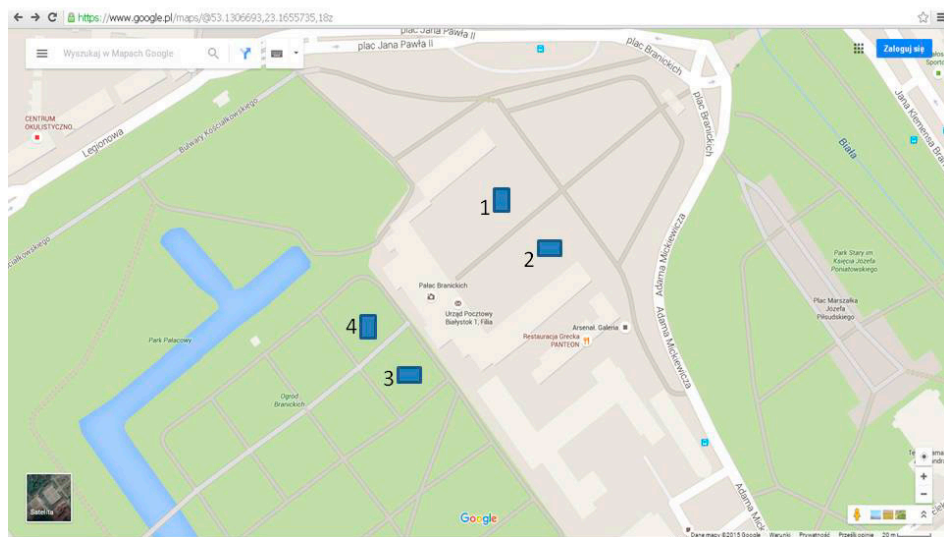
Regularne obserwacje laboratoryjne grzybów wodnych są bardzo ważne w ustalaniu jakości wód śródlądowych. Izolowanie, hodowla, oznaczanie i kontrola określonych gatunków grzybów mogą być przydatne przy identyfikowaniu tych organizmów jako wskaźników czystości lub zanieczyszczenia w ocenie sanitarnej wody. Należy jednocześnie podkreślić, że grzyby wodne mają też szczególnie ważną

rolę w redukcji poziomu zanieczyszczeń w zbiornikach wodnych i procesach samooczyszczania się wód (Lampert, Sommer 1996; Riethmüller i in. 2006).

Celem podjętych badań było określenie składu gatunkowego grzybów ze szczególnym uwzględnieniem grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla zwierząt i człowieka w wodzie czterech fontann Białegostoku, na których wyznaczone zostały po cztery stanowiska badawcze zlokalizowane w centrum miasta.

15.2. Materiał i metody

Badania monitoringowe grzybów prowadzono w latach 2014/2015. Badaniami hydrobiologicznymi objęto cztery czynne wodotryski, gdzie wyznaczone zostały po cztery stanowiska badawcze. Badane fontanny zlokalizowane są w Białymstoku w barokowym Parku Pałacowym, zwanym też Parkiem Pałacowym Branickich (Ryc. 15.1). Fontanny wybudowane zostały w stylu europejskim, który charakteryzuje się tym, że woda tryska ponad zbiornik, a następnie wpada do niego, jednocześnie burząc lustro wody.



Rycina 15.1. Mapa terenu z lokalizacją badanych fontann

Objaśnienia: 1, 2, 3, 4 – rozmieszczenie fontann w Parku Pałacowym Branickich w Białymstoku.

Źródło: badania własne.

Do izolowania oraz określenia liczby gatunków grzybów stosowano metodę przynęt. Wodę pobraną z poszczególnych stanowisk, w sterylnych pojemnikach przewożono do pracowni mykologicznej Zakładu Biologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Następnie ciecz z pojemników przelewano do sterylnych zlewek o pojemności 0,6 dm³ i dodawano odpowiednie przynęty. Wiosną i latem 2014 roku, w ciągu trzech miesięcy przebadano 144 próby, a w 2015 roku, wiosną i latem w ciągu dwóch miesięcy przebadano 96 prób. Stanowiło to łącznie 240 prób. Badania wykonano w czterech powtórzeniach.

Po upływie trzech dni przeprowadzano pierwsze, a po 30 dniach ostatnie badania makro- i mikroskopowe grzybów izolowanych z wody powierzchniowej i wyhodowanych na przynętach. Grzybnie zidentyfikowane mikroskopowo na: nasionach roślin (konopie siewne *Cannabis sativa* L. pozyskano z karmy dla ptaków), przynętach zwierzęcych (skórę węża zaskrońca zwyczajnego *Natrix natrix* L. pozyskano ze sklepu zoologicznego, zaś ikrę karasia pospolitego *Carassius carassius* L. pozyskano w sklepie rybnym) i skrawkach celofanu (pozyskano z Kwiaciarni) wraz z przynętą były następnie przenoszone do wysterylizowanych szalek Petriego wypełnionych wodą destylowaną. Każdą kolonizowaną grzybnią przynętę przeglądano trzykrotnie pod mikroskopem optycznym. Obserwowano strzępki, poszczególne stadia rozwojowe grzybów: stadia rozmnażania bezpłciowego: sporogenezę – zarodnie i zarodniki, zwane zoosporami oraz stadia rozmnażania płciowego: gametogenezę – gametangia żeńskie – lęgnie i gametangia męskie – plemniki. Natomiast w przypadku grzybów pleśniowych i drożdży, obserwowano strzępki, pseudostrzępki, konidiofory i zarodniki konidialne. Na podstawie cech morfologicznych, identyfikowano grzyby do gatunku posługując się kluczami identyfikacyjnymi Dudki (1974), Batki (1975), Fassatovej (1983), Seymoura, Fullera (1987), Dicka (1990, 2001), Zaremby, Borowskiego (2001) oraz Johnsona i in. (2002).

15.3. Wyniki

W badanych próbkach wody pobranej z czterech stanowisk w każdym z czterech zbiorników – fontann w Białymstoku stwierdzono łącznie 23 gatunki grzybów, w tym 9 gatunków należało do królestwa grzyby – *Fungi* z klas: *Chytridiomycetes* (1 gatunek), *Monoblepharidiomycetes* (1 gatunek), *Ascomycetes* (6), *Basidiomycetes* (1 gatunek). 13 gatunków były to grzyby z królestwa *Chromista*, przedstawiciele klasy *Oomycetes* oraz mikroorganizmy należące do królestwa *Protozoa* klasy *Plasmodiophoromycetes* (1 gatunek). W badaniach dominowały mikroorganizmy

z klasy *Oomycetes*. Należały do nich takie pospolite gatunki jak: *Saprolegnia ferax* i *S. torulosa*. Częstość ich występowania wynosiła 17,39%. Podobne zależności stwierdzono dla *Catenophlyctis variabilis* z klasy *Chytridiomycetes*, gdzie częstość występowania wynosiła również 17,39% (Tab. 15.1). Nieco niższą frekwencję, wynoszącą 13,04% oraz 8,69% wykazano dla następujących gatunków: *Woronina polycystis*, *Olpidiopsis varians*, *Pythium epigynum*, *P. rostratum* oraz *Achlya orion*. Spośród zidentyfikowanej mikrobioty, do gatunków stanowiących zagrożenie w gospodarce rybackiej, zaliczono: *Achlya orion*, *Saprolegnia ferax*, *S. monoica* i *S. torulosa*. Do potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka grzybów należały: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niveus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum* oraz *Rhodotorula glutinis*.

Tabela 15.1. Skład gatunkowy grzybów izolowanych z wyznaczonych fontann oraz częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów w czasie pobierania materiału do badań

| Klasyfikacja (królestwo, klasa, rząd, gatunek) | Fontanna Nr I | Fontanna Nr II | Fontanna Nr III | Fontanna Nr IV | Częstość występowania poszcze- gólnych gatunków (%) |
|---|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---|
| <i>CHROMISTA</i> | | | | | |
| <i>OOMYCETES</i> | | | | | |
| <i>Olpidiales</i> | | | | | |
| <i>Olpidiopsis varians</i> Shanor | | | x | x | 8,69 |
| <i>Peronosporales</i> | | | | | |
| <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary | | | | x | 4,35 |
| <i>Pythiales</i> | | | | | |
| <i>Myzocytyum zoophthorum</i> Sparrow | | | x | | 4,35 |
| <i>Pythium epigynum</i> Höhnk | x | | x | | 8,69 |
| <i>P. rostratum</i> E.J. Butler | x | x | | | 8,69 |
| <i>P. scleroteichum</i> Dreschler | | | | x | 4,35 |
| <i>Saprolegniales</i> | | | | | |
| <i>Achlya orion</i> Coker and Couch | x | | x | | 8,69 |
| <i>Saprolegnia anisospora</i> de Bary | | | x | | 4,35 |
| <i>S. ferax</i> (Gruith.) Thur. | x | x | x | x | 17,39 |
| <i>S. litoralis</i> Coker | | | x | | 4,35 |

| | | | | | |
|--|----|---|----|---|-------|
| <i>S. monoica</i> Pringsh | | | x | | 4,35 |
| <i>S. parasitica</i> Coker | | | | x | 4,35 |
| <i>S. torulosa</i> (de Bary) Cejp | x | x | x | x | 17,39 |
| FUNGI | | | | | |
| ASCOMYCETES | | | | | |
| <i>Eurotiales</i> | | | | | |
| <i>Aspergillus niveus</i> Blochwitz | x | | | | 4,35 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. | x | | | | 4,35 |
| <i>Hypocreales</i> | | | | | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. And Swingle | x | | | | 4,35 |
| <i>Pleosporales</i> | | | | | |
| <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keisll | x | | | | 4,35 |
| <i>Saccharomycetales</i> | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout | | x | | | 4,35 |
| <i>Penicillium notatum</i> Westling | | | x | | 4,35 |
| BASIDIOMYCETES | | | | | |
| <i>Sporidiobolales</i> | | | | | |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison | x | | | | 4,35 |
| CHYTRIDIOMYCETES | | | | | |
| <i>Blastocladales</i> | | | | | |
| <i>Catenophlyctis variabilis</i> (Karling) Karling | x | x | x | x | 17,39 |
| MONOBLEPHARIDIOMYCETES | | | | | |
| <i>Monoblepharidiales</i> | | | | | |
| <i>Monoblepharis macrandra</i> (Lagerh.) Woronin | | | x | | 4,35 |
| PROTOZOA | | | | | |
| PLASMODIOPHOROMYCETES | | | | | |
| <i>Plasmodiophorales</i> | | | | | |
| <i>Woronina polycystis</i> Cornu | x | x | x | | 13,04 |
| Całkowita liczba gatunków występujących na poszczególnych stanowiskach: 23 | 12 | 6 | 13 | 7 | |

Źródło: badania własne.

15.4. Dyskusja

Fontanny i podobne urządzenia wodne, instalowane poza budynkami (w parkach, na ulicach) mogą stwarzać zagrożenie dla zdrowia osób przebywających w ich sąsiedztwie lub korzystających z nich. Dzieje się tak jednak przede wszystkim w przypadku niewłaściwego zaprojektowania i utrzymania fontann, a także niezgodnego z przeznaczeniem korzystania z tych obiektów. Zagrożenia dla zdrowia mogą powstawać przede wszystkim w wyniku picia wody z fontanny/zbiornika, ale także wskutek kąpieli lub zabawy w wodzie. Nierzadko decydującą rolę stanowią zakażenia drogą doustną wywołane przeniesieniem mikroorganizmów chorobotwórczych z powłok ciała (poprzez ręce lub trzymane w nich przedmioty) do jamy ustnej. Ryzyko jest mniejsze, gdy woda w fontannie jest dezynfekowana, nie podlega recyrkulacji oraz gdy odpływ wody ze zbiornika następuje w krótkim czasie, maksymalnie w ciągu kilku godzin. W przypadku, gdy zbiornik tego rodzaju wykorzystywany jest jako brodzik (co nie powinno mieć miejsca), do wody mogą przenikać drobnoustroje pochodzące z powłok ciała człowieka lub zwierząt zażywających kąpieli. Woda w fontannach zasadniczo charakteryzuje się niebieską do przezroczystej barwą i mętnością, w związku z czym mylnie i bezzasadnie uważana jest potocznie za wodę czystą, o jakości bezpiecznej dla zdrowia; w rzeczywistości nie jest ona przeznaczona do spożycia ani do kąpieli. Wykorzystywanie fontann z otwartymi zbiornikami jako basenów czy brodzików nie powinno mieć miejsca, ponieważ woda w tego typu urządzeniach nie jest uzdatniana i dezynfekowana, a jej jakość nie podlega systematycznej kontroli. Na czystość mikrobiologiczną wody będącej w obiegu fontann i obiektów tego typu wpływają między innymi: jakość materiałów instalacyjnych, ich podatność na tworzenie biofilmu, obecność osadów, korozja i temperatura wody. Inne zagrożenia mogą wiązać się z fontannami, których elementem jest ogólnodostępny otwarty zbiornik wodny, do którego powraca woda z wyrzuconego pod ciśnieniem strumienia. Pozostając w otwartym zbiorniku, może ona podlegać skażeniu fekalnemu mikroorganizmami obecnymi w odchodach zwierzęcych. W przypadku fontanny z systemem recyrkulacji wody niepoddawanej jednocześnie uzdatnianiu ani dezynfekcji, takie zanieczyszczenia mogą być obecne również w strumieniu wody fontanny.

Fontanny są źródłem aerozolu biologicznego, który może nieść ze sobą zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Również mikroorganizmy, nie będące patogenami człowieka, występujące naturalnie w środowisku, mogą w pewnych warunkach być przyczyną chorób. Dotyczy to głównie osób z osłabionym mechanizmem odpornościowym, osób w podeszłym wieku i niemowląt, chorych na AIDS, pacjentów z ranami oparzeniowymi oraz pacjentów onkologicznych. U osób tych przyczyną

infekcji może być woda wykorzystywana do picia lub kąpieli, zawierająca liczne drobnoustroje, w tym także grzyby. Istotnym zagrożeniem może być występowanie grzybów w zbiornikach wodnych jak te, opisywane w pracy. Ma to duże znaczenie sanitarne, ponieważ niektóre z grzybów, jak np. grzyby drożdżopodobne i pleśniowe, wykazują działanie patogenne w stosunku do człowieka. W wodach zarówno słodkich, jak i słonych wykrywa się gatunki uznane za czynniki etiologiczne grzybic. W wodzie badanych fontann zaobserwowano gatunki takie jak: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niveus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum* oraz *Rhodotorula glutinis*. Z danych literaturowych wynika, że grzyby te, przy obniżonej odporności organizmu, mogą wywołać grzybicę skóry oraz grzybicę narządowe (Kowszyk-Gindifier, Sobiczewski 1986; Zaremba, Borowski 2001; Bennett, Klich 2003; Vogel i in. 2007). Do potencjalnie chorobotwórczych grzybów dla ludzi zaliczono też, oznaczony w badanej wodzie: *Catenophlyctis variabilis* z klasy *Chytridiomycetes* (Karling 1965; Batko 1975). Wymienione gatunki grzybów mogą być związane okresowo lub stale z organizmem człowieka, zajmując różne ontocenozy (Dynowska, Biedunkiewicz 2002; Biedunkiewicz 2009).

Dużą rolę w trwałości aerozolu biologicznego odgrywają zjawiska meteorologiczne, takie jak ciśnienie atmosferyczne, temperatura oraz wilgotność powietrza (Krzysztofik 1992; Bärlocher i in. 2008). Proces dyfuzji w powietrzu ulega znacznemu przyspieszeniu wraz ze wzrostem temperatury i wilgotności powietrza. Fontanny usytuowane głównie w parkach, stwarzają wokół siebie korzystny mikroklimat, poprzez zwiększanie wilgotności powietrza oraz powodując mniejsze wahania temperatury powietrza. Ale jednocześnie przenoszą drobne mikroorganizmy lub rozpraszają je mechanicznie, poprzez montowane w fontannach dysze rozpryskowe (Biedunkiewicz 2009).

Wiele grzybów wodnych prowadzi pasożytniczy tryb życia i powoduje choroby ryb. Czynnikiem etiologicznym mykóz są wykryte w fontannach grzyby należące do rzędu *Saprolegniales*, takie jak: *Saprolegnia ferax*, *S. monoica*, *S. torulosa*, i *Achlya orion* (Batko 1975; Czeczuga i in. 2002, 2004, 2005; Fadaeifard i in. 2011; Godlewska i in. 2012).

Groźnymi pasożytami roślin są, oznaczone w przedstawianych w pracy badaniach gatunki należące do rzędów: *Peronosporales* i *Pythiales* z rodzaju *Pythium* i *Phytophthora*. Dla przykładu, wyizolowane podczas badań z wody gatunki: *Pythium epigynum*, *P. rostratum* *P. scleroteichum* i *Phytophthora infestans* – wykazują właściwości patogenne w stosunku do wielu roślin uprawnych i ozdobnych (Dick 1972; Batko 1975; Czeczuga, Snarska 2001; Kiziewicz 2005).

W prezentowanych badaniach dominowały mikroorganizmy z klasy *Oomyces*. Należały do nich takie pospolite gatunki jak: *Saprolegnia ferax* i *S. torulosa*.

Częstość występowania tych dwóch gatunków wynosiła 17,39%. Podobne zależności stwierdzono dla *Catenophlyctis variabilis* z klasy *Chytridiomycetes*, gdzie częstość występowania wynosiła również 17,39%. Nieco niższą częstość występowania, wynoszącą 13,04% stwierdzono dla *Woronina polycystis*, oraz 8,69% wykazano dla następujących gatunków: *Olpidiopsis varians*, *Pythium epigynum*, *P. rostratum* i *Achlya orion*.

Z punktu widzenia sanitarnego i epidemiologicznego, największe znaczenie mają organizmy wykryte w wodach badanych fontann, takie rodzaje jak: *Achlya*, *Pythium* i *Saprolegnia*, które są patogenami roślin i zwierząt wodnych, oraz stanowiące potencjalnie chorobotwórcze zagrożenie dla zwierząt i człowieka – grzyby drożdżopodobne i pleśniowe z rodzaju: *Aspergillus*, *Candida*, *Catenophlyctis*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Rhodotorula*. Organizmy te, obok bakterii, mogą być wykorzystane jako wskaźniki sanitarne do oceny stanu czystości i zanieczyszczeń wody powierzchniowej.

Od wielu lat wskaźniki sanitarne spełniają ważną rolę ostrzegawczą przed zakażeniami. Nie odnotowano fontanny, w której badana woda byłaby pozbawiona grzybów. Najbardziej niebezpiecznymi fontannami, ze względu na ilość gatunków, okazały się fontanny Nr 1 i Nr 3, gdzie wykryto odpowiednio: 12 i 13 gatunków grzybów. Znacznie mniej, ponieważ o połowę gatunków stwierdzono w pozostałych fontannach, w wodzie fontanny Nr 2: 6 gatunków i Nr 4: 7 gatunków. Natomiast ze względu na gatunki patogenne, największe zagrożenie dla człowieka stanowiła fontanna Nr 1, gdzie wykryte zostały drożdżaki i grzyby pleśniowe z klasy *Ascomycetes* (5 gatunków). Stan taki prawdopodobnie wynika z faktu częstego przebywania ludzi w otoczeniu tych zbiorników w miesiącach wiosenno-letnich i korzystania z nich częściej niż w pozostałych.

Stwierdzone w fontannach grzyby stanowią czynniki szkodliwe dla organizmu, ponieważ mogą powodować pogarszanie stanu sanitarnego powietrza i wody, co w konsekwencji może być przyczyną chorób, zarówno zwierząt, jak i ludzi. Ryzyko to jest mniejsze, gdy woda w fontannie będzie dezynfekowana. Przy projektowaniu tego typu obiektów w przyszłości zaleca się częstą dezynfekcję wody, głównie w okresie wiosenno-letnim, gdyż jest to okres częstego przebywania i korzystania ludzi ze zbiorników wodnych pomimo zakazów.

Literatura

- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. 1996. Introductory mycology. Fourth Edition. John Wiley and Sons. Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 706-708.
- Bärlocher F., Seena S., Wilson K. P., Williams D. D. 2008. Raised water temperature lowers fungal diversity of hyporheic aquatic *Hyphomycetes*. *Freshwat. Biol.*, 53(2): 368-379.
- Batko A. (red). 1975. *Zarys hydrobiologii*. PWN, Warszawa.
- Bennett J.W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(3): 497-516.
- Biedunkiewicz A. 2009. Mikroorganizmy fontann miejskich w monitoringu środowiskowym-zagrozenie epidemiologiczne. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych.*, 41: 163-171.
- Czczuga B., Snarska A. 2001. *Pythium* species in 13 various types of water bodies of N-E Poland. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 70: 7-17.
- Czczuga B., Kiziewicz B., Danilkiewicz Z. 2002. Zoosporic fungi growing on the specimens of certain fish species recently introduced to Polish waters. *Acta Ichthyol. Piscat.*, 32: 117-125.
- Czczuga B., Kiziewicz B., Godlewska A. 2004. Zoosporic fungi growing on eggs of *Coregonus lavaretus holsatus* Thienemann, 1916 from Lake Wdzydze in Kaszuby. *Pol. J. Environ. Stud.*, 13: 355-359.
- Czczuga B., Bartel R., Kiziewicz B., Godlewska A., Muszyńska E. 2005. Zoosporic fungi growing on the eggs of sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) in river water of varied trophicity. *Pol. J. Environ. Stud.*, 14: 297-305.
- Dick M.W. 1972. Morphology and taxonomy of the *Oomycetes*, with special reference to *Saprolegniaceae*, *Leptomitaceae*, and *Pythiaceae*. II. Cytogenetic systems. *New Phytopatol.*, 76(6): 1151-1159.
- Dick M.W. 1990. Key to *Pythium*. College of Estate Management Whiteknights, Reading, UK.
- Dick M.W. 2001. The Peronosporomycetes. [W:] McLaughlin D.J., McLaughlin E.G., Lemke P.A. (red.), *The Mycota VII Part A. Systematics and evolution*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 39-72.
- Dudka I.O. 1974. Wodni hifomiceti Ukraini. *Naukova Dumka*, Kiev.
- Dynowska M., Biedunkiewicz A. 2002. Aktywność enzymatyczna grzybów drożdżopodobnych izolowanych ze ścieków komunalnych. [W:] *Materiały zjazdowe II Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikologicznej nt. Mikroorganizmy w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych*. Toruń-Ciechocinek, 17-18.
- Fadaeifard F., Raissy M., Bahrami H., Rahimi E., Najafipoor A. 2011. Freshwater fungi isolated from eggs and broodstocks with an emphasis on *Saprolegnia* in rainbow trout farms in west Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4(22): 3647-3651.
- Fassatiová O. 1983. Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej, WN-T, Warszawa.

- Godlewska A., Kiziewicz B., Muszyńska E., Mazalska B. 2012. Aquatic fungi and heterotrophic straminipiles from fishponds. *Pol. J. Environ. Stud.*, 21(3): 615-625.
- Johnson T.W. Jr., Seymour R.L., Padgett D.E. 2002. Biology and systematic of the *Saprolegniaceae*. On-line publication: http://dl.uncw.edu/digilib/biology/fungi/taxonomy_and_systematics/Padgett/book/SYSTEMATIC/CHAPTER_31/Family.pdf.
- Karling J.S. 1965. *Catenophlyctis*, a new genus of the *Catenariaceae*. *Am. J. Bot.*, 52 (2): 133-138.
- Kiziewicz B. 2005. Aquatic fungi growing on seeds of plants in various types of water bodies of Podlasie Province. *Pol. J. Environ. Stud.*, 14: 49-55.
- Kiziewicz B. 2012. Frequency and distribution of zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles from river springs. *Pol. J. Environ. Stud.*, 21 (4): 923-927.
- Kowszyk-Gindifier Z., Sobiczewski W. 1986. *Grzybyce i sposoby ich zwalczania*. PZWL, Warszawa.
- Krzysztofik B. 1992. *Mikrobiologia powietrza*. Wyd. Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
- Lampert W., Sommer U. 1996. *Ekologia wód śródlądowych*. PWN, Warszawa.
- Müller E., Loeffler W. 1987. *Zarys mikologii*. PWRiL, Warszawa.
- Riethmüller A., Gründel A., Langer E. 2006. The seasonal occurrence of sewage fungus *Leptomitus lacteus* (Roth) C. Agardh in stagnant and running waters of different water chemistry of Hesse and Thuringia, Germany. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 34: 58-66.
- Seymour R.F., Fuller M.S. 1987. Collection and isolation of water molds (*Saprolegniaceae*) from water and soil. [W:] Fuller M.S., Jaworski A. (red.), *Zoosporic fungi in teaching and research*. Southeastern Publishing. Athens, 125-127.
- Vogel C., Rogerson A., Schatz S., Laubach H., Tallman A., Fell J. 2007. Prevalence of yeast in beach sand at three bathing beaches in South Florida. *Wat. Res.*, 41(9): 1915-1920.
- Zaremba L., Borowski J. 2001. *Mikrobiologia lekarska*. PZWL, Warszawa.

Materiały do bioty porostów Podlasia III. Wieś Janowicze, gmina Juchnowiec Kościelny (Polska północno-wschodnia)

Sylvia Kiercul

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska

ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok
e-mail: sylwiakiercul@op.pl

Streszczenie:

Celem przedstawionych badań jest prezentacja dokumentacji florystycznej, dotyczącej różnorodności gatunkowej bioty porostów w okolicach podlaskiej wsi Janowicze, położonej w gminie Juchnowiec Kościelny. Badania przeprowadzono w czerwcu 2015 roku, na 3 stanowiskach badawczych. Określono w nich zróżnicowanie gatunkowe porostów występujących na korze drzew i krzewów, drewnie (pochodzenia naturalnego i antropogenicznego – niekiedy pomalowanego farbą), mchu, na glebie, gładkich narzutowych, betonie, dachówce eternitowej, papie, a także stalowych elementach ogrodzeń i bram. W pracy opisano 52 gatunki, które reprezentują zróżnicowane morfologicznie formy. Opisane taksony należą do epifitów (32 taksony), epiksyli (20 gatunki), epilitów (14), epigeitów (10) i epibryofitów (1). Odnotowano także 6 taksonów zasiedlających nietypowe wytwory antropogeniczne, tj.: dachówka eternitowa (3 gatunki), papa (3) oraz stalowe elementy ogrodzeń wokół posesji (3). Istotnym zjawiskiem jest także kolonizowanie jednych gatunków porostów przez inne (2 taksony – *Evernia prunastri* i *Pseudevernia furfuracea*).

Słowa kluczowe: porosty, Janowicze, Podlasie, różnorodność

16.1. Wstęp

Dotychczas dla niewielkich miejscowości wiejskich Podlasia bogactwo gatunkowe porostów opisano m.in. w Klewinowie (Kiercul 2013a), Krynickich (Kiercul 2013b), Tryczówce (Kiercul 2014), Hermanówce (Kiercul 2015a) i w Nowosadach (Kiercul 2015b). Celem niniejszej pracy jest przedstawienie obecnych zasobów lichenobioty podlaskiej wsi Janowicze i przyległych do niej okolic. Otrzymane wyniki są dalszym przyczynkiem do poznania słabo jeszcze rozpoznanej bioty porostowej terenów wiejskich na Podlasiu.

16.2. Materiał i metody

Badania na terenie wsi Janowicze i przyległych okolic prowadzono w czerwcu 2015 roku. W terenie dokonano spisu florystycznego lichenobioty, uwzględniając przy tym rodzaj podłoża, który zasiedlają. Wykonano również dokumentację fotograficzną wybranych gatunków, a zbiór materiału do badań laboratoryjnych został ograniczony do niezbędnego minimum. Materiał oznaczano standardowymi metodami morfologiczno-anatomicznymi i testami barwnymi (Nowak, Tobolewski 1975). Okazy zielnikowe zdeponowano w herbarium Katedry Ochrony i Kształtowania Środowiska Politechniki Białostockiej. Nazewnictwo porostów przyjęto za Diederich i in. (2015), za wyjątkiem: *Lecanora albescens* i *L. dispersa* – za Śliwą (2007), a *Melanelixia fuliginosa* i *Melanohalea exasperatula* – za Blanco i in. (2004). Gatunki umieszczone na „Czerwonej Liście Porostów w Polsce” podano za Cieślińskim i in. (2006), zaś taksony objęte ochroną prawną – za Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 09.10.2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej grzybów (Dz. U. z 2013 r. poz. 627, z późn. zm.). Przynależność taksonów do określonych grup apoporostów przyjęto za Olech (1998), a współrzędne geograficzne stanowisk badawczych wyznaczono przy pomocy odbiornika GPS.

16.3. Teren badań

Według informacji zawartych w *Strategii rozwoju gminy Juchnowiec Kościelny na lata 2009-2025* (2009), Janowicze (Ryc. 16.1) to niewielka wieś o powierzchni zaledwie 524 ha. Liczy 123 mieszkańców (Ewidencja Ludności Gminy Juchnowiec Kościelny 2015) i położona jest na obszarze Niziny Północnopodlaskiej, na granicy

2 mezoregionów: Wysoczyzny Białostockiej i Doliny Górnej Narwi (Kondracki 2013). Obszar badań zlokalizowany jest w obrębie kwadratu Cg-31 siatki kartogramu ATPOL, zmodyfikowanego do celów lichenologicznych (Cieśliński, Fałtynowicz 1993).



Rycina 16.1. Lokalizacja wsi Janowicze, gmina Juchnowiec Kościelny

Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Janowicze>.

Wykaz stanowisk

1 – las młodnik ($53^{\circ}013159N$ / $23^{\circ}173245E$), podłoża: kora drzew, drewno (pniaki);
2 – główna ulica wsi Janowicze, stanowisko zbiorcze (od punktu: $53^{\circ}006036N$ / $23^{\circ}177218E$ do punktu: $53^{\circ}012981N$ / $23^{\circ}173742E$), podłoża: kora drzew i krzewów (w tym owocowych), drewno (opadłe gałęzie drzew, drewniany płot – w tym drewniane ogrodzenie pomalowane farbą), powierzchnia plechy innego porostu, gałęzy

narzutowe, betonowa płyta oraz słupy i podmurówki, dachówka eternitowa, papa, metalowe elementy ogrodzeniowe;

3 – las zlokalizowany około 500 m od wsi, (52°00'1262N / 23°17'5268E), podłoża: kora drzew, drewno (szyszki), mech, gleba.

16.4. Wyniki

16.4.1. Zróźnicowanie florystyczne porostów

Na badanym terenie odnotowano 53 taksony, w tym 52 w randze gatunku. Listę ułożono według schematu: nazwa gatunku – numer stanowiska – podłoże.

Oznaczenia drzew i krzewów:

- drzewa: Ag – *Alnus glutinosa*, Ah – *Aesculus hippocastanum*, Bp – *Betula pendula*, Bpp – *Betula papyrifera*, Ca – *Corylus avellana*, Fe – *Fraxinus excelsior*, Ld – *Larix decidua*, Pa – *Picea abies*, Ps – *Pinus sylvestris*, Pt – *Populus tremula*, Qr – *Quercus robur*, Sa – *Salix alba*, Tc – *Tilia cordata*;
- drzewa owocowe: C – *Cerasus* sp., M – *Malus* sp., Pd – *Prunus domestica* subsp. *syriaca*, Jr – *Juglans regia*;
- krzewy: Fa – *Frangula alnus*, Sv – *Syringa vulgaris*.

Acarospora fuscata (Schrad.) Th. Fr. – 2, betonowy słup;

Buellia punctata (Hoffm.) A. Massal. – 2, kora drzew (Fe, Sa) ;

Caloplaca decipiens (Arnold) Blomb. & Forssell – 2, betonowy słup, betonowa podmurówka, dachówka eternitowa, papa;

Caloplaca holocarpa (Ach.) A. E. Wade s. l. – 2, drewno (płot) ;

Candelaria pacifica M. Westb. & Arup – 2, kora drzew (Fe, Tc), drewno (płot) ;

Candelariella aurella (Hoffm.) Zahlbr. – 2, betonowa płyta, betonowy słup, dachówka eternitowa, papa;

Candelariella xanthostigma (Ach.) Lettau – 2, kora drzew (Bp), drewno (płot) ;

Cladonia arbuscula (Wallr.) Flot. subsp. **mitis** (Sandst.) Ruoss – 3, gleba;

Cladonia chlorophaea (Sommerf.) Spreng. s. l. – 2, drewno (płot) ;

Cladonia digitata (L.) Hoffm. – 3, gleba;

Cladonia fimbriata (L.) Fr. – 2, 3, kora drzew (Bp, Ps) i krzewów (Fa), drewno (pniak, szyszka, płot), gleba;

Cladonia furcata (Huds.) Schrad. subsp. **furcata** – 3, gleba;

Cladonia phyllophora Hoffm. – 3, gleba;

Cladonia portentosa (Dufour) Coem. – 3, gleba;
Cladonia rangiferina (L.) F. H. Wigg. – 3, gleba;
Cladonia subulata (L.) F. H. Wigg. – 3, mech, gleba;
Cetraria aculeata (Schreb.) Fr. – 3, gleba;
Cetraria islandica (L.) Ach. – 3, gleba;
Evernia prunastri (L.) Ach. – 1, 2, kora drzew (Bp, Sa) i krzewów (Fa), powierzchnia plechy innego porostu (*Parmelia sulcata*), drewno (płat);
Hypocenomyce scalaris (Ach.) M. Choisy – 2, 3, kora drzew (Bp), drewno (pniak);
Hypogymnia physodes (L.) Nyl. – 1, 2, 3, kora drzew (Ah, Bp, Bpp, C, Ca, Jr, Ld, M, Pd, Ps, Pt, Qr, Sa, Tc) i krzewów (Fa, Sv), drewno (płat), głąz narzutowy;
Imshaugia aleurites (Ach.) S. L. F. Meyer – 2, kora drzew (Bp) ;
Lecanora albescens (Hoffm.) Flörke s. l. – 2, betonowy słup;
Lecanora carpinea (L.) Vain. – 1, 2, kora drzew (Sa) i krzewów (Fa);
Lecanora conizaeoides Cromb. – 1, 2, 3, kora drzew (Fe, Pa, Ps), drewno (płat);
Lecanora dispersa (Pers.) Sommerf. s. l. – 2, betonowy słup;
Lecanora muralis (Schreb.) Rabenh. – 2, betonowy słup, dachówka eternitowa;
Lecanora chlarotera Nyl. – 2, kora drzew (Fe);
Lecidella elaeochroma (Ach.) M. Choisy – 1, 2, kora drzew (Fe, Sa, Tc);
Lepraria sp. – 2, 3, kora drzew (Bp, Ps, Tc);
Melanelixia fuliginosa (Duby) O. Blanco et al. – 2, kora drzew (C), drewno (płat);
Melanohalea exasperatula (Nyl.) O. Blanco et al. – 1, 2, kora drzew (Bp, Ld), kora krzewów (Fa);
Parmelia sulcata Taylor – 1, 2, kora drzew (Bp, Ca, Fe, Ld, Pd), drewno (opadła gałąź, pniak, płat);
Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale – 2, drewno (płat),
Pertusaria albescens (Huds.) M. Choisy & Werner – 1, kora krzewów (Fa),
Phaeophyscia orbicularis (Neck.) Moberg – 1, 2, kora drzew (Ah, Ca, Fe, Sa, Tc), betonowa podmurówka, metalowe elementy ogrodzeniowe;
Phaeophyscia nigricans (Flörke) Moberg – 2, betonowa podmurówka, metalowe elementy ogrodzeniowe;
Phlyctis argena (Spreng.) Flot. – 1, 2, 3, kora drzew (Ag, Fe, Qr, Sa, Tc), kora krzewów (Fa), drewno (pniak);
Physcia adscendens H. Olivier – 1, 2, kora drzew (Ah, Ca, Fe, Ld, Sa), i krzewów (Fa), drewno (opadła gałąź), betonowy słup;
Physcia caesia (Hoffm.) Fürnr. – 2, betonowy słup, betonowa podmurówka, metalowe elementy ogrodzeniowe;
Physcia dubia (Hoffm.) Lettau var. **dubia** – 1, 2, kora drzew (Ah, Bp, Ca, Ld, Sa, Tc);

Physcia stellaris (L.) Nyl. – 1, 2, kora drzew (Fe) i krzewów (Fa), drewno (opadła gałąź);

Physcia tenella (Scop.) DC. – 2, kora drzew (Ca, Fe, Sa), drewno (opadła gałąź, płot), betonowy słup;

Physconia perisidiosa (Erichsen) Moberg – 2, kora drzew (C), drewno (płot);

Physconia enteroxantha (Nyl.) Poelt – 1, 2, kora drzew (C, Ca, Fe, Sa), drewno (pniak, płot);

Porpidia crustulata (Ach.) Hertel & Knoph – 2, betonowy słup, betonowa podmurówka;

Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf – 2, kora drzew (Bp), powierzchnia plechy innego porostu (Hypogymnia physodes);

Ramalina fraxinea (L.) Ach. – 2, kora drzew (Tc);

Scoliosporum chlorococcum (Stenh.) Vězda – 1, 2, kora drzew (Ca, Bpp, Pa, Ps);

Usnea filipendula Stirt. – 2, kora drzew (Bp);

Usnea hirta (L.) F. H. Wigg. – 2, kora drzew (Bp);

Xanthoria parietina (L.) Th. Fr. – 1, 2, 3, kora drzew (Ah, Bp, C, Ca, Fe, Jr, Ld, M, Pt, Qr, Sa) i krzewów (Fa, Sv), drewno (opadła gałąź, pniaki, płot), gład narzutowy, betonowy słup, betonowa podmurówka, betonowa płyta, papa, metalowe elementy ogrodzeniowe;

Xanthoria polycarpa (Hoffm.) Rieber – 1, 2, kora drzew (Ca, Fe, M, Sa) i krzewów (Sv), drewno (pniak, płot).

16.4.2. Preferencje siedliskowe porostów

Porosty na omawianym terenie zasiedlają wszelkie dostępne substraty. Są to: kora drzew i krzewów, drewno (zarówno pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego), mech, gleba, gład narzutowe, beton, podmurówki, plechy innych porostów, a także inne specyficzne podłoża, tj. dachówka eternitowa, papa, czy stalowe elementy bram.

Najliczniejszą grupą ekologiczną porostów są epifity, zasiedlające korę drzew i krzewów, reprezentowane przez 32 taksony, z czego 13 to epifity wyłączne. Kolonizują one takie drzewa, jak: *Betula pendula* (14), *Fraxinus excelsior* (14 epifitów), *Salix alba* (13), *Corylus avellana* (10), *Tilia cordata* (8), *Larix decidua* (6), *Aesculus hippocastanum* (5), *Pinus sylvestris* (5), *Quercus robur* (3), *Betula papyrifera* (2), *Picea abies* (2), *Populus tremula* (2), *Alnus glutinosa* (1); drzewa owocowe i użytkowe: *Cerasus* sp. (5), *Malus* sp. (3), *Juglans regia* (2), *Prunus domestica subsp. syriaca* (2) oraz z krzewów – *Frangula alnus* (9) i *Syringa vulgaris* (3).

Równie liczną grupę ekologiczną stanowią epiksyle (20 gatunków), z czego wyłącznie na drewnie odnotowano 3 gatunki (*Cladonia chlorophaea* s.l. i *Hypocnomyce scalaris*). Nieco mniejszą liczebnością odznaczają się tu epility (14 gatunków), kolonizujące nie tylko głązy narzutowe (2 gatunki – *Hypogymnia physodes* i *Xanthoria parietina*), ale również utwory pochodzenia antropogenicznego: betonowe podmurówki, płyty czy słupy elektryczne. 4 z nich to epility wyłączne.

Spośród 53 taksonów składających się na lichenobiotę wsi Janowicze i okolic – 10 to epigeity. Zaledwie 1 gatunek – *Cladonia subulata* – porastał murawkę mchu. Zaobserwowano również tendencję do kolonizowania przez porosty plech innego przedstawiciela bioty porostowej, a mianowicie przez *Evernia prunastri* i *Pseudovernia furfuracea*.

Interesującym zjawiskiem jest też tendencja wspólnego zasiedlania przez porosty nietypowych substratów (drewnianego ogrodzenia pomalowanego farbą, dachówki eternitowej, papy, czy metalowych konstrukcji bram, ogrodzeń). Można wymienić tu takie gatunki, jak: *Caloplaca decipiens*, *Candelariella aurella*, *Lecanora muralis*, *Phaeophyscia nigricans*, *Physcia caesia*, i *Xanthoria parietina*.

16.4.3. Chronione i zagrożone gatunki porostów

Spośród 53 zidentyfikowanych taksonów na terenie wsi Janowicze i przyległych okolic, 7 znajduje się na krajowej „Czerwonej Liście Porostów” (Cieśliński i in. 2006) i zakwalifikowanych do trzech z pięciu kategorii zagrożeń: EN – wymierających, VU – narażonych na wyginiecie i NT – bliskich zagrożeniu. Kategorię EN reprezentują 2 taksony – *Physconia perisidiosa* i *Ramalina fraxinea*. 4 gatunki porostów występujące na badanym terenie narażone są na wyginiecie i są to: *Cetraria islandica*, *Parmelina tiliacea*, *Usnea hirta* i *U. filipendula*. Kategorię NT reprezentuje zaledwie 1 gatunek – *Evernia prunastri*. Za istotnymi walorami lichenologicznymi miejscowości Janowicze przemawia również występowanie 8 taksonów objętych ochroną gatunkową, z czego 2 ścisłą (*Parmelina tiliacea* i *Ramalina fraxinea*), a 6 – częściową (*Cetraria islandica*, *Cladonia arbuscula*, *C. portentosa*, *C. rangiferina*, *Imshaugia aleurites* i *Usnea hirta*).

16.4.4. Wpływ człowieka (antropopresja) na lokalną biotę porostów

Pojawiające się coraz liczniej publikacje zwracają uwagę na zjawisko ekspansji porostów synantropijnych. Gatunki te pojawiają się w związku z działalnością człowieka, także na siedliskach przez niego stworzonych (Fałtynowicz 1994; 1995; 2004; Olech 1998; Śliwa 1998; Szczepańska 2008). Lichenobiotę wsi Janowicze

można podzielić na: hemiapofity oraz euapofity (Olech 1998). Na badanym terenie odnotowano 20 euapofitów, zaś hemiapofitów – 11 (Tab. 16.1). Reasumując, 60% badanej lichenobioty miejscowości Janowicze w gm. Juchnowiec Kościelny, to porosty synantropijne.

Tabela 16.1. Porosty synantropijne wsi Janowicze (gm. Juchnowiec Kościelny) i przyległych okolic

| Grupa porostów | Gatunki synantropijne |
|----------------|--|
| Euapofity | <i>Buellia punctata</i> , <i>Caloplaca decipiens</i> , <i>C. holocarpa</i> , <i>Candelariella aurella</i> , <i>C. xanthostigma</i> , <i>Melanelixia fuliginosa</i> , <i>Melanohalea exasperatula</i> , <i>Lecanora albescens s.l.</i> , <i>L. dispersa s.l.</i> , <i>L. muralis</i> , <i>Parmelina tiliacea</i> , <i>Phaeophyscia orbicularis</i> , <i>Ph. nigricans</i> , <i>Physcia adscendens</i> , <i>P. caesia</i> , <i>P. dubia</i> , <i>P. stellaris</i> , <i>P. tenella</i> , <i>Xanthoria parietina</i> , <i>X. polycarpa</i> |
| Hemiapofity | <i>Acarospora fuscata</i> , <i>Cladonia chlorophaea s.l.</i> , <i>Evernia prunastri</i> , <i>Hypocenomyce scalaris</i> , <i>Hypogymnia physodes</i> , <i>Lecanora chlorotera</i> , <i>L. conizaeoides</i> , <i>Lecidella elaeochroma</i> , <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Porpidia crustulata</i> , <i>Scoliosporum chlorococcum</i> |

Wpływ antropopresji na skład ilościowy lichenobioty przejawia się w różnoraki sposób. Wobec braku naturalnych substratów, wytwory człowieka stają się nowymi podłożami do zasiedlenia. Przy niedostatku forofitów, gatunki będące z natury epifitami, kolonizują drewniane płyty, papę, drewniane ogrodzenia pomalowane farbą, betonowe słupy i podmurówki, a nawet pomalowane farbą metalowe konstrukcje bram i ogrodzeń. Rosnące przy głównej ulicy Janowicz nieliczne drzewa (*Aesculus hippocastanum*, *Syringa vulgaris*, *Tilia cordata*) charakteryzuje dość uboga biota porostów. Wyjątek stanowią *Betula pendula* i *Fraxinus excelsior* (na stanowisku 2), których pień od strony jezdni ubogaca cała mozaika 14 gatunków porostów, z *Parmelia sulcata*, *Phaeophyscia orbicularis* i *Ph. entheroxanta* na czele.

Różnorodność lichenobioty w lasach badanego terenu należy ocenić jako niską. Sytuacja ta ma głównie związek z brakiem dostępnych siedlisk, dominacją w składzie gatunkowym biocenoz leśnych *Pinus sylvestris*, wycinką wiekowych drzew, stanowiących ostoję rzadkich gatunków o plesze listkowatej i krzaczkowatej, brakiem nagromadzonego martwego drewna wewnątrz lasu oraz ubożeniem gleb (co przekłada się na małą liczbę epigeitów – zaledwie 10 gatunków).

16.5. Dyskusja i wnioski

Analiza otrzymanych wyników, dotyczących lichenobioty obszaru wsi Janowicze i przyległych okolic dowodzi średniej różnorodności tej grupy organizmów (53 taksonów, z czego 7 zagrożonych, z epifitami – jako wyraźnie dominującą grupą ekologiczną wśród omawianej bioty porostowej). Jednakże obszar ten odznacza się wysokim potencjałem eksploracyjnym, ze względu na niedostatek publikacji opisujących lichenobiotę regionu Polski północno-wschodniej, w miejscowościach o podobnej wielkości co wieś Janowicze. Do jakichkolwiek reprezentatywnych analiz i porównań posłużyć mogą jedynie wyniki otrzymane w innych podlaskich wsiach: Klewinowo (Kiercul 2013a), Krynickie (Kiercul 2013b), Tryczówka (2014), Hermanówka (Kiercul 2015a) i Nowosady (Kiercul 2015b). Wymienione miejscowości są podobne zarówno pod względem powierzchni, położenia, a także typu użytkowania terenu (rolnictwo). We wsi Krynickie (Kiercul 2013b) odnotowano 77 taksonów, w tym 12 porostów zagrożonych. Dominującą grupą ekologiczną porostów są tam epifity (40 gatunków), chętniej porastające korę pojedynczych, samotnych, wolno stojących drzew, niż forofitów w zwartych drzewostanach. Podobną liczbę taksonów odnotowano w biocie porostowej wsi Klewinowo – 65 gatunków, z czego 9 taksonów zagrożonych (Kiercul 2013a). Dominujące tu epifity (31 gatunków) najchętniej kolonizują wiekowe śródpolne i przydrożne drzewa. Porównywalne wyniki ze wsi Janowicze otrzymano w innych podlaskich wsiach, tj.: Nowosady – 39 gatunków (z czego 5 zagrożonych) (Kiercul 2015b), Tryczówka – 39 taksonów (w tym 4 zagrożone) (Kiercul 2014), oraz Hermanówka – 38 (w tym 4 zagrożone) (Kiercul 2015a). We wszystkich wymienionych powyżej wsiach, dominującą grupą ekologiczną porostów, są również epifity – w Nowosadach Kiercul odnotowała 27 gatunków o tej preferencji (2015b), w Hermanówce – 26 (2015a), a w Tryczówce – 24 taksony (2014).

Powyższe analizy sprowadzają się do wniosku, iż pomimo, że zróżnicowanie florystyczne lichenobioty wsi Janowicze i przyległych do niej okolic jest umiarkowane, to obserwowana dobra kondycja, a także liczebność plech rzadkich gatunków świadczą o znikomym wpływie antropopresji na badanych obszarach.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Recenzentom za cenne uwagi do niniejszego opracowania.

Literatura

- Blanco O., Crespo A., Divakar P.K., Esslinger, T.L., Hawksworth D.L., Lumbsch H.T. 2004. *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (*Parmeliaceae*) based on molecular and morphological data. *Mycol. Res.*, 108 (8): 873-884.
- Cieśliński S. 2003. Atlas rozmieszczenia porostów (Lichenes) w Polsce Północno-Wschodniej. *Phytocoenosis* 15 (N.S.), Suppl. *Cartogr. Geobot.*, 15: 1-430.
- Cieśliński S., Czyżewska K., Fabiszewski J. 2006. Red list of the lichens in Poland. [W:] Red list of plants and fungi in Poland. Mirek Z., Zarzycki K., Wojewoda W., Szelaż Z. (red.), Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków, 71-90.
- Cieśliński S., Fałtynowicz W. (eds.). 1993. Atlas of geographical distribution of lichens in Poland. 1. Wyd. IB PAN, Kraków, 1-67.
- Diederich P., Ries Ch., Société des naturalistes luxembourgeois. 2015. Lichens of Belgium, Luxembourg and northern France, <http://www.lichenology.info>.
- Ewidencja Ludności Gminy Juchnowiec Kościelny. Dane ewidencyjne za rok 2014.
- Fałtynowicz W. 1994. Propozycja klasyfikacji synantropijnych. Wprowadzenie do dyskusji. *Arboretum Bolestraszyce*, 2: 21-30.
- Fałtynowicz W. 1995. Wykorzystanie porostów do oceny zanieczyszczenia powietrza. Zasady, metody, klucze do oznaczania wybranych gatunków. Wyd. Fundacja Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno.
- Fałtynowicz W. 2004. Rekolonizacja przez porosty – optymistyczny trend w stanie środowiska [W:] Kejna M., Uscka J. (red.), Zintegrowany monitoring środowiska przyrodniczego. Funkcjonowanie i monitoring geoekosystemów w warunkach narastającej antropopresji. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Wyd. UMK, Toruń: 321-325.
- Kiercul S. 2013a. Zróżnicowanie gatunkowe porostów (*Fungi lichenisati*) wsi Klewinowo i okolic (Polska Północno-Wschodnia) – manuskrypt (dane niepublikowane; artykuł przekazany do czasopisma „Parki Narodowe i Rezerwy Przyrody”, Białowieża).
- Kiercul S. 2013b. Materiały do bioty porostów Podlasia. I. Wieś Krynickie, gmina Zabłudów (polska północno-wschodnia), [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), Różnorodność biologiczna od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska. PTB Białystok, s: 307-318.
- Kiercul S. 2014. Materiały do bioty porostów Podlasia. [Cz.] 2. Wieś Tryczówka, gmina Juchnowiec (Polska północno-wschodnia), [W:] Łaska G. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu: Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów. PTB Białystok, s: 61-70.
- Kiercul S. 2015a. Bogactwo gatunkowe porostów wsi Hermanówka, Chrońmy Przyr. *Ojcz.*, 71(2): 116-121.
- Kiercul S. 2015b. Notes on the distribution of lichen biota of Podlasie III. Nowosady village, podlaskie province (North-Eastern Poland), *Acta Mycol.*, 50(1): 1053.

- Kondracki J. 2013. Geografia regionalna Polski. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Nowak J., Tobolewski Z. 1975. Porosty polskie. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa – Kraków.
- Olech M. 1998. Apophytes in the Lichen Flora of Poland. [W:] Faliński J.B., Adamowski W., Jackowiak B. (red.), Synanthropization of plant cover in new Polish research. Phytocoenosis 10 (N.S.), Suppl. Cartogr. Geobot., 9.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 09.10.2014r. w sprawie ochrony gatunkowej grzybów (Dz. U. z 2013 r. poz. 627, z późn. zm.).
- Strategia rozwoju gminy Juchnowiec Kościelny na lata 2009-2025, Juchnowiec Kościelny.
- Szczepańska K. 2008. Antropogeniczne przemiany bioty porostów Masywu Śnieżnika i Gór Białskich. Acta Bot. Siles. Monogr. 4: 1-294.
- Śliwa L. 1998. Antropogeniczne przemiany lichenoflory Beskidu Sądeckiego. Pr. Bot., 31: 1-158.
- Śliwa L. 2007. A revision of the *Lecanora dispersa* complex in North America. Pol. Bot. J., 52(1): 1-70.

17 Bioróżnorodność wokół nas – porosty jako biowskaźniki zanieczyszczenia powietrza

Anna Matwiejuk

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Botaniki

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: matwiej@uwb.edu.pl

Streszczenie

W pracy scharakteryzowano porosty jako organizmy biowskaźnikowe. Opisano wybrane cechy anatomiczne, morfologiczne oraz fizjologiczne plech porostów oraz ich właściwości sorpcyjne. Scharakteryzowano metody lichenoindykacyjne (terenowe i laboratoryjne, w tym metody: florystyczne, anatomiczno-morfologiczne, fizjologiczne, analityczno-chemiczne). Przedstawiono wybrane przykłady wykorzystania porostów do oceny zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego różnymi polutantami. Zebrano także dane na temat badań lichenomonitoringowych prowadzonych na terenie Polski oraz na temat gromadzenia i analiz wyników badań i obserwacji.

Słowa kluczowe: porosty, bioindykatory, lichenoindykacja, metody

17.1. Wstęp

Porosty (*Lichenes*) należą do królestwa grzybów *Mycota*. Są plechowymi organizmami symbiotycznymi, złożonymi z dwóch komponentów: autotroficznego glonu (fotobionta) i heterotroficznego grzyba (mykobionta). Glonami najczęściej tworzącymi plechy porostów są zieleńce (*Chlorophyta*) oraz sinice (*Cyanophyta*) – w 10% i w 3% oba typy fotobiotów. Mykobiontem są najczęściej grzyby workowce (*Ascomycota*). Fotobionty, w połączeniu z różnymi grzybami, tworzą odmienne taksony porostów (Oksanen 2006). Proces powstawania porostów nazywany jest lichenizacją, stąd ich nazwa synonimowa – grzyby lichenizowane.

Wzajemne zależności pomiędzy biontami są różnie traktowane: od helotyzmu (niewolnictwa), poprzez grzybopasożytnictwo, glonopasożytnictwa do symbiozy. Najczęściej wzajemne relacje pomiędzy partnerami tłumaczy się jako symbiozę mutualistyczną, gdzie glon pobudzany jest przez substancje (głównie kwas askorbinowy) wytwarzane przez grzyb do fotosyntezy. Grzyb natomiast dostarcza glonom wody wraz z substancjami mineralnymi, stwarza mu schronienie oraz chroni go przed niską temperaturą. Plecha porostów tworzy nową jakość w stosunku do każdego z komponentów, przy czym pewne cechy anatomiczno-morfologiczne nie są przez nie zatracane.

Porosty są organizmami zmiennowodnymi (poikilohydrowymi). Stopień uwodnienia ich plech jest zależny od stopnia wilgotności powietrza. Porosty pobierają wodę atmosferyczną z powietrza (głównie w postaci pary wodnej), całą powierzchnią plechy bez jej uprzedniego przejścia w stan ciekły, w sposób czysto fizyczny, w cyklu dobowym (Matwiejuk 2000).

Specyficzną cechą porostów jest zdolność wytwarzania wtórnych substancji porostowych, zwanych kwasami porostowymi. Gromadzą się one, między innymi, na powierzchni strzępek mięszu, w soraliach, rzadziej w warstwie korowej plechy. Ich udział, w zależności od gatunku, wynosi od 0,5 do 10% suchej masy porostów. Kwasy porostowe są wytwarzane przez grzyba z wykorzystaniem węglowodanów produkowanych przez glony – glukozę przez sinice oraz rybitol, erytrytol i sorbitol – przez zieleńce wskutek rozmaitych szlaków metabolicznych (szlak octanowo-polimalonianowy, szlak kwasu szikimowego, szlak kwasu mewalonianowego). Rodzaj i ilość wytwarzanych kwasów porostowych różnicują się w zależności od danego gatunku porostów. Nauka dysponuje opracowanymi metodami identyfikacji gatunków porostów na podstawie analizy zawartych w nich kwasów (chemotaksonomia – reakcje testowe, chromatografia cienkowarstwowa TLC, wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC) (Kłos 2007).

Substancje porostowe pełnią funkcję ochronną, broniąc porost przez wpływem szkodliwych czynników zewnętrznych (np. zwierząt, promieniowaniem słonecznym, zanieczyszczeniem środowiska). Do tej pory zidentyfikowano ok. 1050 substancji porostowych (Molnár, Farkas 2010), z czego zaledwie 50-60 występuje w innych grzybach i roślinach (Nash 2008).

Celami pracy są: 1) ocena roli porostów w monitoringu biologicznym zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego, 2) ocena właściwości porostów jako wskaźników zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego, 3) ocena i przegląd metod lichenindykacyjnych.

17.2. Biomonitoring

Biomonitoring jest miarą odpowiedzi żywych organizmów na zmiany zachodzące w środowisku. Regularne, czasowe i przestrzenne obserwacje żywych organizmów, jako bioindykatorów umożliwiają – na podstawie ilościowych i jakościowych ich charakterystyk – określenie stanu systemu ekologicznego oraz parametrów biotycznych i abiotycznych jego komponentów, w tym substancji oraz oddziaływań antropogenicznych. Monitoring biologiczny, uzupełniony monitoringiem technicznym i chemicznym, jest niezwykle przydatny do oceny skażenia środowiska (Traczewska 2011).

Jednym z najstarszych sposobów kontroli jakości środowiska jest jego ocena na podstawie zmian składu gatunkowego biocenozy. Stosowane metody są oparte na obserwacji i identyfikacji gatunków wskaźnikowych (stenotypowych, tj. o wąskich i określonych granicach tolerancji) i wnioskowaniu na tej podstawie o warunkach abiotycznych. Jeśli wiadomo, na jaki czynnik są wrażliwe stenobionty i jakie warunki preferują, to na podstawie ich obecności w środowisku, można wnioskować o działaniu lub występowaniu określonego czynnika środowiskowego. Podczas obserwacji długoterminowych gatunki wskaźnikowe umożliwiają określenie kierunku zmian oraz prognozowanie zdolności do samooczyszczania środowiska. Komponenty biologiczne mogą być badane na wielu poziomach: od molekularnego i komórkowego do biocenozy, poprzez poziomy pośrednie, jak organizmy i populacje (Traczewska 2011).

W zależności od sposobu reagowania na określone czynniki środowiskowe, można wyróżnić następujące kategorie bioindykacyjne: 1) skala gatunków – obecność lub brak gatunków wrażliwych na określony czynnik środowiskowy, 2) wskaźniki akumulacji – organizmy gromadzące w swoich tkankach substancje toksyczne, 3) wskaźniki reagujące – organizmy wskazujące różny stopień uszkodzenia swoich

organów pod wpływem działających czynników środowiskowych, 4) biomarkery – kategoria bioindykatorów wskazujących zmiany na poziomie biochemicznym, immunologicznym i genetycznym.

Biowskaźniki (indykatory biologiczne) to organizmy, które mają określony stopień tolerancji na czynniki środowiskowe, wykazując określone reakcje, gdy granica owej tolerancji zostanie przekroczona. Przykładem mogą być niektóre gatunki porostów, których występowanie jest limitowane przez stężenie zanieczyszczenia (np. ditlenku siarki) w powietrzu.

17.3. Lichenoindykacja

Lichenoindykacja jest jedną z metod bioindykacji, która wykorzystuje porosty (*Lichenes*) jako organizmy biowskaźnikowe.

Wyjątkowa wrażliwość porostów na zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego, w porównaniu z innymi roślinami wynika z tego, że: 1) chlorofil umożliwiający fotosyntezę glonom porostowym pod wpływem toksyn, a zwłaszcza dwutlenku siarki, ulega przekształceniu w nieaktywną feofitynę – w efekcie glony obumierają; 2) występuje bardzo mała zawartość chlorofilu w plechach na jednostkę suchej masy, co sprawia, że rozkład chlorofilu pod wpływem toksyn daje efekty uszkodzenia wielokrotnie silniejsze niż u roślin; 3) warstwa korowa tych organizmów, zbudowana ze strzępek grzyba, łatwo przepuszcza roztwory z rozpuszczonymi w nich toksynami do wnętrza plechy; 4) porosty pobierają nieoczyszczoną wodę bezpośrednio z powietrza atmosferycznego (mgła, rosa), podczas gdy woda pobierana przez korzenie roślin jest przynajmniej częściowo przefiltrowana przez warstwy gleby; 5) w większości przypadków porosty są gatunkami o wąskiej skali ekologicznej, co oznacza, że mają bardzo ograniczone możliwości przystosowywania się do zmieniających się warunków środowiska (Fałtynowicz 1995).

Ze względu na budowę anatomiczną, porosty charakteryzują się zdolnościami sorpcyjnymi, zwłaszcza w stosunku do jonów metali. Pobierają wodę i zawarte w niej substancje, wraz z zanieczyszczeniami, całą powierzchnią plechy. Porosty są wskaźnikami akumulacji – organizmami gromadzącymi w swoich plechach substancje toksyczne.

Mechanizm sorpcji metali i radionuklidów przez porosty wynika z:

- wymiany jonowej;
- fizycznego wiązania substancji w plechach jako wynik reakcji obronnych przed toksynami;

- znacznie większej liczby kationów (dla manganu nawet 15 razy), co powoduje akumulację w strukturze pozakomórkowej niż wewnątrzkomórkowej;
- właściwości warstwy pozakomórkowej, która tworzy bufor między otoczeniem a wewnętrzną strukturą porostów;
- możliwości absorpcyjnych tych organizmów: niektóre metale, np. ołów, najlepiej kumulują się w warstwie korowej porostu, podczas gdy np. miedź, cynk i arsen w całej pleśce, lokalizacja kobaltu zaś wykazuje charakterystyczną stratyfikację (Kłos 2009).

Absorpcja metali ciężkich może spowodować w plechach porostów:

- uwalnianie z komórek potasu, w wyniku destrukcji błon komórkowych, co jest konsekwencją szkodliwego działania metali (np. miedzi);
- uszkodzenie mitochondriów i chloroplastów na skutek oddziaływania metali ciężkich w kwaśnych roztworach, np. pH = 3 (Kłos 2009).

Porosty znalazły zastosowanie w kontroli zanieczyszczeń, takich jak: pył o średnicy nie większej niż 20 μm , wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, tlenki siarki, tlenki azotu oraz metale ciężkie.

17.4. Metody lichenoindykacyjne

Istnieje kilka metod wykorzystujących porosty w bioindykacji środowiska – traktowane są one wówczas jako organizmy wskaźnikowe lub monitorowe. Do metod tych należą:

Metody terenowe:

- metody florystyczne.

Metody laboratoryjne:

- metody anatomiczno-morfologiczne,
- metody fizjologiczne,
- metody analityczno-chemiczne.

Metody florystyczne. W badaniach florystycznych, które polegają na badaniu bioróżnorodności i liczebności porostów, najczęściej stosowane są **skale porostowe**, modyfikowane dla obszarów geograficznych, w zależności od występujących tam gatunków porostów epifitycznych (nadrzewnych). Do celów lichenomonitoringu zostały przetestowane liczne gatunki porostów oraz granice wytrzymałości porostów w zależności od stopnia skażenia powietrza, zwłaszcza tlenkami siarki. Uczyniono to dzięki eksperymentalnym badaniom aktywności procesów metabo-

licznych, zwłaszcza fotosyntezy, oddychania, a następnie, przez porównanie uzyskanych danych, z ilością SO_2 w powietrzu. Wyliczone zostały roczne wartości SO_2 w atmosferze powodujące zahamowanie fotosyntezy (Bystrek 1997).

Na podstawie takich badań dla Wysp Brytyjskich opracowana została pierwsza skala wrażliwości porostów (Hawksworth, Rose 1970) i podana procentowa wartość SO_2 dla określonych grup gatunków. Na podstawie występowania poszczególnych gatunków porostów rosnących na drzewach o dwóch odmiennych rodzajach kory – zeutrofizowanej i niezeutrofizowanej, Hawksworth i Rose (1970) wyróżnili 10 stref, którym przyporządkowali odpowiednie średnie wartości stężeń SO_2 w miesiącach zimowych. Dzięki tej skali stało się możliwe porównywanie rozmieszczenia poszczególnych stref na różnych obszarach lub analiz ich zmian w czasie.

W Polsce, skala biologiczna Hawkswortha i Rose (1970) została zmodyfikowana i przystosowana do warunków południowej Polski przez Kiszkę (1990) dla województwa krakowskiego oraz dla Przemyśla (Kiszka 1999).

Dane na temat zmian w występowaniu i obfitości porostów na poziomie gatunków i populacji, uzyskane w badaniach różnorodności i liczebności porostów są poddawane analizie w celu wykonania map, identyfikacji stref zubożenia różnorodności biologicznej porostów i wskazań, co do jakości powietrza. Tworzenie map dystrybucji rozpowszechnionych i wrażliwych porostów jest dość tanią i prostą metodą monitoringu jakości powietrza. Metoda ta rozróżnia strefy z różnym stopniem zanieczyszczenia. Wzory dystrybucji mogą obejmować obecność lub brak gatunków jako odpowiedź na zanieczyszczenia, zmniejszenie pokrycia gatunkami i rekolonizację gatunków, wynikającą z poprawy jakości powietrza (Traczevska 2011).

Na podstawie obserwacji składu gatunkowego porostów epifitycznych (nadrzewnych) można wyznaczyć siedem stref o różnym stopniu zanieczyszczenia powietrza (Tab. 17.1).

W Polsce, głównie w miastach, najczęściej stosowaną metodą lichenoindykacyjną była skala porostowa, służąca do oceny stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego SO_2 . Skala porostowa umożliwia określenie strefy porostowej (strefy lichenoindykacyjnej), tzn. obszaru charakteryzującego się występowaniem wskaźnikowych gatunków porostów nadrzewnych o znanej odporności na stężenie SO_2 (Matwiejuk 2007). W wielu miastach Polski stwierdzono wyraźne strefowe rozmieszczenie porostów. Pustynie bezporostowe (strefy najbardziej skażone) wyodrębniono w Krakowie (Zurzycki 1950; Kiszka 1977; Kiszka, Kościelniak 1996), Toruniu (Wilkoń-Michalska i in. 1968), Radomiu (Cieśliński 1974), Warszawie (Zimny, Kucińska 1974), Łodzi (Kuziel, Halicz 1979), Szczecinie (Marska 1979), miastach aglomeracji Trójmiasta (Fałtynowicz i in. 1991) i Poznaniu (Kepel 1999). Strefy bezporostowej nie stwierdzili Toborowicz (1976) w Kielcach, Lipnicki (1984)

w Dreźnie, Kiszka (1999) w Przemyśle oraz Matwiejuk, Korobkiewicz (2012) w Narwi. W Białymstoku pustynia bezporostowa występuje tylko na pojedynczych stanowiskach położonych w centrum miasta (Matwiejuk 2007).

Tabela 17.1. Skala porostowa

| Numer strefy | Nazwa strefy | Skażenie powietrza SO ₂ [µg SO ₂ /m ³] | Gatunki wskaźnikowe |
|--------------|---------------------------------------|--|--|
| I | Bezwzględna pustynia bezporostowa | ponad 170 | brak porostów |
| II | Względna pustynia bezporostowa | 100-170 | porosty skorupiaste, np. misecznica proszkowata (<i>Lecanora conizaeoides</i>) oraz liszajec (<i>Lepraria</i>) |
| III | Wewnętrzna strefa walki | 100-70 | porosty listkowate, np. paznokietnik ostrzygowy (<i>Hypocenomyce scalaris</i>), obrost wzniesiony (<i>Physcia adscendens</i>), złotorost postrzępiony (<i>Xanthoria candelaria</i>) i złotorost ścienny (<i>X. parietina</i>) |
| IV | Środkowa strefa walki | 70-50 | obok form listkowatych pojawiają się formy krzaczkowate, np. pustułka pęcherzykowata (<i>Hypogymnia psysodes</i>), tarczownica bruzdkowana (<i>Parmelia sulcata</i>) |
| V | Zewnętrzna strefa walki | 50-40 | formy listkowate zajmują znaczne powierzchnie na pniach drzew, obecne są też porosty krzaczkowate. Przykłady gatunków: mąkla tarniowa (<i>Evernia prunastri</i>), mąklik otrębiasty (<i>Pseudevernia furfuracea</i>), odnożyce (<i>Ramalina</i>) |
| VI | Wewnętrzna strefa normalnej vegetacji | 40-30 | porosty porastają bujnie pnie i gałęzie drzew, liczne są gatunki bardzo wrażliwe na związki toksyczne; rośnie tam włostka brązowa (<i>Bryoria fuscescens</i>), brodaczka kępkowa (<i>Usnea hirta</i>), płucnik modry (<i>Platismatia glauca</i>) |
| VII | Typowa strefa normalnej vegetacji | poniżej 30 | skład gatunkowy jest bogaty, wszystkie plechy są silnie rozwinięte, okazałe; występują tam taksony bardzo wrażliwe z rodzajów: włostka (<i>Bryoria</i>), brodaczka (<i>Usnea</i>), pawężniczka (<i>Nephroma</i>), granicznik (<i>Lobaria</i>) |

W badaniach różnorodności i liczebności porostów stosowane są także metody polegające na obliczeniach **indeksów czystości atmosfery** (ang. *Index of Atmospheric Purity*, IAP) określające wpływ źródła zanieczyszczeń na populację porostów

(Czarnota 1998; Kricke, Loppi 2000; Conti, Cecchetti 2001; Szczepaniak, Bziuk 2003; Gombert i in. 2004; Dymytrova 2009; Estrabou i in. 2009; Traczewska 2011). Jest to ilościowe podejście fitosocjologiczne, wymagające zbioru danych, takich jak częstość i procent pokrycia porostów oraz uwzględnienie wiedzy dotyczącej ich tolerancji na substancje toksyczne.

IAP umożliwia ocenę poziomu zanieczyszczenia powietrza, opartą na liczbie gatunków porostów, częstotliwości ich występowania (F) i tolerancji porostów na badanym terenie.

$$\text{Indeks Czystości Atmosfery (IAP)} = \sum F_i$$

Wartości IAP zwiększają się, gdy zbiorowiska stają się bardziej złożone w miarę oddalania się od źródła emisji (Traczewska 2011).

Wartości IAP są zgrupowane w pięć poziomów jakości czystości atmosfery:

- I. poziom A – $0 \leq \text{IAP} \leq 12,5$ – bardzo wysoki poziom zanieczyszczenia,
- II. poziom B – $12,5 < \text{IAP} \leq 25$ – wysoki poziom zanieczyszczenia,
- III. poziom C – $25 < \text{IAP} \leq 37,5$ – umiarkowany poziom zanieczyszczenia,
- IV. poziom D – $37,5 < \text{IAP} \leq 50$ – niski poziom zanieczyszczenia,
- V. poziom E – $\text{IAP} > 50$ – bardzo niski poziom zanieczyszczenia (Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN 1995).

Jedną z metod użycia porostów w badaniach biomonitoringowych jest **transplantacja** rdzennych (autochtonicznych) gatunków z obszarów o małym zanieczyszczeniu (puszcze, parki narodowe, obszary wiejskie zachowujące pierwotny charakter krajobrazu) na tereny, gdzie porosty nie występują w ilościach naturalnych (pustynie porostowe) lub ich populacje w sposób znaczący są ograniczone ze względu na zanieczyszczenia wynikające z działalności człowieka (LeBlanc i in. 1972; Pustelniak 1991a; Kepeł 1999; Szczepaniak, Bziuk 2003; Matwiejuk 2007). Zanieczyszczenia mogą pochodzić z obszarów zurbanizowanych, tras szybkiego ruchu, obszarów przemysłowych oraz z elektrociepłowni, zakładów chemicznych i rafinerii (Jóźwiak i in. 2010).

Najczęściej stosuje się transplantację w miesiącach jesiennych i wiosennych, kiedy w środowisku miejskim panuje podwyższona wilgotność powietrza, związana z występowaniem częstych opadów i mgieł przy równoczesnym wzmożonym obciążeniu atmosfery zanieczyszczeniami. W konsekwencji, w okresie tym wytwarza się bardzo niekorzystny układ współzależności: wydłużony okres uwodnienia plech, prowadzący do zwiększenia aktywności fizjologicznej i tym samym ułatwionego pobierania substancji toksycznych, przy równoczesnym zwiększeniu zanieczyszczenia atmosfery. Transplantowane plechy porostów poddaje się dalszym badaniom

laboratoryjnym, wykorzystując obserwacje morfologiczne, anatomiczne, analizę procesów fizjologicznych czy analizę chemiczną plech porostowych eksponowanych na określony typ zanieczyszczeń.

Biowskaźnikami transplancyjnymi są najczęściej porosty krzaczkowate (głównie nitkowate) lub listkowate, co wynika z ich większej wrażliwości. Do badań stosowanych na świecie najczęściej wykorzystywane są następujące gatunki porostów: pustułka pęcherzykowata *Hypogymnia physodes*, mąkla tarniowa *Evernia prunastri*, tarczownica bruzdkowana *Parmelia sulcata* (Józwiak i in. 2010).

Metody anatomiczno-morfologiczne polegają na badaniu zmian w budowie anatomicznej i morfologicznej plech porostów, spowodowanych czynnikami antropogennymi. W tym celu pobiera się plechy porostów z obszarów stosunkowo mało zanieczyszczonych i przenosi je na tereny objęte wpływem emisji miejskich i przemysłowych.

W badaniach zmian w budowie wewnętrznej porównywany jest udział żywych i martwych komórek glonów oraz szybkość ich obumierania (metoda kondycji plech pustułki pęcherzykowatej *Hypogymnia physodes* na podstawie aktywności fotobionta *Trebouxia* – metoda mikroskopowa). Analiza żywotności (kondycji) plech *Hypogymnia physodes* jest powszechnie uważana za miernik stężenia dwutlenku siarki w powietrzu (Bystrek 1997). W Polsce metodę tę wykorzystano w kilku miastach. Pustelniak (1991b) w Rzeszowie wykazała, że tempo obumierania plech pustułki pęcherzykowatej było większe zimą niż latem. Bystrek i Wójciak (1994), eksponując plechy *Hypogymnia physodes* w wielu punktach Lublina, stwierdzili całkowite obumarzenie i rozpad komórek nie tylko zielonego komponenta, ale i strzępek tworzącego plechę porostu grzyba. Matwiejuk (2007) na terenie Białegostoku zaobserwowała najgorszą kondycję plech *Hypogymnia physodes* na stanowiskach eksponowanych na obszarze od centrum miasta ku południowemu wschodowi i północnemu zachodowi, co jest związane z kierunkiem najczęściej wiejących wiatrów (z kierunków zachodnich).

W **metodzie makroskopowej** ocenia się stopień uszkodzeń plech porostów na podstawie wielkości zmian, przebarwień i nekroz na plechach. Metodę tę wykorzystano m.in. w Poznaniu (Kepel 1999).

Metody fizjologiczne polegają na ocenie zmian aktywności procesów życiowych zachodzących w plechach porostów pod wpływem toksyn zawartych w powietrzu. Porównuje się zmiany fizjologiczne w plechach eksponowanych na zanieczyszczenie powietrza na badanym terenie z podobnymi procesami w plechach porostów pochodzących z terenów uznanych za czyste.

Przykładem badań procesów fizjologicznych jest pomiar zmian konduktywności wody po zanurzeniu w niej porostów, wywołany wyciekaniem jonów z wnętrza komórek wskutek uszkodzenia błon komórkowych (Garty i in. 2003) oraz badanie intensywności wydzielania etylenu C₂H₄, nadmiernie wytwarzanego przez porosty pod wpływem toksyn (Epstein i in. 1986; Garty i in. 2000).

Często badanym wskaźnikiem fizjologicznym są zmiany aktywności fotosyntetycznej glonów. Fabiszewski i in. (1983), na podstawie zmian intensywności fotosyntezy transplantowanych plech *Hypogymnia physodes*, obejmujących zakres od całkowitej inhibicji tego procesu do wartości 80% kontroli, określili pięć stref skażeń środowiska i izolinię stężeń dwutlenku siarki wokół Zakładów w Lubińskim Zagłębiu Miedziowym.

Pomocniczą rolę w ocenie stopnia skażenia atmosfery stanowią pomiary zawartości chlorofilu i feofityny w transplantowanych porostach (Fabiszewski i in. 1983, Boonpragob 2000).

W badaniach aktywności procesów fizjologicznych stosowane są metody fluorescencyjne, które można wykorzystywać w terenie (*in situ*), unikając w ten sposób możliwych zmian fizjologicznych, wywołanych transportem oraz przechowywaniem porostów, co skutkuje „laboratoryjnym stresem komórek” (Czarnota 1998).

Metody analityczno-chemiczne polegają na analizie składu chemicznego porostów: mikro- i makropierwiastków kumulowanych w ich plechach. Stosując lichenindykacyjne metody analityczno-chemiczne wyznacza się strefy zanieczyszczenia środowiska oraz bada źródła i kierunki rozprzestrzeniania się polutantów.

Badania te mają na celu ocenę i monitoring zanieczyszczenia środowiska np. w pobliżu zakładów produkcyjnych, aglomeracji miejskich i naturalnych emitatorów (np. wulkanów). Dotyczą także metod analizy i kierunków rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń na terenach nieuprzemysłowionych oraz korelacji między zawartością pierwiastków śladowych w plechach porostów, w powietrzu i w glebie (Fabiszewski i in. 1983; Kral i in. 1989; Czarnota 1995; Kepel 1999; Conti i in. 2004; Kłos 2007; Matwiejuk 2007).

17.5. Podsumowanie

Porosty uznawane są za klasyczny przykład biologicznego wskaźnika zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. Duża ich wrażliwość na zanieczyszczenia powodowana jest biologią tych organizmów i warunkami ich życia. Organizmy te korzystają z występujących w powietrzu związków mineralnych i organicznych źródeł azotu. Wodę pobierają również z atmosfery, głównie w postaci gazowej.

Zwiążanie swego bytu z atmosferą jest przyczyną, że porosty znalazły się w grupie organizmów najbardziej wrażliwych na zanieczyszczenia powietrza i powszechnie traktowane są jako najczulsze biotesty w monitoringu biologicznym, rejestrujące skażenia dwutlenkiem siarki, tlenkami azotu, a także metalami ciężkimi oraz radioaktywnymi izotopami. Wrażliwość porostów na zanieczyszczenia atmosfery została jednoznacznie udokumentowana doświadczalnie w warunkach laboratoryjnych i poparta badaniami terenowymi. Opracowano różnorodną tematykę i metody badawcze.

Literatura

- Boonpragob K. 2000. Monitoring physiological change in lichens: total chlorophyll content and chlorophyll degradation. [W:] Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (red.), Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 29: 327-332.
- Bystrek J. 1997. Podstawy lichenologii. Wyd. Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
- Bystrek J., Wójciak H. 1994. Mapa bioindykacyjna miasta Lublina oparta o porosty (raport, cz. I), Lublin, 1-18.
- Cieśliński S. 1974. Flora epifityczna porostów miasta Radom. Biuletyn Kwartalny Radomskiego Towarzystwa Naukowego, 11(3/4): 169-189.
- Conti M.E., Cecchetti G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. Environ. Pollut., 114: 471-492.
- Conti M.E., Tudino M., Stripeikis J., Cecchetti G. 2004. Heavy metal accumulation in the Lichen *Evernia prunastri* transplanted at urban, rural and industrial sites in Central Italy. J. of Atmosph. Chemistry, 49: 83-94.
- Czarnota P. 1995. Zawartość mikro- i makropierwiastków w plechach *Hypogymnia physodes* w Górczańskim Parku Narodowym – próba lichenindykacji. Parki Narodowe i Rezerwy Przyrody, 14(3): 69-88.
- Czarnota P. 1998. Porosty jako indykatory zanieczyszczenia środowiska. Przegląd metod chenoindykacyjnych. Przegl. Przyrod., IX(1/2): 55-72.
- Dymytrova L. 2009. Epiphytic lichens and bryophytes as indicators of air pollution in Kyiv city (Ukraine). Folia Cryptog. Estonica, Fasc., 46: 33-44.
- Epstein E., Sagee O., Cohen J.D., Garty J. 1986. Endogenous auxin and ethylene in the lichen *Ramalina duriaei*. Plant. Physiol., 82: 1122-1125.
- Estrabou C., Filipini E., Soria J.P., Schelotto G., Rodriguez J.M. 2011. Air quality monitoring system using lichens as bioindicators in Central Argentina. Environ. Monit. Assess., 182: 375-382.

- Fabiszewski J., Brej T., Bielecki K. 1983. Fitoindykacja wpływu huty miedzi na środowisko biologiczne. *Prace Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego B*, 207: 1-110.
- Fałtynowicz W. 1995. Wykorzystanie porostów do oceny zanieczyszczenia powietrza. Zasady, metody, klucze do oznaczania wybranych gatunków. Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno.
- Fałtynowicz W., Izydorek I., Budzbon E. 1991. The lichen flora as bioindicator of air pollution of Gdańsk, Sopot and Gdynia. *Monogr. Bot.*, 73: 1-52.
- Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H. 2003. Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. *Environ. Res.*, 91: 186-198.
- Garty J., Weissman L., Tamir O., Beer S., Cohen Y., Karnieli A., Orlovsky L. 2000. Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiol. Plantar.*, 109: 410-418.
- Gombert S., Asta J., Seaward M.R.D. 2004. Assessment of lichen diversity by index of atmospheric purity (IAP), index of human impact (IHI) and other environmental factors in an urban area (Grenoble, southeast France). *Science of the Total Environment*, 324. 1-3: 183-199.
- Hawksworth D.L., Rose F. 1970. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, 227: 145-148.
- Jóźwiak M.A., Jóźwiak K., Szwed M. 2010. Metody transplantacji porostów stosowane w biomonitoringu powietrza atmosferycznego. *Monitoring Środowiska Przyrodniczego*, 11: 15-23, Kieleckie Towarzystwo Naukowe, Kielce.
- Kepel A. 1999. Porosty Poznania jako wskaźniki zanieczyszczenia atmosfery. Praca doktorska (manuskrypt) wykonana w Zakładzie Taksonomii Roślin Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań.
- Kiszka J. 1977. Wpływ emisji miejskich i przemysłowych na florę porostów (*Lichenes*) Krakowa i Puszczy Niepołomickiej. *Wyd. Naukowe WSP w Krakowie, Prace Monogr.*, 19: 5-137.
- Kiszka J. 1990. Lichenoidykacja obszaru województwa krakowskiego. *Stud. Ośr. Dokument. Fizjogr.*, 18: 201-212.
- Kiszka J. 1999. Porosty (*Lichenes*) oraz warunki bioekologiczne Przemysła. *Arboretum Bolestraszyce*, Z. 6.
- Kiszka J., Kościelniak R. 1996. Porosty miasta Krakowa oraz waloryzacja ich warunków bioekologicznych. *Stud. Ośr. Dokument. Fizjogr.*, 24: 21-72.
- Kłos A. 2007. Porosty biowskaźniki i biomonitory zanieczyszczenia środowiska. *Chemia. Dydaktyka. Ekologia. Metrologia*, R. 12, Nr 1-2.
- Kłos A. 2009. Porosty w biomonitoringu środowiska, Uniwersytet Opolski, *Studia monograficzne*, Nr 420.

- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN – Normenausschuss KRdL, http://www.krld.din.de/cmd?workflowname=InitCommittee&search_committee=krld&contextid=krld.
- Kral R., Kryzova L., Liska J. 1989. Background concentrations of lead and cadmium in the lichen *Hypogymnia physodes* at different altitudes. *Sci. Total Environ.*, 84: 201-209.
- Kricke R., Loppi S. 2000. Bioindication: The I.A.P. Approach. [W:] Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (red.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 4: 21-38.
- Kuziel S., Halicz B. 1979. Występowanie porostów epifitycznych na obszarze Łodzi. *Spraw. z Czynn. i Posiedz. Nauk. Łódzkiego Tow. Nauk.*, 33.3: 1-7.
- LeBlanc F., Rao D.N., Comeau G. 1972. Indices of atmospheric purity and fluoride pollution pattern in Arvida, Quebec. *Can. J. Bot.*, 50: 991-998.
- Lipnicki L. 1984. Porosty miasta Drezdenka i najbliższej okolicy. *Fragm. Flor. et Geobot.*, 28.2: 221-239.
- Marska B. 1979. Z badań nad porostami miasta Szczecina. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Szczecinie*, nr 77, *Rolnictwo*, 22: 205-215.
- Matwiejuk A. 2000. Water content in terricolous lichens. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 69(1): 55-63.
- Matwiejuk A. 2007. Porosty Białegostoku, jako wskaźniki zanieczyszczenia atmosfery. *Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko*, Białystok.
- Matwiejuk A., Korobkiewicz K. 2012. Porosty jako wskaźniki stanu zanieczyszczenia powietrza na terenie Narwi (Podlasie, północno-wschodnia Polska). *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 52: 113-122.
- Molnár K., Farkas E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch [C]* 65(3-4):157-173.
- Nash T.H. III (red.). 2008. *Lichen Biology*. Cambridge University Pres. New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, 105-133, 336-339.
- Oksanen I. 2006. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(4): 723-734.
- Pustelniak L. 1991a. Application of the transplantation method in studies on the influence of the urban environment upon the vitality of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. thalli. *Zesz. Nauk. Uniw. Jagiell., Prac. Bot.*, 22: 193-201.
- Pustelniak L. 1991b. Epiphytic lichens of the city Rzeszów (South-Eastern Poland). *Zesz. Nauk. Uniw. Jagiell., Prac. Bot.*, 22: 171-191.
- Szczepaniak K., Bziuk M. 2003. Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environ. Res.*, 93: 221-230.
- Toborowicz K. 1976. Porosty miasta Kielc i najbliższej okolicy. *Fragm. Flor. Geobot.*, 22.4: 574-603.

- Traczewska T.M. 2011. Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Wilkoń-Michalska J., Głazik N., Kalińska A. 1968. Porosty miasta Torunia. *Acta Societatis Nicolai Copernici*, 29(63): 210-253.
- Zimny H., Kucińska K. 1974. Porosty Warszawy jako biowskaźniki zaburzeń środowiska miejskiego. *Przegląd Informacyjny – Zieleń Miejska*. Instytut Gospodarki Komunalnej, Warszawa, 10/1: 13-22.
- Zurzycki J. 1950. Badania nad nadrzewnymi porostami Krakowa i okolicy. *Mat. do Fizjogr. Kraju*, Kraków, 24: 1-30.

Udział glonów w fitoremediacji środowisk wodnych skażonych metalami ciężkimi

Alicja Piotrowska-Niczyporuk* / Andrzej Bajguz

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
*e-mail: alicjap@uwb.edu.pl

Streszczenie

W wyniku ekspansywnej gospodarki realizowanej przez człowieka od wielu lat obserwuje się wzrost zanieczyszczeń środowisk wodnych metalami ciężkimi, co powoduje poważne problemy w funkcjonowaniu i stabilności ekosystemów. Obiecujące możliwości w procesach usuwania metali daje fitoremediacja, która wykorzystuje naturalną zdolność wybranych gatunków roślin do pobierania i detoksykacji ksenobiotyków z otoczenia. Dzięki ewolucyjnie wykształconym strategiom adaptacyjnym do życia w skażonych środowiskach, glony mogą skutecznie uczestniczyć w fitoremediacji metali ciężkich z ekosystemów wodnych.

Organizmy te charakteryzują się szybkim tempem podziałów komórkowych i przyrostu biomasy oraz dużą zdolnością absorpcji i akumulacji pierwiastków metalicznych. Proces sekwestracji jonów metali jest możliwy dzięki dużej powierzchni komórkowej, obecności grup funkcyjnych w ścianach komórkowych, które mają wysokie powinowactwo wobec metali i ich immobilizacji, oraz kompartmentacji w wakuoli. Wykazano, że organizmy te, w odpowiedzi na obecność metali, syntezują specyficzne, bogate w cysteinę peptydy zwane fitochelatynami, należące do III klasy metalotionein, które wiążą je w nietoksyczne kompleksy, i w ten sposób unieszkodliwiają. Nieliczne badania wskazują na obecność w komórkach glonów specyficznych transporterów błonowych, które transportują nadmiar jonów metali z cytozolu do wakuoli, gdzie są unieszkodliwiane. Stwierdzono również ich transformację do form mniej toksycznych na drodze enzymatycznych reakcji. Dzięki tym mechanizmom dostosowawczym glony wykazują wysoką zdolność usuwania metali. W ten sposób mogą być praktycznie wykorzystywane w oczyszczaniu ekosystemów wodnych.

Słowa kluczowe: biosorpcja, fitochelatyny, glony, kompartmentacja, toksyczność

18.1. Wstęp

Rozwój cywilizacji i działalności człowieka spowodował wzrost poziomu zanieczyszczeń metalami ciężkimi. Zjawisko to szczególnie widoczne jest w wodach powierzchniowych śródlądowych, a także morskich przybrzeżnych, wodach glebowych i płytkich wodach gruntowych. Zanieczyszczenie wód ma szczególne znaczenie ze względu na rolę, jaką pełnią one w obrocie pierwiastków. Stężenie metali ciężkich w akwenach zależy głównie od właściwości fizyko-chemicznych tych pierwiastków, rozpuszczalności, zanieczyszczeń w wodzie, pH, potencjału utleniająco-redukującego, a także możliwości tworzenia rozpuszczalnych kompleksów. Metale ciężkie, tj. kadm (Cd), rtęć (Hg) czy ołów (Pb) w stosunku do roślin wykazują wysoką toksyczność. Ulegają kumulacji w organizmach roślinnych i charakteryzują się długim okresem połowicznego rozpadu. Jednak oddziaływania między metalami ciężkimi a glonami wodnymi są złożone i poznane w niedostatecznym stopniu (Srivastava, Majumder 2008; Piotrowska i in. 2010; Piotrowska-Niczyporuk i in. 2012; Polonini i in. 2015).

Niniejszy rozdział stanowi przegląd literatury naukowej dotyczącej zastosowania biomasy glonów w akumulacji i usuwaniu metali ciężkich ze środowiska wodnego w procesie zwanym fitoremediacją, oraz mechanizmów uczestniczących w odporności tej grupy organizmów na toksyczny wpływ tych pierwiastków.

18.2. Czy glony mogą być wykorzystywane w fitoremediacji?

Fitoremediacja polega na zastosowaniu w skażonym środowisku roślin zdolnych do wzrostu i oddziaływania na zachodzące w nim: biologiczne, chemiczne oraz fizyczne procesy, by w efekcie przyczynić się do usunięcia ksenobiotyków z układu biologicznego (Ali i in. 2013, Gupta i in. 2013). Techniki fitoremediacji, oprócz oczywistych korzyści, wynikających z oczyszczenia środowiska naturalnego ze szkodliwych substancji, posiadają także szereg innych zalet. Można je stosować bezpośrednio w miejscu wystąpienia skażenia, są tanie, a pobrane przez roślinę zanieczyszczenia są ulokowane w wytworzonej biomase, która – jako substancja organiczna, może być utylizowana. Jak każda technologia, fitoremediacja ma także swoje słabe strony. Jednym z podstawowych ograniczeń jest stosunkowo długi czas oczekiwania na pożądane rezultaty (Piotrowska-Niczyporuk, Bajguz 2013).

Ostatnio duże zainteresowanie budzi zastosowanie glonów (alg) w oczyszczaniu środowiska. Stanowią one grupę morfologiczno-ekologiczną, składającą się

tradycyjnie z kilku niespokrewnionych linii ewolucyjnych organizmów plechowych. Cechami łączącymi gromady należące do glonów jest w większości przypadków autotrofizm i funkcja pierwotnego producenta materii organicznej w zbiornikach wodnych oraz pierwotna, beztkankowa budowa ciała. Algi mogą być mikroskopijne (mikroalgi) lub dochodzić nawet do kilkudziesięciu metrów długości (makroalgi) (Lee 2008). Organizmy te charakteryzują się szybkim tempem podziałów komórkowych i przyrostu biomasy oraz dużą zdolnością wiązania (biosorpcji) i detoksykacji metali ciężkich, co sprawia że mogą być efektywnie wykorzystywane w fitoremediacji, zwłaszcza w usuwaniu metali ciężkich z ekosystemów wodnych (Gin i in. 2002; Srivastava, Majumder 2008; Piotrowska-Niczyporuk i in. 2012; Rajamani i in. 2014; Polonini i in. 2015). Zidentyfikowano dwa główne mechanizmy tolerancji alg na obecność toksycznych jonów metali: 1) wykluczenie metali, polegające na ich zatrzymaniu na zewnątrz ściany komórkowej, co jest wykorzystywane w procesie biosorpcji metali, oraz 2) zmniejszenie biodostępności metali w środowisku, poprzez ich chelatowanie z organicznymi ligandami wewnątrz komórek alg (Ryc. 18.1) (Perales-Vela i in. 2006; Rajamani i in. 2014; Polonini i in. 2015). Oba te mechanizmy mają kluczowe znaczenie w praktycznym zastosowaniu tej grupy organizmów w procesie fitoremediacji.

18.3. Biosorpcja metali przez glony

Biosorpcja jest procesem szybkiego, odwracalnego wiązania jonów metali z roztworów wodnych przez biomasę organizmów. Proces ten ma charakter bierny i nie podlega kontroli metabolizmu komórkowego (Davis i in. 2003; Wang, Chen 2009). Wiązanie jonów metali może zachodzić zgodnie z mechanizmem adsorpcji fizycznej lub chemicznej, takich jak: wymiana jonowa, kompleksowanie, mikrostrącanie czy chelatowanie. Podstawowym czynnikiem, mającym wpływ na wydajność biosorpcji jest specyficzna budowa chemiczna ściany komórkowej organizmów. Ściana komórkowa stanowi mechaniczną i chemiczną barierę dla swobodnego wnikania metali do symplasty i u niektórych gatunków może zatrzymywać 80-95% ilości metalu pobieranego przez komórki, co wykazano dla jonów miedzi (Cu), cynku (Zn), Pb i niskich stężeń glinu (Al) (Hamdy 2000; Javanbakht i in. 2014).

W zależności od gatunku alg, budowa ściany komórkowej wykazuje pewne zróżnicowanie, wynikające z obecności różnych makrocząsteczek (polisacharydów, lipidów, białek), charakteryzujących się występowaniem licznych miejsc wykazujących zdolność wiązania metali (Javanbakht i in. 2014). Jony te są adsorbowane przez biomasę alg najczęściej w wyniku, wymienionych wcześniej, fizykochemicz-

nych oddziaływań z grupami funkcyjnymi (np. karboksylową, hydroksylową, aminową, siarczanową, fosforanową), znajdującymi się na powierzchni ściany komórkowej (Davis i in. 2003; Wang, Chen 2009). Wydajność procesu biosorpcji metali ciężkich przez glony jest również cechą wynikającą z ich budowy i związaną z tym przynależnością taksonomiczną do danej gromady i gatunku. Hashim, Chu (2004) poddali ocenie możliwości biosorpcji Cd przez siedem gatunków makroalg zaliczanych do gromady brunatnic (*Sargassum siliquosum* J. Agardh, *Sargassum baccularia* (Mertens) C. Agardh, *Padina tetrastratica* Hauck, zielenic (*Chaetomorpha linum* (O. F. Müller) Kützinger) oraz krasnorostów (*Gracilaria changii* (B. M. Xia i I. A. Abbott), *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva, *Gracilaria salicornia* (C. Agardh) E. Y. Dawson). Stwierdzono, że najbardziej efektywnym biosorbentem jest brunatnica *Sargassum baccularia*, nieco niższą aktywność posiada *Chaetomorpha linum* – należąca do gromady zielenic, natomiast najslabiej absorbuje *Gracilaria salicornia* – zaliczana do krasnorostów. W Polsce dominującą grupę glonów stanowią zielenice i brunatnice, dlatego zasadne może być kontynuowanie badań, mających na celu zastosowanie w fitoremediacji rodzimych gatunków (Urbańska, Kłosowski 2012).

Liczne dane naukowe wskazują, że najwydajniejszymi biosorbentami są brunatnice z rodzaju *Sargassum* (Wang, Chen 2009). W strukturze ściany komórkowej tej grupy glonów występują włókniste obszary, złożone głównie z luźno ułożonych mikrofibrili celulozowych, wkomponowanych w bezpostaciowe matrix kwasu polisacharydowego, tworzącego ponadto połączenia z białkami (Vijayaraghavan, Prabu 2006). Kwasy alginowe wyizolowane z brunatnic są liniowymi karboksylowanymi polimerami, składającymi się głównie z kwasów β -D-mannuronowego (M-blok) i α -L-guluronowego (G-blok), połączonych w różnych proporcjach wiązaniem 1,4-glikozydowym. Sekwencje bloków M i G wykazują istotne zróżnicowanie strukturalne, a ich proporcje w alginianach determinują właściwości fizyczne i reaktywność tej grupy polisacharydów. W strukturach kwasów alginowych występuje również siarczan fukozy. Kwaśne polisacharydy, występujące w ścianach komórkowych brunatnic, są wskazywane jako czynnik decydujący o pojemności biosorpcyjnej względem metali (Davis i in. 2003; Vijayaraghavan, Prabu 2006; Urbańska, Kłosowski 2012).

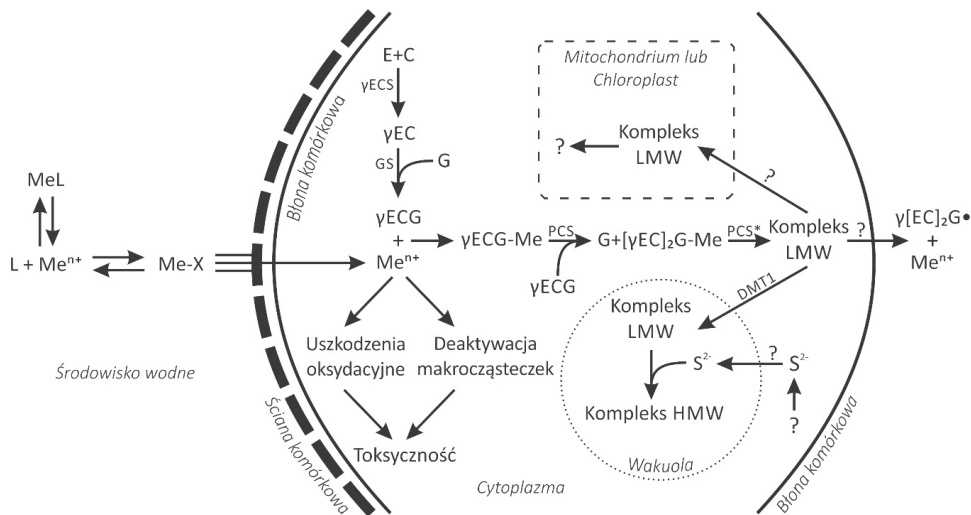
Jednokomórkowe glony (mikroalgi) również charakteryzują się wysokim potencjałem wiązania i usuwania metali ze środowiska wodnego na poziomie 0,1 g metalu/g suchej masy glonów. W ścianie komórkowej *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard, w której stwierdzono obecność glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę, zidentyfikowano następujące grupy funkcyjne zdolne do wiązania metali: aminową, hydroksylową, karboksylową i karbonylową. Dzięki temu gatunek ten

efektywnie absorbował na powierzchni ściany komórkowej jony Hg, Cd i Pb (Tüzün i in. 2005; He i in. 2011). Wydajność wiązania metali przez *Chlamydomonas reinhardtii* zależy również od pH środowiska. Wykazano, że biosorpcja Cd jest najefektywniejsza przy pH 8,0, natomiast przy pH 2,0 metal ten jest uwalniany ze ścian komórkowych do otoczenia wodnego. Ponadto, w ścianie komórkowej *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzono obecność glikoprotein zawierających grupy siarczanowe w postaci siarczanowych estrów z oligosacharydami, które najprawdopodobniej uczestniczą nie tylko w wiązaniu metali, ale również chronią komórki przed odwodnieniem (Cai et al. 1995). Liczne badania wskazują, że pozostałe gatunki mikroalg również skutecznie przeprowadzają proces biosorpcji. Glony z rodzaju *Chlorella* czy *Scenedesmus* potrafią związać odpowiednio 48% i 31% jonów chromu (Cr) z roztworów wodnych (Travieso et al. 2002) oraz efektywnie wiążą Zn, Cu, Cd, Pb i bar (Ba) (Peña-Castro i in. 2004; Piotrowska-Niczyporuk i in. 2012, 2015; Polonini i in. 2015). *Dunaliella salina* Teodoresco posiada wysoką zdolność akumulacji Zn, Cu i Pb, natomiast najniższą efektywność wykazuje w stosunku do toksycznych jonów Cd (Liu i in. 2002).

Zastosowanie glonów w biosorpcji metali ciężkich jest obecnie przedmiotem licznych prac naukowych. Stwierdzono, że jest to tani, szybko zwiększający biomasę surowiec odnawialny, występujący w dużych ilościach w morzach i oceanach, charakteryzujący się dużą pojemnością biosorpcyjną względem metali ciężkich. Zastosowanie tych organizmów w technologiach oczyszczania nabiera szczególnego znaczenia wobec konieczności poszukiwania nowych, korzystnych dla środowiska i uzasadnionych ekonomicznie rozwiązań (Urbańska, Kłosowski 2012).

18.4. Detoksykacja metali przez glony

Metale ciężkie były obecne w środowisku naturalnym od początku życia, stąd uważa się, że mechanizmy obronne neutralizujące ich toksyczność rozwinęły się w wyniku tak wczesnej ekspozycji pierwotnych organizmów, do których należą glony, na ich działanie. Dzięki ewolucyjnie wykształconym strategiom adaptacyjnym do życia w skażonych środowiskach, glony mogą skutecznie uczestniczyć w fitoremediacji metali ciężkich z ekosystemów wodnych. Do mechanizmów obronnych należą: synteza peptydów wiążących metale, kompartmentacja w wakuoli, transport metali z cytoplazmy do wakuoli oraz transformacja metali (Ryc. 18.1).



Rycina 18.1. Losy jonów metali w komórkach glonów

Objaśnienia: MeL – kompleks metalu z ligandem w roztworze wodnym; L – ligand; Me^{n+} – wolny jon metalu; Me-X – jon metalu związany z organicznym ligandem ściany komórkowej; E – glutaminian; C – cysteina; G – glicyna; γEC – glutamylcysteina; γECS – syntetaza glutamylcysteinowa; GS – syntetaza glutationowa; γECG – glutation; PCS – syntetaza fitochelatynowa; $([\gamma EC]_2G)$ – fitochelatyna 2; $[\gamma EC]_2G-Me$ – kompleks fitochelatyny z metalem; LMW – mała masa cząsteczkowa; HMW – duża masa cząsteczkowa; DMT1 – transporter błonowy; S^{2-} – jony siarki; * – reakcja się powtarza i łańcuch fitochelatyny się wydłuża; • – fitochelatyna jest odłączana, gdy jest usuwana na zewnątrz komórki

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Cobbett, Goldsbrough 2002

18.4.1. Fitochelatyny a detoksykacja metali ciężkich

Wśród mechanizmów obronnych istotną rolę odgrywa wiązanie metali przez wewnątrzkomórkowe ligandy peptydowe i białkowe. W komórkach glonów eukariotycznych pierwszą linię obrony przed jonami metali ciężkich stanowią przede wszystkim fitochelatyny oraz ich prekursor – glutation (γECG) (Pawlik-Skowrońska 2002; Cobbett, Goldsbrough 2002).

Fitochelatyny (PC) należą do III klasy metalotionein (MtIII) – peptydów uczestniczących w detoksykacji metali występujących u glonów, roślin wyższych i pewnych gatunków drożdży. U glonów, podobnie jak u roślin wyższych, są syntetyzowane z glutationu lub jego homologów przez konstytucyjny enzym syntazę fitochelatynową (PCS) w cytozolu (Ryc. 18.1), a najprawdopodobniej także w chloroplastach i mitochondriach (Roncarati i in. 2015). Enzym ten ulega aktywacji

przez wnikające do komórki jony metali ciężkich i metaloidów. Do najsilniejszych induktorów syntezy fitochelatyn należy Cd, w mniejszym stopniu syntezę ich stymulują następujące jony: Pb, Zn, Cu, Hg, srebro (Ag), bizmut (Bi) i złoto (Au) (Cobbett, Goldsbrough 2002). Synteza fitochelatyn rozpoczyna się niemal natychmiast po rozpoczęciu ekspozycji na metale. Ustaje natomiast, gdy tylko wewnątrzkomórkowe jony metalu zostaną związane. Po zaprzestaniu ekspozycji, fitochelatyny szybko ulegają degradacji. Ogólna struktura fitochelatyn przedstawia się następująco: $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$, gdzie poszczególne symbole oznaczają: E – glutaminian, C – cysteina, G – glicyna, natomiast $n=2-11$. Masa cząsteczkowa fitochelatyn waha się od 2000 do 10000 kDa. Ze względu na dużą zawartość reszt cysteiny, posiadającej grupę sulfhydrylową (-SH), oddziałują z dużym powinowactwem z jonami metali ciężkich. Zarówno glutation, jak i fitochelatyny tworzą stabilne kompleksy przy pH charakterystycznym dla cytoplazmy, jednakże fitochelatyny zawierające od 2 do 7 grup -SH cysteiny w cząsteczce, mają największą pojemność kompleksującą metale (Török i in. 2015).

Głony należące do różnych grup systematycznych mogą różnić się ilością oraz wielkością polimerów fitochelatyn syntetyzowanych w odpowiedzi na szereg metali ciężkich. U glonów dominują fitochelatyny o $n=2$, co potwierdziły badania m.in. na *Scenedesmus acutiformis* Schröder (Perales-Vela i in. 2006). Török i in. (2015) sugeruje, że wydłużanie łańcucha peptydowego powoduje zwiększenie tolerancji roślin wodnych i glonów na obecność metali ciężkich w środowisku wodnym. W związku z tym glon *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin charakteryzuje się największą odpornością na Cd, ponieważ syntezuje fitochelatyny znacznie dłuższe ($n=9$) niż pozostałe gatunki alg (Perales-Vela i in. 2006).

Jednakże, jak dotąd, publikacje na temat struktury, syntezy i roli fitochelatyn u glonów są nieliczne. Indukcję ich syntezy pod wpływem metali ciężkich stwierdzono u kilkunastu gatunków glonów należących do różnych grup systematycznych, głównie *Chlorophyceae* (Gómez-Jacinto i in. 2015). Pomędzy poszczególnymi gatunkami glonów zaobserwowano znaczne różnice pod względem ilości pobieranego metalu, jak również ogólnej ilości produkowanych fitochelatyn i poszczególnych ich oligomerów (Perales-Vela i in. 2006). U wszystkich badanych glonów wzrost stężenia metalu ciężkiego w środowisku zewnętrznym powodował wzrost jego stężenia wewnątrzkomórkowego. W większości przypadków skorelowane to było ze wzrostem poziomu fitochelatyn (Pawlik-Skowrońska 2002). Dwa glony morskie *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell i Hasle oraz *Thalassiosira pseudonana* Hasle i Heimdal charakteryzowały się wzrostem aktywności syntazy fitochelatynowej oraz syntezy fitochelatyn w odpowiedzi na metale ciężkie (Ahner i in. 1994), co znacznie zwiększało ich zdolność przeżycia w skażonych wodach.

Wzrost tolerancji glonów na metale ciężkie jest skorelowany ze zdolnością syntezy tych peptydów, co potwierdziły badania u glonów takich jak *Chlamydomonas reinhardtii* – eksponowanych na Cd, Pb i Hg, *Scenedesmus acutus* Meyen – traktowanych jonami Cr czy *Phaeodactylum tricoratum* – w odpowiedzi na Cu (Perales-Vela i in. 2006; Scheidegger i in. 2011; Gómez-Jacinto i in. 2015).

Jak dotąd, w kilku zaledwie przypadkach udało się stwierdzić obecność fitochelatyn w próbkach glonów pobranych bezpośrednio z zanieczyszczonych środowisk. Uzyskane wyniki są jednak obiecujące. Niewielką ilość fitochelatyn rzędu kilku-kilkunastu $\mu\text{mol/g}$ chlorofilu wykryto w próbkach fitoplanktonu Zatoki Massachusetts, której wody zanieczyszczone są ściekami. Zawartość w nich fitochelatyn malała wraz z oddaleniem od brzegu (Anher i in. 1994). U zielenicy *Stigeoclonium tenue* (C. Agardh) Kützing, zasiedlającej wody o różnym stężeniu metali ciężkich, w odpowiedzi na wysokie stężenia Zn, Cd, Pb oraz na ich mieszaninę, jako pierwsza linia obrony następowała głównie synteza fitochelatyn (Pawlik-Skowrońska 2001).

Prawdopodobnie fitochelatyny u glonów nie tylko uczestniczą w kompleksowaniu toksycznych jonów metali, mogą również odgrywać istotną rolę w homeostazie niezbędnych mikroelementów oraz metabolizmie siarki (Perales-Vela i in. 2006).

18.4.2. Sekwestracja metali w wakuoli glonów

Innym mechanizmem detoksykacji, zwiększającym odporność glonów eukariotycznych na metale ciężkie mogłaby być sekwestracja metali w wakuolach (Ryc. 18.1.). Jak stwierdzono w krótkotrwałych eksperymentach u *Chara corallina* Klein i C. L. Willdenow, Zn jest szybko transportowany z cytoplazmy do wakuoli (Reid i in. 1996). Obecność Cd stwierdzono także w wakuolach jednokomórkowych zielenic *Dunaliella bioculata* R. W. Butcher i *Tetraselmis suecica* (Kyllin) R. W. Butcher oraz okrzemki *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve narażonych na ten metal (Perales-Vela i in. 2006). Mikroalga należąca do zielenic *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek i Perman akumuluje jony Cr w ścianie komórkowej, cytoplazmie, chloroplastach, ale przede wszystkim w wakuoli (Pereira i in. 2013). U glonów z rodzaju *Scenedesmus*, rosnących w obecności wysokich stężeń Cu, wykazano odkładanie związków tego metalu w wakuoli oraz jądrze komórkowym. Los metali w wakuolach glonów nie jest znany, chociaż analogicznie do roślin wyższych można by przypuszczać, że są one wiązane przez organiczne ligandy, takie jak kwasy organiczne (Pawlik-Skowrońska 2002).

Istnieje również hipoteza, że w przenoszeniu nadmiaru metali z cytoplazmy do wakuoli uczestniczą fitochelatyny tworzące kompleksy z metalami (Pawlik-Skowrońska 2002). Dzięki analizom przy pomocy promieni X i metod mikroskopowych mechanizm ten został dobrze scharakteryzowany u drożdży oraz u wybranych gatunków glonów (Talarico 2002). Sekwestracja kompleksów fitochelatyn z metalami ciężkimi została stwierdzona w wakuolach zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* oraz u morskiej okrzemki *Thalassiosira weissflogii* (Perales-Vela i in. 2006). Natomiast w wakuolach zielenicy *Dunaliella bioculata* stwierdzono obecność kompleksu Cd z siarką (Heuillet i in. 1986). Z kolei, w wakuolach innej zielenicy *Chlorella fusca* Shihira i R.W. Krauss występowały granule polifosforanowe związane z Cu, Zn, żelazem (Fe) i Al (Wong i in. 1994).

18.4.3. Transportery błonowe metali u glonów

Jednym z intensywniej badanych aspektów metabolizmu metali u roślin jest identyfikacja i charakterystyka białkowych transbłonowych transporterów tych jonów. Do tej pory jedynie u glonów z rodzaju *Chlamydomonas* stwierdzono występowanie białek transportujących metale z tonoplastu do wakuoli (Blaby-Haas, Merchant 2012). Są to białka DMT1 (Ryc. 18.1.) należące do rodziny Nramp odpowiedzialne za pobieranie i transport jonów manganu (Mn), Fe, Cd i Cu, ale nie Zn (Rosakis, Köster 2005). W komórkach zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzono również obecność białka transportującego Fea1, które jest odpowiedzialne za transport jonów Fe. Ekspresja genów kodujących Fea1 zachodzi wyłącznie w warunkach stresowych, takich jak ekspozycja na Cd, niedobór jonów Fe oraz wysokie (3%) stężenie CO₂ (Narayanan i in. 2011). Mechanizm transportu metali w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* został w pewnym stopniu poznany dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej. Do komórek tego gatunku glonu wprowadzono syntetyczny gen kodujący peryplazmową metalotioneinę typu II, zbudowaną z pięciu podjednostek, z których każda może związać od 7 do 8 atomów Cd. W ten sposób transgeniczna alga wykazywała odporność na letalne stężenia Cd oraz akumulowała 5 razy więcej jonów tego pierwiastka niż typ dziki. Wyniki te sugerują, że peryplazmowa metalotioneina buforowała zewnątrzkomórkowy Cd redukując znacznie jego toksyczność (Perales-Vela i in. 2006).

18.4.4. Metabolizm metali ciężkich w cytoplazmie komórek glonów

Mikroorganizmy są zdolne do chemicznej transformacji niektórych metali ciężkich w wyniku procesów utleniania, redukcji, alkilacji i dealkilacji, co zwiększa ich odporność na ten stres abiotyczny (Pawlik-Skowrońska 2002). Nieliczne doniesienia dotyczą transformacji metali w komórkach glonów. Przykładowo, u odpornej na Hg zielenicy *Chlorella* sp. stwierdzono enzymatyczną redukcję i ulatnianie tego pierwiastka (De Filippis, Pallaghy 1976). Również u brunatnic morskich obserwowano proces metylacji Hg i jej detoksykacji (Davis i in. 2003). U odpornej na arsen (As) *Chlorella vulgaris* Beijerinck wykazano metylację i usuwanie As z komórek (Maeda i in. 1992). Niektóre glony morskie pobierają ze środowiska jony As i przekształcają je w związki organiczne (np. do arsenobetainy), co znacznie obniża jego toksyczność (Davis i in. 2003). W komórkach *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs obserwowano deacylację lub demetylację organicznych związków Zn i Pb (Maguire i in. 1984). Wykazano również, że komórki zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* oraz krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* P. De Luca, R. Taddei i L. Varano akumulują ze środowiska wodnego jony Cd i wewnątrzkomórkowo przekształcają je do siarczku kadmu (CdS). Proces ten zachodzi dzięki zwiększonej aktywności enzymu desulfhidrazy cysteinowej pod wpływem stresu metalu ciężkiego, który odpowiada za odłączenie jonów siarki od cysteiny, reagujących następnie z Cd (Edwards i in. 2013). Istnieją również dane wskazujące, że organiczne związki takich metali ciężkich, jak selen (Se), Pb i As są bardziej toksyczne w stosunku do glonów niż ich formy nieorganiczne, a więc przemiany wewnątrzkomórkowe metali do form mniej toksycznych mogłyby zwiększać odporność organizmu na ich działanie (Pawlik-Skowrońska 2002).

18.5. Podsumowanie

Dzięki procesom efektywnej akumulacji metali ciężkich przez mikro- i makroalgi oraz dobrze wykształconym mechanizmom ich metabolizowania i detoksykacji, glony mogą być praktycznie wykorzystywane w technikach fitoremediacji wód. Oczyszczanie środowiska przez glony, które powszechnie występują w ekosystemach wodnych i pełnią kluczową rolę w obiegu pierwiastków, jest tanie, przyjazne środowisku, mało inwazyjne, nie generuje wtórnych zanieczyszczeń i jest akceptowalne społecznie. W naukowej literaturze angielskiej coraz częściej spotyka się określenie „phycoremediation” (gr. *phycos* = glony, łac. *remediare* = naprawiać), które trafnie określa duży udział tej grupy organizmów w remediacji zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych.

Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/05/B/NZ8/00958.

Literatura

- Ahner B.A., Price N.M., Morel F.M.M. 1994. Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 8433-8436.
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. 2013. Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869-881.
- Blaby-Haas C.E., Merchant S.S. 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823: 1531-1552.
- Cai X.H., Logan T., Gustafson T., Traina S., Sayre R.T. 1995. Applications of eukaryotic algae for the removal of heavy metals from water. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 338-344.
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 53: 159-182.
- Davis T.A., Volesky B., Mucci A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.*, 37: 4311-4330.
- De Filippis L.F., Pallaghy C.K. 1976. The effect of sublethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*. II. Photosynthesis and pigment composition. *Z. Pflanzenphysiol.*, 38: 314-322.
- Edwards C.D., Beatty J.C., Loisele J.B., Vlassov K.A., Lefebvre D.D. 2013. Aerobic transformation of cadmium through metal sulfide biosynthesis in photosynthetic microorganisms. *BMC Microbiol.*, 13: 161-172.
- Gin K.Y., Tangm Y.Z., Aziz M.A. 2002. Derivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae. *Water Res.*, 36: 1313-1323.
- Gómez-Jacinto V., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L., Garbayo-Nores I., Vilchez-Lobato C. 2015. Elucidation of the defense mechanism in microalgae *Chlorella sorokiniana* under mercury exposure. Identification of Hg-phytochelatins. *Chem. Biol. Interact.*, 238: 82-90.
- Gupta D.K., Huang H.G., Corpas F.J. 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20: 2150-2161.
- Hamdy A.A. 2000. Biosorption of heavy metals by marine algae. *Curr. Microbiol.*, 41: 232-238.
- Hashim M.A., Chu K.H. 2004. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. *Chem. Eng. J.*, 97: 249-255.

- He Z., Siripornadulsil S., Sayre R.T., Traina S.J., Weavers L.K. 2011. Removal of mercury from sediment by ultrasound combined with biomass (transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*). *Chemosphere*, 83: 1249-1254.
- Henry H.F., Burken J.G., Maier R.M., Newman L.A., Rock S., Schnoor J.L., Suk W.A. 2013. Phytotechnologies – preventing exposures, improving public health. *Int. J. Phytorem.*, 15: 889-899.
- Heuillet H., Moreau A., Halpern S., Jeanne N., Puisseux-Dao S. 1986. Cadmium-binding to a thiol molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. *Biol. Cell.*, 58: 79-86.
- Javanbakht V., Alavi S.A., Zilouei H. 2014. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Sci. Technol.*, 69: 1775-1787.
- Lee R.E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, New York.
- Liu Y., Yang S.-F., Tan S.-F., Lin Y.-M. 2002. Aerobic granules: a novel zinc biosorbent. *App. Microbiol.*, 35: 548-551.
- Maeda S., Kusadome K., Arima H., Ohki A., Naka K. 1992. Biomethylation of arsenic and its excretion by the alga *Chlorella vulgaris*. *Appl. Organom. Chem.*, 6: 407-413.
- Maguire R.J., Wong P.T.S., Rhamey J. S. 1984. Accumulation and metabolism of tri-*n*-butyltin cation by a green alga *Ankistrodesmus falcatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 537-540.
- Narayanan N.N., Ihemere U., Chiu W.T., Siritunga D., Rajamani S., Singh S., Oda S., Sayre R.T. 2011. The iron assimilatory protein, FEA1, from *Chlamydomonas reinhardtii* facilitates iron-specific metal uptake in yeast and plants. *Front. Plant. Sci.*, 2: 1-13.
- Pawlik-Skowrońska B. 2001. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquat. Toxicol.*, 52: 241-249.
- Pawlik-Skowrońska B. 2002. Tajemnice odporności glonów i sinic na toksyczne metale ciężkie. *Kosmos*, 51: 175-184.
- Peña-Castro J.M., Martínez-Jerónimo F., Esparza-García F., Cañizares-Villanueva R.O. 2004. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresour. Technol.*, 94: 219-222.
- Perales-Vela H.G., Peña-Castro J.M., Cañizares-Villanueva R.O. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64: 1-10.
- Pereira M., Bartolomé M.C., Sánchez-Fortún S. 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: a mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere*, 93: 1057-1063.
- Piotrowska A., Bajguz A., Godlewska-Żyłkiewicz B., Zambrzycka E. 2010. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia*

- arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 58: 594-604.
- Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. 2013. Fitoremediacja – alternatywa na czyste środowisko. [W:] Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska, Ciereszko I., Bajguz A. (red.), Polskie Towarzystwo Botaniczne, Białystok, 97-110.
- Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A., Zambrzycka E., Godlewska-Żyłkiewicz B. 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Plant Physiol. Biochem., 52: 52-65.
- Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A., Talarek M., Bralska M., Zambrzycka E. 2015. The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae). Environ. Sci. Poll. Res., DOI 10.1007/s11356-015-5118-y.
- Polonini H.C., Brandão H.M., Raposo N.R., Brandão M.A., Mouton L., Couté A., Yéprémian C., Sivry Y., Brayner R. 2015. Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. Ecotoxicol., 24: 938-948.
- Rajamani S., Torres M., Falcao V., Gray J.E., Coury D.A., Colepicolo P., Sayre R. 2014. Non-invasive evaluation of heavy metal uptake and storage in microralgae using a fluorescence resonance energy transfer-based heavy metal biosensor. Plant Physiol., 164: 1059-1067.
- Reid R.J., Brookes J.D., Tester M.A., Smith F.A. 1996. The mechanism of zinc uptake in plants. Planta, 198: 39-45.
- Roncarati F., Sáez C.A., Greco M., Gledhill M., Bitonti M.B., Brown M.T. 2015. Response differences between *Ectocarpus siliculosus* populations to copper stress involve cellular exclusion and induction of the phytochelatin biosynthetic pathway. Aquat. Toxicol., 159: 167-175.
- Rosakis A., Köster W. 2005. Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. Biometals, 18: 107-120.
- Scheidegger C., Behra R., Sigg L. 2011. Phytochelatin formation kinetics and toxic effects in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon short- and long-term exposure to lead(II). Aquat. Toxicol., 101: 423-429.
- Srivastava N.K., Majumder C.B. 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. J. Hazard. Mater., 151: 1-8.
- Talarico L. 2002. Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. Environ. Poll., 120: 813-821.
- Török A., Gulyás Z., Szalai G., Kocsy G., Majdik C. 2015. Phytoremediation capacity of aquatic plants is associated with the degree of phytochelatin polymerization. J. Hazard. Mater., 299: 371-378.

- Travieso L., Pellon A., Benitez F., Sanchez E., Borja R., Farrill N. O., Weiland P. 2002. Bio-alga reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Bioch. Bioeng. J.*, 12: 87-91.
- Tüzün I., Bayramoğlu G., Yalçın E., Başaran G., Celik G., Arica M.Y. 2005. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Manage.*, 77: 85-92.
- Urbańska M., Kłosowski G. 2012. Algi jako materiał biosorpcyjny – usuwanie i odzysk metali ciężkich ze ścieków przemysłowych. *Ochr. Środ. Zas. Nat.*, 51: 62-77.
- Vijayaraghavan K., Prabu D. 2006. Potential of *Sargassum wightii* biomass for copper(II) removal from aqueous solutions: application of different mathematical models to batch and continuous biosorption data. *J. Hazard. Mater.*, 137: 558-564.
- Wang J., Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Advan.*, 27: 195-226.
- Wong S.L., Nakamoto L., Wainright J.F. 1994. Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *J. App. Phycol.*, 6: 405-414.

Iwona Biziewska* / Marta Talarek / Andrzej Bajguz**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

*e-mail: bina2@poczta.onet.pl

**abajguz@uwb.edu.pl

Streszczenie

Działanie człowieka prowadzi często do zanieczyszczenia biosfery jonami metali ciężkich, co stanowi poważne zagrożenie dla środowiska. Toksyczny wpływ metali ciężkich na człowieka, zwierzęta i rośliny jest dobrze poznany. Warunkowany jest absorpcją i bioakumulacją metali, które z kolei zależą od biodostępności, dróg wchłaniania, magazynowania, degradacji, unieruchomienia, wydzielania oraz mechanizmów unikania/tolerancji. Cechy te są ważne w przypadku zwiększenia potencjału wspomaganej fitoremediacji roślin będących hiperakumulatorami, procesu mającego na celu oczyszczanie obszarów zanieczyszczonych.

Akumulacja metali ciężkich, przekraczająca poziom krytyczny, powoduje stres oksydacyjny. Wzrasta wówczas poziom reaktywnych form tlenu, takich jak: wolnorodnikowy anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy. Organizmy są chronione poprzez antyoksydacyjny system obronny, na który składają się enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa i reduktaza glutationowa oraz składniki nieenzymatyczne: askorbinian czy glutation. W roślinach traktowanych brassinosteroidami, należącymi do fitohormonów, stwierdzono wzrost zawartości/aktywności wymienionych antyutleniaczy. U roślin, w odpowiedzi na działanie jonów metali ciężkich, brassinosteroidy przyspieszają syntezę fitochelatyn, poprzez: 1) specyficzną aktywność syntazy fitochelatynowej; 2) zroźnicowane tempo rozpadu fitochelatyn; 3) zroźnicowane tempo transportu kompleksu fitochelatyna-metal przez tonoplast.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, fitochelatyny, hormony roślinne, odpowiedź antystresowa

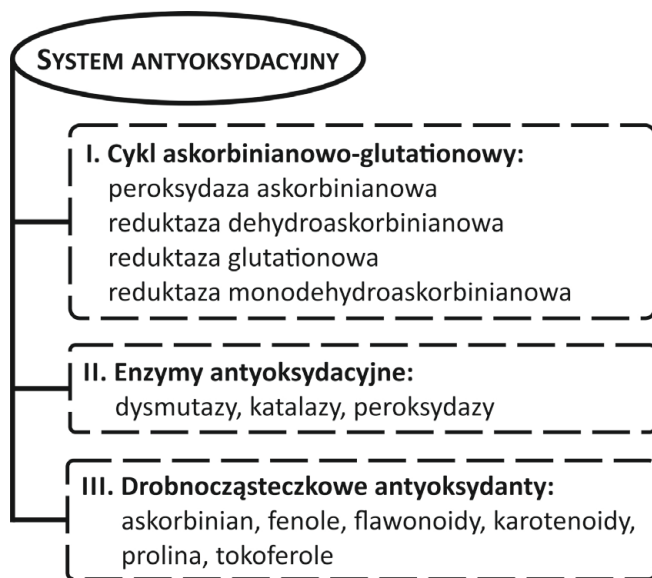
19.1. Wstęp

Gwałtowna industrializacja i urbanizacja doprowadziła do tego, że metale ciężkie stały się jednym z najważniejszych czynników zanieczyszczających środowisko. Pierwiastki te trafiają do łańcucha pokarmowego, co prowadzi do degradacji ekosystemu (Chary i in. 2008). Toksyczny wpływ metali ciężkich na człowieka, rośliny i zwierzęta jest dobrze poznany. Niektóre metale ciężkie są niezbędne do większości reakcji redoks, które mają podstawowe znaczenie dla funkcji komórkowych. Natomiast ich stężenia, zwłaszcza te przekraczające tolerowane limity, prowadzą do powstania stresu oksydacyjnego, który jest związany z generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT). U roślin zasadniczo przeciwdziała temu procesowi system antyoksydantów. Fitohormony są częścią rozległego systemu związanego z powstaniem reakcji obronnych przed stresem. Są to substancje organiczne, których niewielkie ilości modyfikują funkcje fizjologiczne zachodzące w roślinie oraz ograniczają niekorzystne dla roślin następstwa stresów. Jednym z przedstawicieli fitohormonów są brassinosteroidy (BR) (Krishna 2003; Bajguz, Hayat 2009).

19.2. Oddziaływanie metali ciężkich na rośliny

Metale ciężkie można podzielić na te, które w odpowiednich ilościach są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania roślin. Do nich należą m.in.: żelazo, miedź, mangan, kobalt, cynk i nikiel. Drugą grupę stanowią metale toksyczne dla rośliny, np. ołów, rtęć czy kadm. W komórkach roślinnych funkcjonują mechanizmy zapewniające właściwe stężenie jonów metali w różnych przedziałach komórkowych. Proces akumulacji metali w roślinie jest stosunkowo prosty. Składa się on z trzech faz: 1) mobilizacji jonów, 2) pobierania, 3) transportu do miejsca składowania w roślinie. Intensywność procesu akumulacji jest proporcjonalna do stężenia metali. Większość pobranych jonów ulega zatrzymaniu w systemie korzeniowym rośliny przez elementy strukturalne ściany komórkowej, np. związki pektynowe i białka. Transport radialny i wertykalny w korzeniu odbywa się głównie poprzez ściany komórkowe i przestwory międzykomórkowe. Istotną barierę może stanowić endoderma, której komórki zawierają substancje hydrofobowe. Powoduje to ograniczenie transportu wody oraz rozpuszczonych w niej jonów metali, to z kolei powoduje wymuszenie transportu poprzez symplast. W transporcie jonów poprzez błony, istotną rolę odgrywa dyfuzja prosta lub ułatwiona, w której biorą udział przENOŚniki białkowe lub zachodzi endocytoza (Woźny, Przybył 2004).

W obecności jonów metali ciężkich, rośliny przejawiają charakterystyczne objawy ich toksyczności. Odnotowano zahamowanie wzrostu, negatywny wpływ na proces transpiracji i wywoływanie chlorozy liści (Drinovec i in. 2004; Baumann i in. 2009; Lahive i in. 2012). Do charakterystycznych zmian strukturalnych komórek należy wakuolizacja cytoplazmy. Metale ciężkie modyfikują właściwości błon poprzez oddziaływanie z grupami funkcyjnymi białek i lipidów błony. Mogą również wpłynąć na zmianę składu lipidów poprzez hamowanie syntezy kwasów tłuszczowych i steroli. Prowadzą również do powstawania reaktywnych form tlenu, co wpływa destrukcyjnie na wszystkie makrocząsteczki komórki, wywołując w niej stres oksydacyjny. W celu jego uniknięcia, rośliny rozwinęły system obrony antyoksydacyjnej (Ryc. 19.1), który może być regulowany w zależności od warunków środowiska. Ważną rolę w mechanizmie odporności rośliny na działanie metali ciężkich odgrywają również białka opiekuńcze, które wykryto podczas wzrostu roślin w temperaturach ponad optymalnych (Kopcewicz, Lewak 2002).



Rycina 19.1. Główne składowe systemu antyoksydacyjnego

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Foyer i in. 1997, Mittler 2002

Do roślinnych mechanizmów odporności na metale ciężkie (pozwalających uniknąć szkodliwych skutków), należą:

- ograniczenie przenikania metali do symplastu poprzez wydzielanie śluzów i ligandów chelatujących metale oraz zmianę chemiczną składu plazmolemmy;

- blokowanie toksycznych jonów metali w ścianie komórkowej przez pektyny zapobiegające dalszemu transportowi w apoplazmie komórki;
- utrudnienie przemieszczania się metali przez zewnętrzne warstwy protoplazmy;
- indukowanie syntezy fitochelatyn i przemieszczenie do wakuoli bądź dysocjacji powstałego kompleksu fitochelatyna-metal;
- detoksykacja poprzez wytwarzanie kompleksów metali z kwasami nieorganicznymi i organicznymi (jabłkowym, cytrynowym, szczawiooctowym), pochodnymi fenoli, glikozydami oraz aminokwasami (Kopcewicz, Lewak 2002).

19.3. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) są to roślinne hormony steroidowe, które wykazują aktywność fizjologiczną w stężeniach około sto razy mniejszych niż inne poznane dotąd hormony roślinne, np. auksyny czy cytokininy. Obecność tych fitohormonów wykazano u przedstawicieli zielenic, mszaków, paprotników, roślin nagozalążkowych i okrytozalążkowych, u których występują w korzeniach, pędach, liściach, pyłku kwiatowym, pylnikach i nasionach (Bajguz, Tretyn 2003). Ze względu na wysoką aktywność biologiczną, BR są ważnymi regulatorami wielu procesów zachodzących w roślinach: uczestniczą w procesach transkrypcji i translacji. Wykazują stymulujący wpływ na wzrost różnych organów roślinnych (np. ukierunkowane wydłużanie komórek), zwiększają aktywność enzymów kodujących syntezę pektyn i białek strukturalnych ścian komórkowych: proteoglikanów i ekstensyn, aktywują ekspresję genów kodujących podjednostki syntazy celulozowej, V-ATPaz (Huang i in. 2006). Brassinosteroidy indukują kiełkowanie, a także są zdolne do przełamania fizjologicznej blokady zdolności do kiełkowania, jaką wykazują mutanty giberelinowe. Aktywują również proces proliferacji komórek, stymulując ekspresję genu *CycD3* kodującego cyklinę typu D3 odpowiedzialną za przejście komórki z fazy G₁ do S. Wykazano, że po potraktowaniu BR mutanta *det2 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., wykazującego defekt w procesie syntezy BR, następuje indukcja czynnika białkowego *CycD3* (Fu i in. 2008). W komórkach tytoniu indeks mitotyczny wzrasta znacząco po podaniu BR w sposób liniowo zależny od stężenia hormonu (Miyazawa i in. 2003). Do innych funkcji BR należy kontrola procesu ksylogenezy, rozmieszczenie pasm elementów trachealnych w obrębie organu (Dettmer i in. 2009).

Wpływ BR na proces fotosyntezy zależy od gatunku rośliny, stadium rozwoju, w którym podano hormony oraz zastosowanego stężenia. Generalnie, BR znacząco zwiększają przepustowość aparatów szparkowych i transpirację. Rośliny poddane działaniu BR wykazują większą zawartość chlorofilu, cukrów. Przypuszczalnie BR

zwiększając asymilację CO₂ w cyklu Calvina-Bensona, co przypisuje się wzmożonej aktywności Rubisco (Holla 2011).

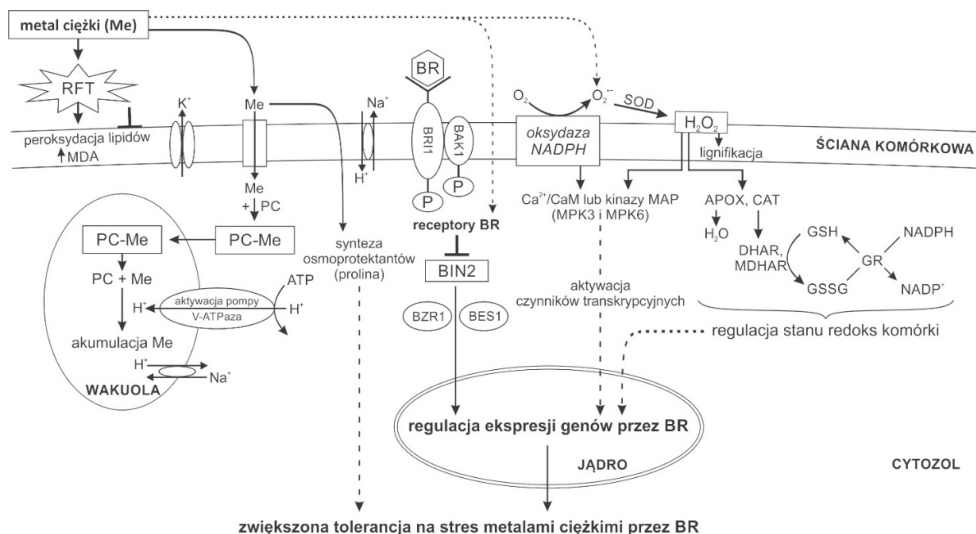
19.3.1. Brassinosteroidy a metale ciężkie

Brassinosteroidy zmniejszają toksyczne działanie metali na rośliny. Są one zdolne do regulowania wchłaniania jonów metali ciężkich do komórek roślinnych, mogą zmniejszać pobieranie metali przez korzenie poprzez zwiększoną aktywność V-ATPazy – enzymu odpowiedzialnego za wydzielanie kwasu i transport protonów z cytoplazmy do wakuoli oraz generowanie gradientu elektrochemicznego, a przez to regulację transportu wtórnego substancji do i z wakuoli (Vazquez i in. 2013). Ponadto, BR mogą stymulować syntezę fitochelatyn, które wiążą jony metali w kompleksy. Brassinosteroidy zwiększają także aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych, co pozwala na usuwanie nadmiaru reaktywnych form tlenu, które powstają, między innymi, wskutek działania metalu ciężkiego. Brassinosteroidy, poprawiając tolerancję roślin na metale ciężkie, współdziałają z innymi hormonami, takimi jak: auksyny, cytokininy, kwas jasmonowy, kwas salicylowy. Tym samym odgrywają ważną rolę w indukowaniu mechanizmów obronnych (Bajguz, Hayat 2009).

Jednym z mechanizmów detoksykacji metali ciężkich jest wiązanie metali przez związki bogate w cysteinę, takie jak fitochelatyny (PC), które ułatwiają chelatację jonów metalu w cytozolu lub ich kompartmentację w wakuolach (Ryc. 19.2) (Shanker i in. 2005). Ogólna struktura PC to (γ -Glu-Cys)*n*-Gly, przy czym *n* może wynosić nawet 10, jednak zazwyczaj mieści się w zakresie 2-5, zaś prekursorem tych peptydów jest glutation (GSH). Fitochelatyny są to metalotioneiny (MT) klasy III, które w odróżnieniu od MT klasy I oraz II nie są pierwotnymi produktami genów, a ich synteza zachodzi bez udziału rybosomu (Mittler 2002). Brassinosteroidy stymulują syntezę PC w komórkach poddanych działaniu metali ciężkich (Bajguz 2002).

Wysokie stężenia metali ciężkich prowadzą do tworzenia RFT, takich jak: nadtlenek wodoru (H₂O₂), rodniki ponadtlenkowe (O₂[•]), rodniki hydroksylowe (HO[•]), rodniki nadtlenkowe (ROO[•]) czy tlen singletowy (O₂¹). Powodują one zniszczenia błony wskutek uszkodzeń oksydacyjnych, a to z kolei wpływa na poziom antyoksydantów (Ryc. 19.1) i metaloenzymów lub enzymów antyoksydacyjnych (Pandey i in. 2005; Shanker i in. 2005). Duże stężenie metali ciężkich w środowisku powoduje ciągły wzrost akumulacji RFT, co utrudnia ich detoksykację. Równowaga między produkcją i detoksykacją RFT możliwa jest dzięki enzymom antyoksydacyjnym (Ryc. 19.1) usuwającym RFT, takim jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD),

katalaza (CAT), peroksydaza askorbinianowa (APOX), reduktaza glutationowa (GR), reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR), reduktaza monodehydroaskorbinianowa (MDHAR) i peroksydaza gwajakolowa (GPOX) (Ryc. 19.2) (Mittler 2002).



Rycina 19.2. Mechanizmy obronne aktywowane przez BR występujące u roślin w odpowiedzi na stres metalami ciężkimi

Objaśnienia: RFT – reaktywne formy tlenu; PC – fitochelatyny; BR – brassinosteroidy; BRI1, BAK1 – receptory BR; BZR1, BES1 – czynniki transkrypcyjne szlaku transdukcji sygnału BR; CAT – katalaza; GPOX – peroksydaza gwajakolowa; DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa; MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa; GR – reduktaza glutationowa; APOX – peroksydaza askorbinianowa.

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Sharma i in. 2011.

Dysmutaza ponadtlenkowa, należąca do rodziny metaloenzymów, występuje w cytozolu, chloroplastach i mitochondriach. Wyróżnia się jej trzy klasy: I. Cu/Zn SOD, II. Mn SOD, III. Fe SOD. Enzym ten katalizuje reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru (Ryc. 19.2) (Małecka, Tomaszewska 2005). Nadtlenek wodoru usuwany jest przez katalazę w peroksysomach lub przez peroksydazę askorbinianową (APOX) w chloroplastach lub przez POD związaną z błoną (Ryc. 19.1 i 19.2) (Foyer i in. 1997). Następnie dochodzi do redukcji disiarczku glutationu (GSSG) w reakcji zależnej od NADPH do GSH, na skutek działania reduktazy glutationowej, która utrzymuje GSH w stanie zredukowanym. Kolejnym etapem jest redukcja dehydroaskorbinianu do askorbinianu (Noctor, Foyer 1998). Askorbinian jest niezbędny do usuwania RFT, a jego pula utrzymywana jest przez DHAR i MDHAR z wykorzystaniem siły redukcyjnej NADPH (Mittler 2002). W wyniku zmniejszenia puli askorbinianu, może dojść do zmiany potencjału

redoks komórek, a w konsekwencji – do destabilizacji błony w warunkach stresu (Bhattacharjee 2005; Skórzyńska-Polit i in. 2010).

Zastosowanie BR zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych u kukurydzy, gorczycy, rzodkwi i pszenicy (Alam i in. 2007; Bhardwaj i in. 2007; Ali i in. 2008; Sharma i in. 2011). Brassinosteroidy regulują aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: SOD, CAT, APOX, GR, DHAR, MDHAR. Ustalenie równowagi może nastąpić ponownie przez zmniejszenie peroksydacji lipidów w błonach komórek i akumulację pewnych osmoprotektantów, takich jak prolina lub betaina (Ryc. 19.2). Brassinosteroidy rozpoznawane są przez kompleks białkowy zawierający kinazę typu LRR-RLK (BRI1), zatem BRI1 może odbierać sygnały peptydowe, pełniąc w ten sposób rolę obronną (Li i in. 2002; Wang 2004). W momencie wystąpienia stresu, sygnały te mogą regulować odpowiedzi obronne. Różne geny regulowane przez BR biorą udział w odpowiedzi na stres i mogą kodować PC, MT, osmolyty, kwasy organiczne i białka szoku cieplnego (HSP) oraz białka chroniące struktury komórkowe przed odwodnieniem (LEA) (Gendron, Wang 2007) (Ryc. 19.2).

Stres organizmów roślinnych, powodowany metalami ciężkimi prowadzi także do aktywacji kinaz zależnych od wapnia (CDPK), kalmodulin, białek kalmodulinopodobnych lub białek podobnych do kalcyneuryny B jako ważnych sensorów Ca^{2+} (Ryc. 19.2) (Ludwig i in. 2004). Badania przeprowadzone na rzodkiewniku wykazały, że w odpowiedzi na kadm, w wyniku akumulacji RFT, uruchomieniu ulegają dwie kinazy aktywowane mitogenami (MAPK), MPK3 i MPK6 (Liu i in. 2010).

Nadprodukcja RFT w warunkach stresu spowodowanego obecnością metalu może zwiększać oksydacyjną degradację fosfolipidów, powodując zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej, których enzymy antyoksydacyjne nie są w stanie odwrócić (Sharma i in. 2011). Jednak BR mogą przyczyniać się także do hamowania degradacji lipidów oraz do stymulacji aktywności enzymów antyoksydacyjnych w warunkach stresowych (Ryc. 19.2). Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Anuradha i Rao (2007), w których suplementacja BR zmniejsza peroksydację lipidów powodowaną przez kadm.

Innym mechanizmem wykorzystywanym przez rośliny do usuwania metali jest biosorpcja. Jest to proces, który nie zależy od metabolizmu komórki. Wiązanie jonów metali może zachodzić zgodnie z mechanizmem adsorpcji fizycznej, wymiany jonowej, sorpcji chemicznej, kompleksowania, chelatowania. Wiadomo, że jony metali są adsorbowane przez biosorbenty w wyniku ich oddziaływania z grupami funkcyjnymi (np. karboksylową, hydroksylową, aminową, fosforylową), znajdującymi się na powierzchni ściany komórkowej biosorbenta. Z badań nad przydatnością sorpcji do usuwania jonów metali ciężkich z roztworów wodnych wynika,

że szczególnie ważną rolę w tym procesie odgrywa pH roztworu. Optymalne pH procesu sorpcji jonów metali ciężkich, dla większości sorbentów naturalnych, znajduje się w zakresie 4-6 (Han i in. 2005). Obniżenie pH pod wpływem BR w przestrzeniach ściany komórkowej stymuluje wzrost *Chlorella vulgaris*. Wpływ BR na wydzielanie protonów związany jest z wczesną hiperpolaryzacją potencjału elektrycznego między błonami. Wydzielanie protonów wywołane tymi hormonami jest też dodatkowo stymulowane obecnością K^+ w podłożu (Bajguz 2002).

19.4. Podsumowanie

Nasilające się zanieczyszczenie środowiska i kurczenie się siedlisk naturalnych zmusza do poszukiwania nowych, przyjaznych środowisku technik remediacji i odzyskiwania zanieczyszczonych/toksycznych obszarów do użytku człowieka. Tania, przyjazna środowisku i oparta na wykorzystaniu roślin technika fitoremediacji jest obiecującym sposobem rozwiązywania problemów ekologicznych związanych z różnymi zanieczyszczeniami. Ponieważ niektóre rośliny charakteryzują się dużą i szybką produkcją biomasy oraz potencjałem hiperakumulacji, mogą mieć zastosowanie w fitoremediacji (Piotrowska i in. 2013). Najnowsze badania skupiają się na poprawie wydajności tych organizmów poprzez wykorzystanie różnorodnych substancji/związków zwiększających ich przydatność w fitoremediacji. Wiadomo, że BR mogą modyfikować niektóre cechy argonomiczne roślin, co skłania ku badaniom zastosowania tych fitohormonów w fitoremediacji.

Podziękowanie

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/05/B/NZ8/00958.

Literatura

- Alam M.M., Hayat S., Ali B., Ahmad A. 2007. Effect of 28-homobrassinolide on nickel induced changes in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 45: 139-142.
- Ali B., Hasan S.A., Hayat S., Hayat Q., Yadav S., Fariduddin Q., Ahmad A. 2008. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminum stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Environ. Exp. Bot.*, 62: 153-159.

- Anuradha S., Rao S.S. R. 2007. The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant Soil Environ.*, 53: 465-472.
- Bajguz A. 2002. Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatin synthesis in *Chlorella vulgaris*. *J. Plant Physiol.*, 159: 321-324.
- Bajguz A., Tretyn A. 2003. Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wyd. UMK, Toruń.
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47: 1-8.
- Baumann H.A., Morrison L., Stengel D.B. 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1063-1075.
- Bhardwaj R., Arora N., Sharma P., Arora H.K. 2007. Effects of 28-homobrassinolide on seedling growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities under nickel stress in seedlings of *Zea mays* L. *Asian J. Plant Sci.*, 6: 765-772.
- Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.*, 89: 1113-1121.
- Chary N.S., Kamala C.T., Raj D.S. 2008. Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. *Ecotox. Environ. Safe.*, 69: 513-524.
- Dettmer J., Elo A., Helariutta Y. 2009. Hormone interactions during vascular development. Brassinosteroids and photosynthesis. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Wyd. Springer, 143-192.
- Drinovec L., Drobne D., Jerman I., Zrimec A. 2004. Delayed fluorescence of *Lemna minor*: a biomarker of the effects of copper, cadmium, and zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72: 896-902.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.*, 100: 241-254.
- Fu F.Q., Mao W.H., Shi K., Zhou Y.H., Asami T., Yu J.Q. 2008. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *J. Exp. Bot.*, 59: 2299-2308.
- Gendron J.M., Wang Z.Y. 2007. Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 436-441.
- Han R., Zhang J., Zou W., Shi J., Liu H. 2005. Equilibrium biosorption isotherm for lead ion on chaff. *J. Hazard. Mater.*, 125: 266-271.
- Hola D. 2011. Brassinosteroids and photosynthesis. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer, 143-192.
- Huang B., Chu C.H., Chen S.L., Juan H.F., Chen Y.M. 2006. A proteomics study of the mung bean epicotyl regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 11: 264-278.

- Kopcewicz J., Lewak S. 2002. Fizjologia roślin. PWN, Warszawa 2002.
- Krishna P. 2003. Brassinosteroids-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 289-297.
- Lahive E.J., O'Halloran M.A.K., Jansen J. 2012. Frond development gradients are a determinant of the impact of zinc on photosynthesis in three species of Lemnaceae. *Aquat. Bot.*, 101: 55-63.
- Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C. 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110: 213-222.
- Liu X.M., Kim K.E., Kim K.C., Nguyen X.C., Han H.J., Jung M.S., Kim H.S., Kim S.H., Park H.C., Yun D.J., Chung W.S. 2010. Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry*, 71: 614-618.
- Ludwig A.A., Romeis T., Jones J.D.G. 2004. CDPK-mediated signaling pathways: specificity and cross-talk. *J. Exp. Bot.*, 55: 181-188.
- Małecka A., Tomaszewska B. 2005. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post. Biol. Kom.*, 32: 311-325.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
- Miyazawa Y., Nakajima N., Abe T., Sakai A., Fujioka S., Kawano S., Kuroiwa T., Yoshida S. 2003. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effect of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression and organellar DNA contents. *J. Exp. Bot.*, 54: 2669-2678.
- Noctor G., Foyer C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279.
- Pandey V., Dixit V., Shyam R. 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* c.v. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*, 61: 40-47.
- Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. 2013. Fitoremediacja – alternatywa na czyste środowisko. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska*, Pol. Tow. Bot., Białystok, 97-110.
- Shanker A.K., Cervantes C., Tavera-Loza H., Avudainayagam S. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.*, 31: 739-753.
- Sharma I., Pati P.K., Bhardwaj R. 2011. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant defence system in *Raphanus sativus* L. under chromium toxicity. *Ecotoxicology*, 20: 862-874.
- Skórzyńska-Polit E., Drażkiewicz M., Krupa Z. 2010. Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiol. Plant.*, 32: 169-175.

- Vazques M.N., Guerrero Y.R., Linsleb M. G. 2013. Brassinosteroids and plant responses to heavy metal stress. An Overview. *Open J. Met.*, 3: 34-41.
- Wang Z.Y., He J.X. 2004. Brassinosteroid signal transduction – choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci.*, 9: 91-96.
- Woźny A., Przybył K. 2004. Komórki roślinne w warunkach stresu t. 1: Komórki *in vivo* cz. 1. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań.

Wpływ askorbinianu na zdolności antyoksydacyjne komórek *Chlorella vulgaris* w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego

Zuzanna Denkiewicz / Bożena Kozłowska-Szerenos*
/ Iwona Ciereszko**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Fizjologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

*e-mail: bokoz@uwb.edu.pl

**e-mail: icier@uwb.edu.pl

Streszczenie

Fosfor jest makroelementem niezbędnym roślinom do wzrostu, rozwoju i metabolizmu. Niedostateczne żywienie fosforanowe może prowadzić do stresu oksydacyjnego, powodującego uszkodzenia białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych. W wyniku nagromadzenia się w komórce reaktywnych form tlenu, zostają uruchomione mechanizmy obronne. Jednym z ważnych elementów systemów antyoksydacyjnych jest askorbinian, nieenzymatyczny antyoksydant hydrofilowy.

Celem badań było określenie czy egzogenne askorbinian, dodany do podłoża przy zakładaniu kultur, zwiększa zdolności antyoksydacyjne komórek *Chlorella vulgaris* w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego. Badania prowadzono na komórkach rosnących w sterylnych pożywkach: z pełną zawartością fosforu (+P), z obniżoną zawartością fosforu ($\frac{1}{4}$ P) oraz bez fosforu (-P). Wpływ egzogenne askorbinianu badano w kulturach, do których dodawano 1 μ M askorbinianu. Badania wykazały, że niedostateczne żywienie fosforanowe prowadzi do ograniczenia tempa wzrostu kultur oraz zwiększenia zawartości barwników fotosyntetycznych. Ponadto wpływa na zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego oraz stężenia białek w komórkach. Wykazano również wzrost aktywności peroksydazy askorbinianowej i oksydazy askorbinianowej oraz spadek reduktazy glutationowej i katalazy w komórkach z kultur z deficytem fosforu.

W pracy wykazano, że egzogenne askorbinian dodany do podłoża w momencie zakładania kultur ogranicza poziom stresu oksydacyjnego (zwiększa zawartość karotenoidów oraz zmniejsza zawartość MDA). Powoduje wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, oksydazy askorbinianowej, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej, przez co ma wpływ na zwiększenie zdolności antyoksydacyjnych komórek *C. vulgaris* w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego.

Słowa kluczowe: deficyt fosforu, kwas askorbinowy, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny

20.1. Wstęp

Rośliny są stale narażone na działanie niekorzystnych czynników stresowych, do których zalicza się także niedobór fosforu. Fosfor jest jednym z ważniejszych składników mineralnych niezbędnych roślinom do wzrostu, rozwoju oraz metabolizmu (Amtmann i in. 2006; Stulgis, Ciereszko 2012). Niedostateczne żywienie fosforanowe prowadzi do stresu oksydacyjnego. W konsekwencji, dochodzi do utleniania białek, peroksydacji lipidów, uszkodzenia zasad azotowych, zaburzenia procesu glikolizy lub zahamowania fotosyntezy (Zabłocka, Janusz 2008; Nowicka, Kruk 2013).

Pojawienie się reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach prowadzi do uruchomienia mechanizmów antyoksydacyjnych. Wśród mechanizmów obronnych wyróżnia się trzy linie obrony. Pierwsza linia obrony ma na celu niedopuszczenie do powstawania reaktywnych form tlenu (uruchamianie cyklu woda-woda, fotooddychania). Druga linia obrony dotyczy unieszkodliwiania RFT w sytuacji, gdy już doszło do ich wytworzenia (działanie przeciwutleniaczy). Trzecia linia to naprawa uszkodzeń powstałych w wyniku działania reaktywnych form tlenu (aktywność oksydoreduktaz, redukujących produkty peroksydacji lipidów) (Kohen, Nyska 2002).

Ważnym elementem systemu obronnego są przeciwutleniacze. Mogą to być enzymy wyspecjalizowane w rozkładaniu RFT, tj. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC 1.11.1.6), peroksydaza askorbinianowa (APX, EC 1.11.1.11) oraz nieenzymatyczne związki niskocząsteczkowe, służące jako akceptory elektronów. Wśród antyoksydantów nieenzymatycznych wyróżniamy: antyoksydanty hydrofilowe, chroniące wodne środowisko komórki (glutation, flawonoidy, askorbinian) oraz antyoksydanty hydrofobowe, chroniące wnętrze błon komórkowych (witamina E, karotenoidy, ksantofile) (Bartosz 2003; Zabłocka, Janusz 2008).

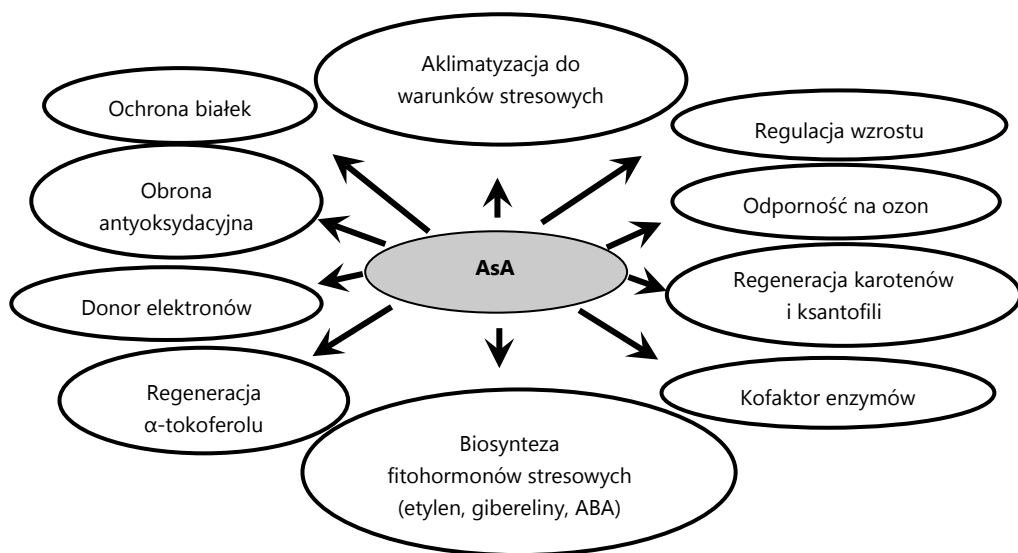
Jednym z antyoksydantów nieenzymatycznych jest askorbinian. Kwas askorbinowy (AsA) syntetyzowany jest przez rośliny i większość zwierząt (Kozłowska-Szerenos, Ciereszko 2013 b). W komórkach roślinnych występuje w cytozolu, chloroplastach, mitochondriach, wakuolach, peroksysomach i jądrze komórkowym (Zechmann i in. 2011). Biosynteza kwasu askorbinowego przebiega w cytozolu, z wyjątkiem jednego etapu, zachodzącego w mitochondrium (Ioannidi i in. 2009). Istnieje kilka szlaków biosyntezy kwasu askorbinowego, jednak za główny uważa się szlak L-galaktozy, gdzie askorbinian jest syntetyzowany z D-glukozy-6-fosforanu (Sharma i in. 2012). Szlaki biosyntezy askorbinianu łączą się z takimi procesami, jak: fotosynteza, wytwarzanie polisacharydów i glikoprotein, a także prekursorów do budowy ściany komórkowej (Ishikawa, Shigeoka 2008).

Kwas askorbinowy, obecny w dużych stężeniach w chloroplastach i innych przedziałach komórkowych, pełni ważną rolę regulacyjną w różnicowaniu, wzroście i metabolizmie fotosyntetyzujących komórek (Giovannoni 2007; Foyer, Noctor 2011; Kozłowska-Szerenos, Ciereszko 2013b). Kluczową rolę askorbinianu jest udział w najważniejszym cyklu antyoksydacyjnym komórek roślinnych, zwanym cyklem Halliwella–Asady (Gest i in. 2013). Wysokie stężenie askorbinianu w chloroplastach (20-300 mM) wskazuje na jego znaczącą rolę w procesie fotosyntezy. Askorbinian łatwo przechodzi przez błony tylakoidów i chroni błony biologiczne przed powstawaniem w nich wolnych rodników tokoferoli oraz przed peroksydacją lipidów. Spełnia rolę donora elektronów dla PSII i PSI oraz uczestniczy w unieczynnianiu rodnika ponadtlenkowego w reakcji Mehlera (cyklu woda-woda) (Mazid i in. 2011). Ponadto jako kofaktor deepoksydazy wiolaksantyny bierze udział w cyklu ksantofilowym, który uczestniczy w rozproszeniu nadmiaru energii wzbudzenia i chroni tym samym aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniem (Kozłowska-Szerenos, Ciereszko 2013b) (Ryc. 20.1).

Kwas askorbinowy, nazywany strażnikiem homeostazy komórkowej, bierze udział w wielu reakcjach utleniania i redukcji, przebiegających ze zmianą stopnia utlenienia jonów. Może zmieniać stan utleniania w reakcjach katalizowanych przez następujące enzymy: peroksydazę askorbinianu, reduktazę dehydroaskorbinianu czy reduktazę monodehydroaskorbinianu. Askorbinian pomaga zachować równowagę pomiędzy formami utlenionymi i zredukowanymi dzięki temu, że łatwo oddaje i pobiera elektrony. Pozwala na utrzymanie stanu redoks w cytozolu i apoplacie na odpowiednim poziomie (Foyer, Noctor 2009; Mazid i in. 2011; Gest i in. 2013; Tóth i in. 2013). Dzięki tym zdolnościom może mieć wpływ na inne procesy regulowane stanem redoks, np. na przekazywanie sygnałów (Guz i in. 2007) (Ryc. 20.1).

Przedmiotem intensywnych badań jest obecnie wiele aspektów dotyczących udziału kwasu askorbinowego w aklimatyzacji roślin do niekorzystnych czynników środowiska, w tym również deficytu fosforu. We wcześniejszych badaniach wykazano, że godzinna inkubacja komórek *C. vulgaris* z egzogennym askorbinianem powoduje zwiększenie szybkości unieszkodliwiania nadtlenu wodoru (Denkiewicz i in. 2015).

Celem badań było określenie czy egzogenny askorbinian, dodany do podłoża przy zakładaniu kultur, zwiększa zdolności antyoksydacyjne komórek *C. vulgaris* w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego.



Rycina 20.1. Procesy wzrostowe i metaboliczne, na które wpływa askorbinian

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Latowski i in. 2010.

20.2. Materiał i metody

Materiałem użytym do badań była chlorella zwyczajna (*Chlorella vulgaris* Beijer.), glon z rodziny Trebouxiophyceae. Komórki glonów rosły w sterylnych pożywkach zmodyfikowanych według Knopa o różnej zawartości fosforu: pożywka pełna (+P, kontrola), pożywka z obniżoną o $\frac{1}{4}$ zawartością fosforu (1/4P) w porównaniu do kontroli, pożywka pozbawiona fosforu (-P) (Kozłowska-Szerenos i in. 2003). Wpływ egzogenne askorbinianu badano w kulturach, w których w momencie zakładania hodowli dodawano do podłoża egzogenne askorbinian w stężeniu $1\mu\text{M}$, w wariantach: $+P_{\text{AsA}}$, $\frac{1}{4} P_{\text{AsA}}$, $-P_{\text{AsA}}$. Wzrost kultur odbywał się w komorze fitotronowej w następujących warunkach: długość dnia: 16 godzin, temperatura dnia: $23\pm 2^\circ\text{C}$, temperatura nocy: $20\pm 2^\circ\text{C}$, natężenie promieniowania fotosyntezy czynnego (PAR): $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (źródłem promieniowania były świetlówki Flora i DayLight w stosunku 1:1). Materiał do analiz był pobierany w 5 dobie wzrostu kultur, w 5 godzinie okresu świetlnego. Zawiesinę glonów przesączało przez bibułę filtracyjną (Whatman GF/C) lub wirowano w wirówce (MPW-2500, Polska) przy 10000 g przez 10 minut, w celu oddzielenia komórek od pożywki.

Wzrost kultur określano na podstawie zmian zagęszczenia komórek rosnących w pożywkach. Zagęszczenie komórek oznaczano za pomocą spektrofotometru poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny przy długości fali 680 nm (Kozłowska-Szerenos i in. 2003). Zawartość barwników fotosyntetycznych oznaczano poprzez pomiar absorbancji przy użyciu spektrofotometru (CECIL 2501 BI-QUEST) przy długości fal: 470, 652,4 i 665,2 nm (Wellburn 1994).

Zawartość produktów reakcji z kwasem tiobarbiturowym (MDA, dialdehyd malonowy), wskaźnika peroksydacji lipidów, określano wykorzystując zmodyfikowaną metodę Singh i Verma (1995).

Ekstrakt enzymatyczny do oznaczeń enzymów antyoksydacyjnych przygotowywano homogenizując komórki glonów w buforze ekstrakcyjnym pH 7,8 (0,1mM bufor fosforanowy pH 7,8; 2mM DTT; 0,1 mM EDTA; 1,25mM PEG) oraz 0,05 g PVP. Następnie wirowano przy 11500g przez 15 minut, a supernatant oczyszczono z użyciem kolumn PD10. W otrzymanym ekstrakcie określano zawartość białka (Bradford 1976).

Aktywność katalazy określano jako szybkość zużywania H_2O_2 w mieszaninie reakcyjnej, zawierającej: 0,05 M bufor fosforanowy pH 7,0 i 37,5 mM H_2O_2 oraz ekstrakt enzymatyczny, przy długości fali 240 nm w ciągu 100s (Aebi 1984). Aktywność peroksydazy askorbinianowej określano jako szybkość zużywania nadtlenu wodoru w mieszaninie reakcyjnej, zawierającej: 0,05 M bufor fosforanowy pH 7,0; 10 mM Na_2EDTA ; 0,4 mM H_2O_2 ; 0,5 mM AsA oraz ekstrakt, przy długości fali 290 nm w ciągu 3 minut (Tripathi, Gaur 2004). Aktywność reduktazy glutationowej oznaczano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 0,1M bufor fosforanowy pH 7,8; 3mM $MgCl_2$; 0,5 mM NADPH; 10 mM disulfid glutationu (GSSG) oraz ekstrakt, przy długości fali 340 nm przez 3 minuty (Kumar i in. 2011). Aktywność oksydazy askorbinianowej była określana jako ilość enzymu, która utlenia 1 μ M kwas askorbinowy w ciągu minuty (Gerwin i in. 1974).

20.3. Wyniki

Niedobór fosforu w podłożu spowodował ograniczenie wzrostu komórek *C. vulgaris*, zwłaszcza w kulturach $\frac{1}{4}$ P i -P. Dodanie egzogenego askorbinianu nie wpłynęło znacząco na zagęszczenie komórek zarówno w kulturach +P, jak i $\frac{1}{4}$ P (Tab. 20.1).

Tabela 20.1. Wpływ egzogenego askorbinianu na zagęszczenie komórek, zawartość barwników asymilacyjnych, stężenie białek, zawartość MDA w komórkach *C. vulgaris* z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną zawartością fosforu do ¼ (¼ P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie ± SD

| Warunki wzrostu Badany parametr | bez egzogenego AsA | | | 1µM AsA | | |
|--|--------------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | +P | ¼ P | -P | +P _{AsA} | ¼ P _{AsA} | -P _{AsA} |
| Zagęszczenie komórek (10 ⁸ kom ml ⁻¹) | 1,13 * ±0,20 | 0,97 ±0,18 | 0,79 ±0,14 | 1,36 * ±0,23 | 1,07 ±0,17 | 0,73 ±0,14 |
| Zawartość chlorofilu a+b (10 ⁻⁸ µg kom ⁻¹) | 4,12 ±1,26 | 3,72* ±0,99 | 6,18* ±1,61 | 4,72 ±1,26 | 4,94 ±1,41 | 5,81* ±0,84 |
| Zawartość karotenoidów (10 ⁻⁸ µg kom ⁻¹) | 0,69 ±0,03 | 1,03* ±0,17 | 1,22* ±0,08 | 0,68 ±0,12 | 0,96* ±0,09 | 1,46* ±0,16 |
| Stężenie białek (µg ml ⁻¹) | 61,13 ±14,97 | 86,73* ±9,64 | 97,05* ±17,08 | 100,85 ±21,65 | 111,6 ±29,18 | 90,74 ±16,32 |
| Zawartość TBARS (fmol kom ⁻¹) | 0,44 ±0,08 | 0,79* ±0,15 | 0,82* ±0,16 | 0,39 ±0,13 | 0,54 ±0,23 | 0,42 ±0,12 |

Objaśnienia:

* wyniki istotne statystycznie, dla poziomu istotności p<0,05

Źródło: badania własne.

Najwyższą zawartość chlorofilu a+b zaobserwowano w komórkach z obniżoną do ¼ zawartością fosforu (¼ P), a najniższą w komórkach kontrolnych (+P). Dodanie AsA spowodowało zmniejszenie zawartości chlorofilu a+b w komórkach (¼ P). Najwyższą zawartość karotenoidów zaobserwowano w komórkach z kultur - P, a najniższą w komórkach z kultur kontrolnych (+P). Dodanie AsA spowodowało wzrost zawartości karotenoidów w komórkach -P (Tab. 20.1).

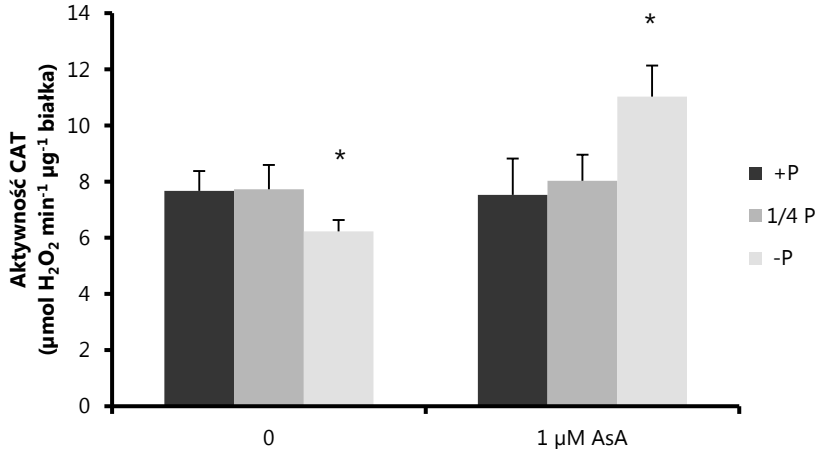
Zaobserwowano, że w ekstrakcie enzymatycznym z komórek -P było najwyższe stężenie białek, natomiast najniższe - z komórek +P. Dodanie AsA spowodowało wzrost stężenia białek w komórkach +P i ¼ P oraz spadek w komórkach z kultur bez fosforu -P (Tab. 20.1).

W komórkach -P odnotowano najwyższą zawartość MDA, wskaźnika peroksydacji lipidów, a najniższą w komórkach z kultur kontrolnych (+P). Egzogeny AsA spowodował spadek zawartości produktów reakcji z TBA w 5 dobie w komórkach +P o ok. 11%, ¼ P o ok. 25% oraz -P o ok. 47% w porównaniu do kontroli (Tab. 20.1).

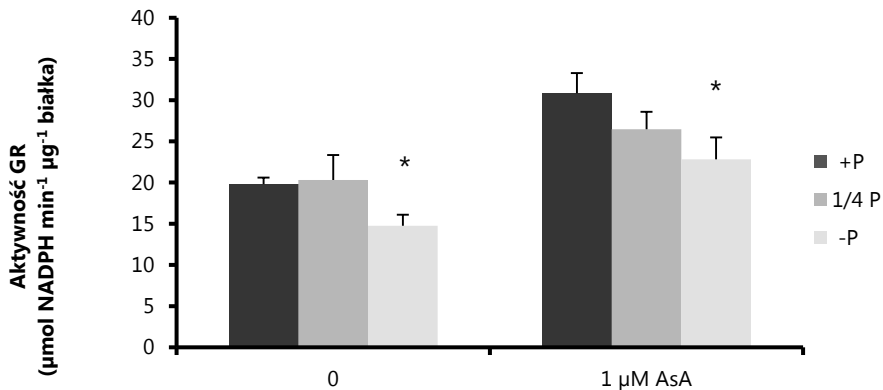
Aktywność katalazy była najwyższa w komórkach +P i ¼ P, a najniższa w komórkach z kultur -P (ok. 19% niższa w porównaniu do kontroli). Dodanie

askorbinianu spowodowało wzrost aktywności w komórkach -P o ok. 77% w porównaniu do kontroli (Ryc. 20.2A).

A



B



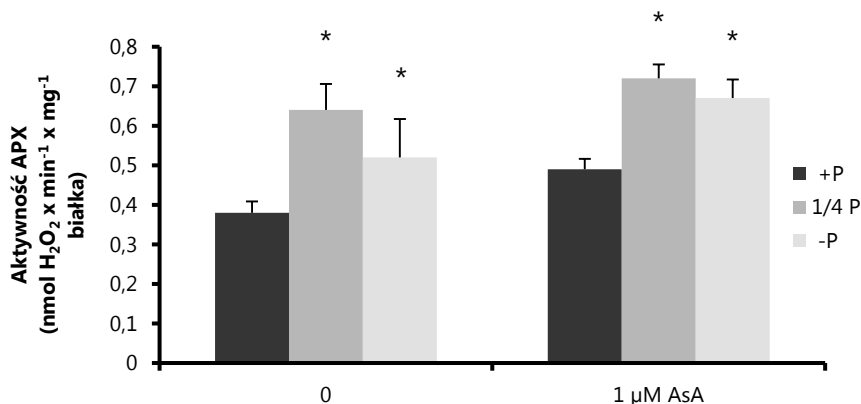
Rycina 20.2.A-B Wpływ egzogenego askorbinianu na aktywność katalazy (CAT) (A); reduktazy glutationowej (GR) (B) w komórkach *C. vulgaris* z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną do ¼ zawartością fosforu (1/4 P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie ± SD

Objaśnienia:

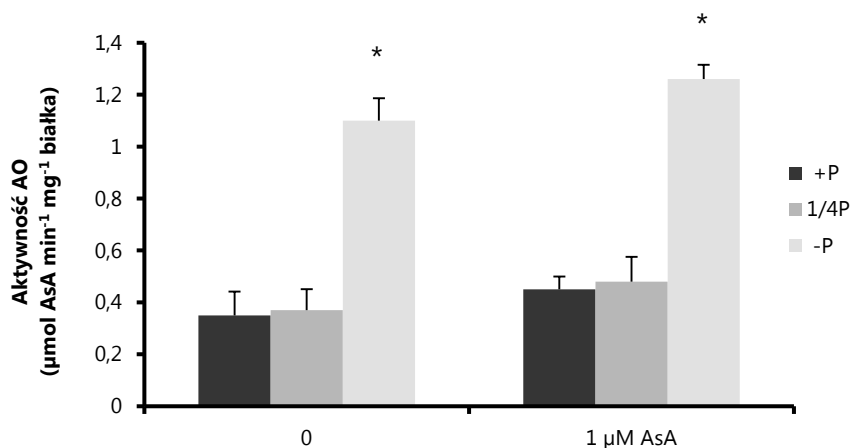
* wyniki istotne statystycznie, dla poziomu istotności $p < 0,05$

Źródło: badania własne.

C



D



Rycina 20.2.C-D Wpływ egzogenego askorbinianu na aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX) (C); oksydazy askorbinianowej (AO) (D); w komórkach *C. vulgaris* z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną do ¼ zawartością fosforu (¼ P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie \pm SD

Objaśnienia:

*wyniki istotne statystycznie, dla poziomu istotności $p < 0,05$

Źródło: badania własne.

Aktywność GR była najwyższa w komórkach +P i 1/4P, zaś najniższa w komórkach -P (o ok. 25% niższa w porównaniu do kontroli). Egzogeny AsA spowodował wzrost aktywności w 5-dniowych kulturach, w komórkach +P o około 56%, ¼ P o ok. 30%, z kolei -P o ok. 55% w porównaniu do kontroli (Ryc. 20.2B).

Aktywność APX była najwyższa w komórkach $\frac{1}{4}$ P, a najniższa w komórkach z kultur kontrolnych (+P). Egzogeny askorbinian spowodował zwiększenie aktywności APX w komórkach +P o ok. 29%, $\frac{1}{4}$ P o ok. 12%, -P o ok. 29% (Ryc. 20.2C).

Aktywność AO jest najwyższa w komórkach -P. Askorbinian spowodował wzrost aktywności AO w komórkach w stosunku do kontroli średnio o ok. 30% w komórkach +P i $\frac{1}{4}$ P, natomiast o ok. 15% w komórkach -P (Ryc. 20.2D).

20.4. Dyskusja

Fosfor jest pierwiastkiem, który jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania komórki roślinnej. W sytuacji, gdy dojdzie do deficytu tego pierwiastka, mogą pojawić się zmiany w intensywności przebiegu różnych przemian metabolicznych, prowadzi również do wzmożonego wytwarzania reaktywnych form tlenu. W warunkach niedoboru fosforu aktywowane są mechanizmy antyoksydacyjne, które są odpowiedzialne za ochronę komórki przed reaktywnymi formami tlenu. Znaczącą rolę w obronie przeciwko wolnym rodnikom odgrywa askorbinian. Przeprowadzone badania miały na celu wykazanie udziału egzogenego askorbinianu w regulacji stresu oksydacyjnego w komórkach *C. vulgaris* w warunkach niedostatecznego żywienia fosforowego.

Zewnętrznym przejawem przystosowania się metabolizmu komórek *C. vulgaris* do niekorzystnych warunków było ograniczenie wzrostu (Kozłowska-Szerenos i in. 2013 c). Uzyskane wyniki wskazują, że dodanie egzogenego askorbinianu prowadzi do zwiększenia zagęszczenia komórek z kultur z deficytem fosforu oraz zmniejszenia zawartości chlorofili a+b w komórkach $\frac{1}{4}$ P (Tab. 20.1), jako wyraz przystosowania do warunków stresowych (Kozłowska-Szerenos i in. 2004). Komórki rosnące w warunkach deficytu fosforu charakteryzowały się również wysoką zawartością karotenoidów (Tab. 20.2), co może być związane z ich udziałem w eliminowaniu anionorodnika ponadtlenkowego oraz tlenu singletowego, powstających w warunkach deficytu fosforu. Egzogeny askorbinian powodował dodatkowo wzrost zawartości karotenoidów w komórkach z deficytem fosforu (Tab. 20.2), co może świadczyć o wzmożonej aktywności cyklu ksantofilowego, w którym AsA jest donorem elektronów w reakcji deepoksydacji wiolaksantyny. Spadek zawartości chlorofilu oraz wzrost zawartości karotenoidów w warunkach deficytu fosforu wykazano również w badaniach prowadzonych na młodych liściach morwy (*Morus alba* L.) (Tewari i in. 2007).

Komórki rosnące w warunkach deficytu fosforu charakteryzowały się zwiększoną zawartością produktów peroksydacji lipidów (Tab. 20.1), spowodowane nagromadzeniem RFT w komórkach z niedoborem fosforu. Podobne zmiany w zawartości MDA obserwowano w badaniach stresu oksydacyjnego w warunkach niedoboru fosforu u fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) (Juszczuk i in. 2001). Dodanie egzogenego AsA prowadziło do zmniejszenia zawartości produktów peroksydacji lipidów w komórkach rosnących w podłożu z ograniczoną zawartością fosforu (Tab. 20.2).

Tabela 20.2. Wpływ egzogenego askorbinianu na badane parametry komórek w kulturach z pełną zawartością fosforu (+P), z obniżoną do ¼ w porównaniu do kontroli zawartością fosforu (¼ P) oraz bez fosforu (-P). (wzrost/spadek/brak zmian zawartości/ aktywności)

| Badany parametr | +P | ¼ P | -P |
|------------------------|------|-----|------|
| Zawartość karotenoidów | - | ↓ | ↑↑ |
| Zawartość TBARS | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ |
| Aktywność CAT | - | ↑ | ↑↑↑↑ |
| Aktywność APX | ↑ | ↑ | ↑↑↑ |
| Aktywność GR | ↑↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑↑ |
| Aktywność AO | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑ |

↑ / ↓ Wzrost/Spadek do 10%
 ↑↑ / ↓↓ Wzrost/Spadek od 11-30%
 ↑↑↑ / ↓↓↓ Wzrost/Spadek od 31-50%
 ↑↑↑↑ / ↓↓↓↓ Wzrost/Spadek powyżej 50%<

Dodanie AsA do podłoża kultur zielenicy spowodowało spadek stężenia białek w komórkach z kultur z deficytem fosforu (Tab. 20.2). Może to świadczyć o tym, że jako silny przeciwutleniacz, obniża poziom stresu oksydacyjnego, przez co zmniejsza się ilość związków białkowych niezbędnych do neutralizacji RFT.

Deficyt fosforu w podłożu kultur powodował spadek aktywności katalazy w komórkach *C. vulgaris* (Ryc. 20.2). Spadek aktywności tego enzymu obserwowano również w badaniach systemu antyoksydacyjnego liści *Camellia sinensis* w odpowiedzi na niedobór fosforu (Lin i in. 2012). Pod wpływem egzogenego AsA następował wzrost aktywności katalazy (Tab. 20.2). Może to mieć związek ze zwiększoną zawartością nadtlenu wodoru w komórce, pełniącego w niej funkcję sygnałną (Mittler i in. 2011).

Jedną z funkcji askorbinianu w komórkach roślinnych jest udział w cyklu Halliwella-Asady. Prowadzone przez autorów pracy badania wykazały, że aktywność APX i GR w komórkach wzrosła w warunkach deficytu fosforu (Ryc. 20.2). Podobne wyniki uzyskano we wcześniejszych badaniach (Kozłowska-Szerenos i in. 2013a). Zwiększona aktywność obu enzymów może świadczyć o wzmożonej aktywności cyklu Halliwella-Asady w warunkach stresu oksydacyjnego, wywołanego deficytem fosforu. Badania prowadzone na roślinach transgenicznym wykazały, że APX i GR odgrywają istotną rolę w zapewnieniu odporności na stres oksydacyjny wywołany również przez takie czynniki stresowe, jak: ozon, susza, metale ciężkie, wysokie natężenie światła, zasolenie (Pang, Wang 2010). Pod wpływem egzogenego AsA następuje wzrost aktywności GR i APX (Ryc. 20.2, Tab. 20.2). Można to tłumaczyć tym, że podwyższony poziom askorbinianu powoduje zwiększenie obrotów cyklu Halliwella-Asady, a tym samym zwiększenie aktywności wysoka aktywności APX, która unieczynnia nadtlenek wodoru oraz aktywności GR, która w cyklu przekształca formę utlenioną askorbinianu do formy zredukowanej.

W badaniach wykazano, że w komórkach -P wzrasta aktywność oksydazy askorbinianowej, biorącej udział w odtwarzaniu formy zredukowanej askorbinianu z formy utlenionej (Ryc. 20.2). Pod wpływem egzogenego AsA dochodzi do wzrostu aktywności oksydazy askorbinianowej w komórkach rosnących w kulturach bez fosforu. We wcześniejszych badaniach stwierdzono wzrost zawartości dehydroaskorbinianu (DHA) w komórkach -P (Kozłowska-Szerenos i in. 2013a). Możliwe, że duża ilość wydzielonego do podłoża DHA, powoduje zwiększenie aktywności oksydazy askorbinianowej w komórkach. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na *Phaseolus aureus* prowadzonych w warunkach stresu wysokiej temperatury (Kumar i in. 2011).

20.5. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że egzogeny askorbinian ogranicza poziom stresu oksydacyjnego, poprzez zmniejszanie zawartości MDA oraz zwiększanie zawartości karotenoidów. Egzogeny askorbinian, w warunkach niedostatecznego żywienia fosforanowego, wzmacnia zdolności antyoksydacyjne komórek *C. vulgaris* poprzez zwiększanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, biorących udział w cyklu Halliwella-Asady: APX i GR oraz CAT. Ważną rolę w sytuacji niedoboru fosforu odgrywa również AO, utrzymująca homeostazę reakcji redoks komórki, o czym świadczy jej zwiększona aktywność.

Literatura

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126.
- Amtmann A., Hammond J.P., Armengaud P., White P.J. 2006. Nutrient sensing and signaling in plants: potassium and phosphorus. *Adv. Bot. Res.*, 43: 209-257.
- Bartosz G. 2003. *Druga twarz tlenu – wolne rodniki w przyrodzie*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254.
- Ciereszko I., Kozłowska-Szerenos B., Leśniewska J., Siegień I. 2008. Dostosowania roślin do niekorzystnych warunków środowiska. [W:] Kolanko K. (red.), *Różnorodność badań botanicznych – 50 lat Białostockiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Botanicznego 1958-2008*. Białystok: Fundacja Ekonomistów Środowiska i Zasobów Naturalnych; Polskie Towarzystwo Botaniczne: 147-167
- Denkiewicz Z., Kozłowska-Szerenos B., Fronckiel U., Ciereszko I. 2015. Wpływ egzogenne go askorbinianu na wzrost i aktywność fotosyntetyczną komórek *Chlorella vulgaris* w warunkach niedoboru fosforu. *Fotosynteza od DNA do ekosystemu. Streszczenia wystąpień ustnych i plakatów Konferencji Sekcji Biochemii i Fizjologii Roślin Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Poznań, 30 czerwca 2015*, s.15.
- Foyer C.H., Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.*, 11: 861-905.
- Foyer C.H., Noctor G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.*, 155: 2-18.
- Gerwin, B., Burstein, S.R., Westley, J. 1974. Ascorbate oxidase. Inhibition, activation, and pH effects. *J. Biol. Chem.*, 249(7): 2005-2008.
- Gest N., Gautier H., Stevens R. 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.*, 64: 33-53.
- Giovannoni J.J., 2007. Completing a pathway to plant vitamin C synthesis. *Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (22): 9109-9110.
- Guz J., Dziaman T., Szpila A. 2007. Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 61:185-198.
- Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannoni J., Kanellis A.K. 2009. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 60: 663-678.
- Ishikawa T., Shigeoka S. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 1143-1154.

- Juszczuk I.M., Malusa M., Rychter A.M. 2001. Phosphate deficiency induced oxidative stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). [W:] Horst W.J., Schenk M.K., Bürkert A. i in. (red.), Development in Plant and Soil Sciences. Plant nutrition – food security and sustainability of agro-ecosystem. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 92: 148-149.
- Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological system: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30: 620-650.
- Kozłowska-Szerenos B., Borowska A., Maleszewski S. 2003. Phosphate-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Pol. J. Nat. Sci. Supplement* 01.
- Kozłowska-Szerenos B., Bialuk I., Maleszewski S. 2004. Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiol. Biochem.*, 42: 403-409.
- Kozłowska-Szerenos B., Babińska M., Nadziejka K., Ciereszko I. 2013a. Regulacja poziomu askorbinianu w komórkach *Chlorella vulgaris* rosnących w warunkach niedoboru fosforu. Interdyscyplinarne i aplikacyjne znaczenie nauk botanicznych Streszczenia wystąpień ustnych i plakatów 56. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Olsztyn, 24-30 czerwca 2013, s. 329.
- Kozłowska-Szerenos B., Ciereszko I. 2013b. Udział askorbinianu w odpowiedzi roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. Różnorodność biologiczna-od komórki do ekosystemu. PTB, Białystok: 69-82.
- Kozłowska-Szerenos B., Tarasiuk P., Ciereszko I. 2013c Vitamin C reduces the symptoms of oxidative stress in *Chlorella vulgaris* cells under Pi deficit. *BioTechnologia* Vol. 94 (3): 380. *Pol. Soc. Exp. Plant Biol.*, September 16-19 2013, Łódź, Poland, the 6th Conference.
- Kumar S., Kaur R., Kaur N., Bhandhari K., Kaushal N., Gupta K., Bains T.S., Nayyar H. 2011. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiol. Plant.*, 33(6): 2091-2101.
- Latowski D., Surówka E., Strzałka K. 2010. Regulatory role of components of ascorbate – glutathione pathway in plant stress tolerance. [W:] Anjum N.A., Umer S., Chan M.-T. (red.), Ascorbate – glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer, Dordrecht Heidelberg, London, New York: 1-53.
- Lin Z.-H., Chen L.-S., Chen R.B., Zhang F.Z. 2012. Antioxidant system of tea (*Camellia sinensis*) leaves in response. *Acta Physiol. Plant.*, 34: 2443-2448.
- Mazid M., Khan T.A., Khan Z.H., Quddusi S., Mohammad F. 2011. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *IJPAES.*, 1(2): 167-184.

- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? Trends Plant Sci., 16: 300-309.
- Nowicka B., Kruk J. 2013. Reaktywne formy tlenu w roślinach-więcej niż trucizna. Kosmos, 62(4): 583-596.
- Pang C.H., Wang B.S. 2010. Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate-glutathione cycle and stress tolerance in plants. [W:] Anjum N.A., Umer S., Chan M.T. (red.), Ascorbate – glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer, Netherlands: 91-113.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Bot.: 1-26.
- Singh D.P., Verma K., 1995. Response of the wild-type and high light-tolerant mutant of *Anacystis nidulans* against photooxidative damage: differential mechanism of high light tolerance. Photochem. Photobiol.. 62: 314-319.
- Stulgis M., Ciereszko I. 2012. Reakcje roślin na deficyt fosforanów. EBiŚ, 4: 47-55.
- Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. J. Integr. Plant. Biol., 49(3): 313-322.
- Tóth S.Z., Schansker G., Garab G. 2013. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. Physiol. Plant., 148: 161-175.
- Tripathi B., Gaur J.P. 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. Planta, 219: 397-404.
- Wellburn A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plant. Physiol., 144: 307-313.
- Zabłocka A., Janusz M. 2008. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. Postępy Hig. Med. Dośw., 62: 118-124.
- Zechmann B., Stumpe M., Mauch F. 2011. Immunocytochemical determination of the sub-cellular distribution of ascorbate in plants. Planta, 233: 1-12.

Odpowiedź lokalna lub systemiczna roślin na uszkodzenia przez fitofagi

Michał Sulkiwicz* / Iwona Ciereszko**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Fizjologii Roślin

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

*e-mail: m.sulkiwicz@uwb.edu.pl

**e-mail: icier@uwb.edu.pl

Streszczenie

Rośliny użytkowe oraz ozdobne są narażone na liczne czynniki stresowe (biotyczne oraz abiotyczne) przyczyniające się do obniżenia produktywności, a także redukcji jakości i ilości plonów. Źródłem zranienia mechanicznego tkanek roślin są często organizmy na nich żerujące, tzw. fitofagi.

Mechanizm percepcji, transdukcji oraz reakcji roślin na stres zranienia mechanicznego, wywołany przez fitofagi, jest złożony oraz mało poznany u wielu gatunków roślin. Komórki roślin, wyposażone są w receptory błonowe, rozpoznające chemiczne wzorce źródła zranienia. Po uszkodzeniu mechanicznym, w komórce generowana jest seria następujących po sobie zmian fizjologicznych i metabolicznych, prowadzących do wywołania odpowiedzi na stres. Reakcja roślin pojawia się w obrębie miejsca uszkodzenia tkanek – jako odpowiedź lokalna, lub w organach, które nie uległy uszkodzeniu – jako odpowiedź systemiczna. Reakcja na poziomie całej rośliny bądź liścia może wystąpić w czasie tygodni lub miesięcy, podczas gdy na poziomie molekularnym – w czasie sekund/minut od zaistnienia czynnika stresowego.

Rośliny wykształciły szereg strategii obronnych przeciwko fitofagom. Mechanizmy obronne dzielone są na bezpośrednie – szybko i negatywnie oddziałujące na roślinożercę, bądź pośrednie – angażujące organizmy z wyższych poziomów troficznych. Obrona bezpośrednia może być realizowana poprzez wykształcenie barier fizycznych (np. włosków, cierni) oraz barier chemicznych (np. wosków, żywic). Rośliny syntezują również liczne metabolity wtórne (np. alkaloidy, terpenoidy, fenylopropanoidy) oraz wyspecjalizowane białka obronne. Pośrednia strategia obronna roślin polega między innymi, na redukcji liczby żerujących fitofagów poprzez wydzielanie lotnych związków organicznych, wabiących ich naturalnych wrogów (parazytoidów lub drapieżników).

Słowa kluczowe: zranienie, obrona, roślinożerca, transdukcja sygnału

21.1. Wstęp

Interakcje pomiędzy roślinami i roślinożercami są jednymi z najbardziej interesujących relacji w świecie ożywionym. Prawie wszystkie gatunki roślin wykształciły mechanizmy obrony przeciwko fitofagom. Najbardziej liczną i różnorodną grupą roślinożerców są owady. Ponad połowa znanych gatunków insektów zgryza bądź wysysa płyn z tkanek roślin. Miliony lat ewolucji doprowadziły do wykształcenia przez rośliny różnorodnych reakcji obronnych, pojawiających się w obrębie miejsca uszkodzenia tkanek, jako odpowiedź lokalna lub w organach, które nie uległy uszkodzeniu – jako odpowiedź systemiczna. Zranienie tkanek prowadzi do szeregu wczesnych i późnych reakcji roślin, do których to działań zaliczane są: depolaryzacja błony komórkowej, synteza cząsteczek sygnałowych (np. jonów Ca^{2+}), wzrost zawartości hormonów (np. kwasu jasmonowego, JA), synteza wtórnych metabolitów, reaktywnych form tlenu), aktywacja genów i powstanie zmian metabolicznych (Maffei i in. 2007). Interakcje pomiędzy roślinami i fitofagami wywierają wpływ na strukturę, dynamikę, bioróżnorodność wszystkich zbiorowisk roślinnych.

21.2. Reakcje roślin na zgryzanie przez fitofagi

Reakcje obronne roślin odgrywają znaczącą rolę w koewolucji roślin i roślinożerców. Wyróżnia się dwie główne kategorie reakcji obronnych roślin. Obrona konstytutywna, obecna stale, polega np. na ciągłej akumulacji toksyn w wakuolach, a obrona indukowana, generowana w wyniku działania czynnika stresowego, np. na uwalnianiu związków lotnych (ang. *Volatile Organic Compounds*, VOC) wabiących naturalnych wrogów fitofagów, co skutkuje obniżeniem liczebności szkodników, ograniczeniem zasięgu uszkodzeń. Dowiedziono, że skład związków lotnych jest zależny od rodzaju czynnika indukującego ich syntezę np. kompozycja VOC tylko po uszkodzeniu mechanicznym liści znacząco się różni od tej po zgryzaniu przez owady (Alborn i in. 1997). Najczęściej spotykanymi składnikami związków lotnych są terpeny (mono-, homo-, seskwi-), pochodne kwasów tłuszczowych (aldehydy, alkohole, estry) oraz fenylopropanowe związki aromatyczne (np. ester metylowy kwasu salicylowego, indole). W procesie syntezy VOC pośredniczą szlaki sygnałowe, zależne od kwasu jasmonowego/etylenu i kwasu salicylowego (Walling 2000).

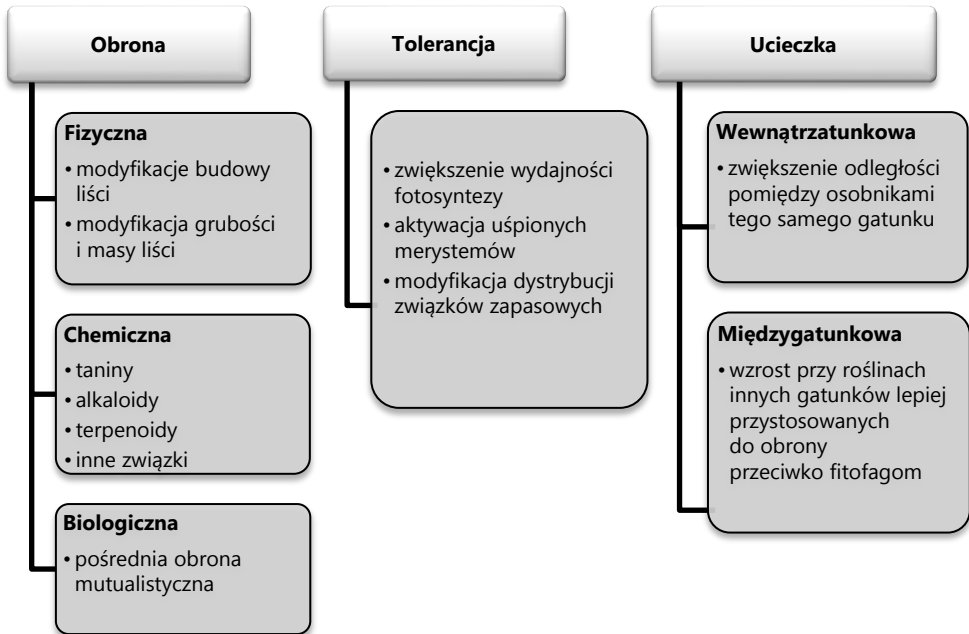
Współdziałanie obu kategorii reakcji odpowiada za efektywną zdolność obrony rośliny przeciwko fitofagom. Rośliny wykształciły również szereg mechanizmów obrony bezpośredniej oraz pośredniej przeciwko fitofagom. Powszechnie znane są

strategie obrony fizycznej, chemicznej oraz biologicznej, minimalizujące szkody powstałe w wyniku żerowania fitofagów (Ryc. 21.1). Obrona fizyczna związana jest głównie ze zmianami morfologicznymi i strukturalnymi organów rośliny. Wówczas prawie wyłącznie modyfikacjom ulega blaszka liściowa, poprzez zmianę grubości oraz masy w przeliczeniu na powierzchnię liścia, wykształcenie specyficznych struktur (np. trichomów, cierni, kolców), zmianę tekstury oraz struktury komórek (Liu i in. 2010). Niektóre gatunki są zdolne do mimikry (np. storczyki), udając kształtem osy lub pszczoły w celu odstraszenia roślinożernych ssaków i owadów (Lev-Yadun, Ne'eman 2012). Chemiczne reakcje obronne związane są głównie z modyfikacjami fizjologicznymi, prowadzącymi do syntezy metabolitów wtórnych (dotychczas poznano ok. 50000 tych związków) (Chen 2008). Substancje obronne wytwarzane przez rośliny można podzielić na siedem głównych grup: 1) terpenoidy; 2) związki fenolowe; 3) związki azotowe; 4) taniny, lignina, celuloza; 5) hormony roślinne i lecytyna; 6) inhibitory proteaz; 7) związki lotne (Kang 1995). Obrona biologiczna polega głównie na mutualizmie rośliny z owadami. Układ jest korzystny dla obu stron: roślina otrzymuje ochronę, a owady – miejsce bytowania i/lub źródło łatwo dostępnego pożywienia. Fiala i Maschwitz (1992) opisali ten fenomen biologiczny na przykładzie myrmekofityzmu, gdzie drzewo *Macaranga Thou.*, w zamian za ochronę przeciwko fitofagom, oferuje mrówkom miejsce do założenia gniazda oraz pokarm.

W toku ewolucji rośliny, oprócz obrony, wykształciły mechanizmy tolerancji uszkodzeń powstałych w wyniku żerowania fitofagów. Zależnie od wielkości powstałych zranień, obserwowany jest efekt kompensacji lub wymiany uszkodzonych tkanek (Strauss i Agrawal 1999). Niska bądź umiarkowana intensywność żerowania fitofagów może skutkować pozytywną odpowiedzią roślin, np. wzrostem biomasy, intensywności fotosyntezy. Rośliny, w celu zminimalizowania strat, uruchamiają mechanizmy prowadzące do zwiększenia intensywności fotosyntezy, aktywacji uśpionych merystemów i modyfikacji dystrybucji związków zapasowych (Gong, Zhang 2014).

Kolejnym mechanizmem odpowiedzi roślin na aktywność fitofagów jest ucieczka, która ma obniżyć prawdopodobieństwo odnalezienia rośliny przez ich naturalnych wrogów. Przykładem są zależności pomiędzy roślinami wrażliwymi i mało odpornymi na aktywność fitofagów a roślinami „pielegniarzami” dobrze przystosowanymi do zgrzyzania. Torroba-Balmori i inni (2015) zauważyli, że *Quercus petraea* i *Quercus pyrenaica*, rosnące w otoczeniu głównie *Genista florida* i *Cytisus scoparius*, charakteryzowały się wyższą przeżywalnością w warunkach stresu biotycznego. Naturalna bariera fizyczna w postaci zarośli skutecznie ograniczała żerowanie fitofagów. Modyfikacja odległości pomiędzy osobnikami tego samego gatunku

również może wpłynąć na przeżywalność rośliny. Jedną z hipotez twierdzi, że siewki bądź młode rośliny rosnące w towarzystwie osobników dorosłych tego samego gatunku mogą być chętniej zgryzane przez generalistów (Connell 1971). Zjawisko to obserwowane jest często w lasach tropikalnych. Rośliny mogą również unikać kontaktu z fitofagami przez szybki, synchroniczny bądź wczesny rozwój liści (Sun i in. 2010).



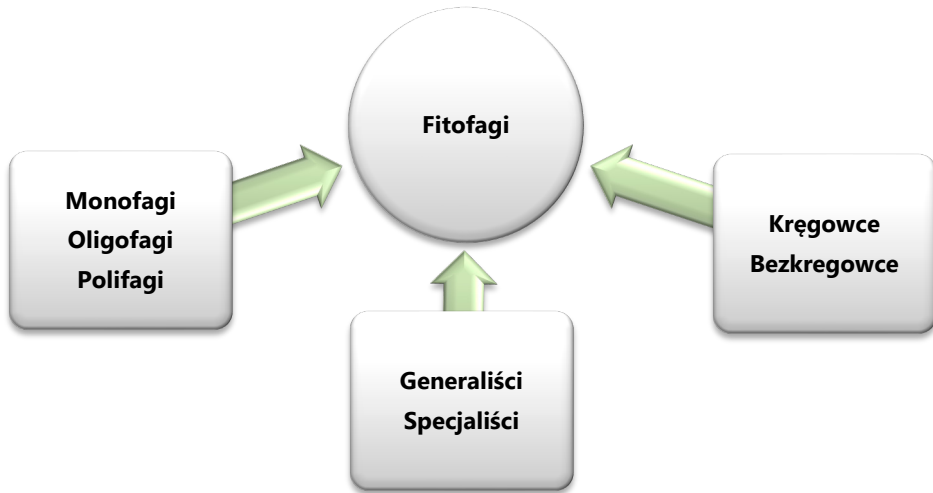
Rycina 21.1. Przykłady odpowiedzi roślin na aktywność roślinożerców

Źródło: zmodyfikowane wg Gong, Zhang 2014

Roślinne metabolity wtórne (często toksyczne dla owadów) mogą hamować rozwój fitofagów, obniżyć odporność immunologiczną roślinożerców na atak parazytoidów, wywoływać zaburzenia neurologiczne, zaburzać wchłanianie związków odżywczych przez roślinożerców. Detoksykacja tych związków jest kosztowna energetycznie. Skupiska roślin mogą zwiększać lub obniżać ich wzajemną zdolność do obrony przeciwko fitofagom (Tsegai i in. 2013). Ponad 75% wszystkich zwierząt to roślinożercy, odgrywający znaczącą rolę w kształtowaniu struktury i funkcji ekosystemów (Cebrian 2004).

21.3. Fitofagi i ich charakterystyka

Szacuje się, że fitofagi konsumują około 15% całkowitej masy roślin klimatu umiarkowanego oraz tropikalnego w skali roku (Gong, Zhang 2014). Istnieje kilka klasyfikacji fitofagów, np. pod względem stopnia specjalizacji diety (Ryc. 21.2). Kiedy fitofagi odżywiają się jednym bądź kilkoma zbliżonymi taksonami roślin, są uważane za monofagi (np. mszyca lucerniana *Therioaphis maculata*), odżywiające się kilkoma gatunkami w obrębie jednej rodziny roślin nazwano oligofagami (np. stonka ziemniaczana *Leptinotarsa decemlineata*) i polifagi (np. chrabąszcz majowy *Melolontha melolontha*) – to organizmy odżywiające się gatunkami więcej niż jedną rodziną roślin. Uważa się, że wraz ze wzrostem specjalizacji co do rodzaju pokarmu roślinnego, fitofagi mogły nabyć umiejętność tolerancji na działania obronne roślin (Ali, Agrawal 2012). Fitofagi można podzielić ze względu na przynależność systematyczną do kręgowców głównie ssaki kopytne, np. jeleń szlachetny (*Cervus elaphus*) oraz bezkręgowców stawonogi, np. szarańcza wędrowna (*Locusta migratoria*) czy mięczaki, np. ślimak winniczek (*Helix pomatia*). Organizmy odżywiające się roślinami można również porządkować zgodnie z preferencjami żywieniowymi na (i) generalistów, do których należy większość ssaków roślinożernych, np. łos euroazjatycki (*Alces alces*), mięczaki, np. pomrów wielki (*Limax maximus*) oraz (ii) specjalistów, do których należą owady, np. gnataz rzepakowiec (*Athalia colibri*) (Morrison, Hay 2011). Roślinożercy wywołują różnorodne reakcje obronne roślin, które mogą zwiększać ich odporność na aktywność fitofagów. Znanych jest kilka typów klasyfikacji odporności roślin na aktywność fitofagów. Odporność pionowa polega na różnej i specyficznej reakcji roślin różnych odmian danego gatunku na atakowanie przez poszczególne biotypy szkodnika. Uważa się, że odporność tego typu jest kontrolowana oligogenicznie, czyli przez jeden bądź kilka genów głównych. Kiedy ta sama odmiana rośliny uprawnej reaguje podobnie na zaatakowanie jej przez różne biotypy szkodnika lub gdy wiele odmian roślin uprawnych jest odpornych na atak różnych biotypów określonego gatunku fitofaga mówi się o odporności poziomej. Jest to tzw. odporność ogólna uwarunkowana poligenicznie (cyt. za: Starck 2002).



Rycina 21.2. Uproszczona klasyfikacja fitofagów

Dotychczas nie dowiedziono jednoznacznie, która grupa fitofagów jest lepiej dostosowana do reakcji obronnych roślin. Uważa się, że generaliści (organizmy żerujące na wielu gatunkach roślin), spożywając dziennie małe ilości różnych toksyn, obniżają koszt bądź ryzyko związane z zatruciem dużą ilością toksyn jednego typu (Freeland, Janzen 1974). Prawdopodobnie możliwe jest to dzięki enzymom wątrobowym neutralizującym dużą ilość pojedynczych lub wielu podobnych chemicznie roślinnych metabolitów wtórnych (Dziba, Provenza 2008). Hipoteza zakłada, że generaliści są zdolni do wstrzymania żerowania na pojedynczym gatunku rośliny jeszcze przed doznaniem negatywnych skutków działania metabolitów wtórnych. Badania Torregrossa i in. (2012) wskazują, że generaliści są mniej wrażliwi na zmianę składu metabolitów wtórnych niż organizmy bardziej wyspecjalizowane. Część specjalistów wykształciło mechanizmy neutralizujące szkodliwe związki chemiczne tylko jednego gatunku rośliny (Haley i in. 2007). Uważa się, że wyspecjalizowane fitofagi wytwarzają enzymy o większej specyficzności do metabolitów wtórnych, będących w wyższym stężeniu danego gatunku roślin niż generaliści (Skopec i in. 2007). Inne badania potwierdzają, że niektóre roślinne metabolity wtórne oddziałują negatywnie zarówno na specjalistów, jak i generalistów (Agrawal, Kurashige 2003).

Nadmierna aktywność fitofagów wywiera negatywny wpływ na funkcjonowanie roślin. Roślinożerstwo jest rodzajem presji doboru naturalnego, będącego siłą

napędową mechanizmu doskonalenia strategii obronnych roślin (Gong i Zhang 2014).

21.4. Percepcja i transdukcja sygnału o uszkodzeniu

Percepcja zranienia, transdukcja sygnału oraz końcowa reakcja roślin na uszkodzenie mechaniczne wywołane aktywnością fitofagów, są procesami złożonymi i niezupełnie poznanymi. Skuteczna reakcja obronna zależy od efektywnego rozpoznania rodzaju zagrożenia. Komórki roślin wyposażone są w liczne receptory błonowe, identyfikujące wzorce chemiczne pochodzące od źródła zagrożenia (ang. *Pattern-Recognition Receptors*, PRR). Fitofagi w trakcie żerowania uszkadzają tkanki roślin oraz wydzielają tzw. elicytory – związki chemiczne indukujące reakcje obronne roślin. Wyróżnia się dwie główne grupy tych związków: wydzielane przez układ pokarmowy fitofagów, np. volicytyna oraz związane z jajami owadów, np. bruchina (Heil 2009). Po rozpoznaniu źródła zranienia powstałego w wyniku żerowania fitofagów, dochodzi do transdukcji sygnału z wykorzystaniem cząsteczek sygnałowych m.in. jonów wapnia, reaktywnych form tlenu czy hormonów. Uważa się, że głównymi cząsteczkami sygnałowymi są jony Ca^{2+} , których normalna zawartość w cytozolu wynosi około 100 nM. W wyniku zranienia, następuje ich uwolnienie (z apoplastu/ścian komórkowych, retikulum endoplazmatycznego, wakuoli, mitochondriów), gdzie zawartość wzrasta do poziomu ok. 1 mM. Cząsteczki sygnałowe, w postaci jonów Ca^{2+} , aktywują szereg białek, np. kalmodulinę czy kinazy białkowe. Uszkodzenie tkanek przez fitofagi może prowadzić do podwyższenia stężenia reaktywnych form tlenu (RFT): nadtlenu wodoru, anionorodnika ponadtlenkowego, tlenu singletowego, rodnika hydroksylogowego. Dowiedziono, że nadtlenek wodoru w wysokim stężeniu pełni funkcję bakterio- i grzybobójczą, w niskim zaś rolę cząsteczki sygnałowej (Łukaszuk, Ciereszko 2012).

Wolne rodniki mogą powstawać w mitochondriach, plastydach, peroksysomach. RFT aktywują kanały wapniowe, prowadząc do zwiększenia zawartości jonów Ca^{2+} w cytozolu. Jasmonidy wraz z etylenem odgrywają kluczową rolę w transdukcji sygnału o zranieniu. Udowodniono, że cząsteczki systeminy oraz oligogalaktouronidy aktywują szlak oktadekainowy, w wyniku którego dochodzi do wzmożonej syntezy kwasu jasmonowego, aktywacji genów i finalnie wywołania odpowiedzi na stres zranienia (Farmer, Ryan 1992). Systemina jest peptydem bogatym w prolinę, wytworzonym z prekursorowego białka, zwanego prosysteminą. Hormon ten jest cząsteczką mobilną i może przemieszczać się floemem. Oligogalakturonidy (OGA) uwalniane z uszkodzonych ścian komórkowych są cząsteczkami mało mobilnymi i prawdopodobnie pełnią funkcję w odpowiedzi lokalnej roślini-

ny na zranienie. Jasmonidy mają strukturę cyklopentanu, syntetyzowane są z utlenionych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Funkcją jasmonidów jest regulacja procesów wzrostu i rozwoju, starzenia się roślin oraz reakcje obronne na stresse, między innymi, uszkodzenie mechaniczne w wyniku zgryzania. Kwas jasmonowy indukuje ekspresję wielu genów związanych z procesami fizjologicznymi, ale też inhibitory proteaz, białka antybakteryjne (defensyny i tioniny), enzymy biorących udział w biosyntezie wtórnych metabolitów, takich jak: terpenoidy, alkaloidy, flawonoidy, glukozytolany. Inhibitory proteaz zakłócają działanie enzymów trawienych owadów, co może prowadzić do niedoboru aminokwasów niezbędnych do funkcjonowania fitofaga. Kwas jasmonowy jest długodystansową cząsteczką sygnałową, przekazującą informację o zranieniu do odległych niezranionych miejsc. Synteza JA rozpoczyna się uwolnieniem kwasu linolenowego z błony chloroplastów, w których znajduje się prekursor JA – kwas 12-ketofitodienowy (OPDA). Następnie OPDA jest transportowany do peroksysomów, w których enzymy katalizujące β -oksydację OPC8:0 oraz reduktaza OPDA przekształcają OPDA do JA. Syntezowany w peroksysomach JA jest transportowany do cytozolu, gdzie ulega modyfikacjom, takim jak: metylacja, glikozylacja, hydroksylacja, dekarboksylacja lub koniugacja z aminokwasami. Przełomowe badania Lee i Howe'a (2003) na mutantach pomidorów wykazały, że odpowiedź systemiczna na zranienie zależy od biosyntezy JA w miejscu zranienia i od percepcji JA w miejscu niezranionym.

Rośliny zaatakowane przez fitofagi najczęściej obniżają wartość odżywczą zranionych tkanek, jednocześnie zwiększając zawartość toksyn. Uszkodzenie tkanek może prowadzić do podwyższenia stężenia reaktywnych form tlenu. Obserwuje się również wzrost stężenia kwasu jasmonowego, będącego kluczowym regulatorem ekspresji genów aktywowanych uszkodzeniem mechanicznym (Schaller 2001). Uważa się, że wraz z etylenem odpowiedzialny jest on za percepcję sygnału zewnątrzkomórkowego o zranieniu i indukcję systemicznej odpowiedzi rośliny.

21.5. Odpowiedź systemiczna i lokalna

Wynikiem żerowania fitofagów jest uszkodzenie mechaniczne tkanek oraz powstanie odpowiedzi systemicznej i/lub lokalnej. W odpowiedzi systemowej, główną rolę odgrywają jasmonidy. Systemiczna reakcja na stres, wywołana uszkodzeniem, polega na modyfikacji metabolizmu i fizjologii rośliny poza miejscem uszkodzenia (Szczegielniak 2007). Dane literaturowe wskazują, że odpowiedź systemiczna, ściśle związana z syntezą związków sygnałnych o zranieniu, jest szybko indukowana (Schillmiller, Howe 2005). Odpowiedź lokalna polega głównie na

uszczelnieniu tkanek i powstrzymaniu patogenów przed wniknięciem do wnętrza roślin przy użyciu, między innymi, pochodnych polisacharydów, wtórnych metabolitów.

Badania Duceppe i in. (2012) proteomu liści pomidora wykazały, że zależnie od typu żerowania fitofaga, obserwowana jest różna ekspresja genów kodujących białka. Liście roślin były cięte nożycami, poddane żerowaniu w wyniku zgryzania przez larwy *Leptinotarsa decemlineata* Say oraz w wyniku wysysania płynu z wiązek przez *Macrosiphum euphorbiae* Thomas. Badano ekspresje genów kodujących białka związane z procesem fotosyntezy, obrony i odpowiedzi na stres oraz syntezy białek. Wykazano, że zwykle uszkodzenie mechaniczne wywołuje najmniej liczne modyfikacje ekspresji genów. Zaobserwowano ogólny wzrost ekspresji genów kodujących białka związane z fotosyntezą oraz obroną i odpowiedzią na stres u roślin poddanych żerowaniu przez owady ssące. Fitofagi zgryzające liście pomidora doprowadziły do odwrotnego efektu. Wyniki te wskazują na obecność różnych receptorów błonowych, dzięki którym roślina jest w stanie rozpoznać typ uszkodzenia oraz wywołać lokalną reakcję obronną.

Quilliam i in. (2006) symulowali uszkodzenie mechaniczne liścia *Arabidopsis thaliana* w celu zbadania lokalnych zmian fluorescencji chlorofilu *a*. Autorzy zaobserwowali wzrost wartości maksymalnej wydajności kwantowej próby adaptowanej do światła (Φ_{PSII}) natychmiast po zranieniu oraz brak różnicy wartości tego parametru pomiędzy liśćmi kontrolnymi i uszkodzonymi po 24 godzinach. Autorzy publikacji stwierdzili, że komórki w czasie doby od zranienia obumierają lub w pełni się regenerują. Obserwacje zespołu częściowo potwierdzają badania pszenicy ozimej Sulkiewicza i Ciereszko (2014). Autorzy wykazali, że uszkodzenie mechaniczne liści pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) nie doprowadza do istotnego uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego.

Badanie wpływu zgryzania liści przez *Manduca sexta* wykazały zahamowanie transportu węglowodanów do korzeni dzikiego tytoniu (*Nicotiana attenuata*) oraz niższy poziom wzrostu elengacyjnego korzeni (Schmidt i in. 2015). Autorzy stwierdzili, że po zranieniu przez fitofagi, roślinie najbardziej korzystne jest wykorzystanie zmagazynowanych zasobów do rozwoju pędu oraz uruchomienia procesów obronnych. Wykazano, że zgryzanie liści wywołuje odpowiedź systemiczną obserwowaną w korzeniach rośliny.

Velikova i in. (2010) zbadali wpływ żerowania *Murgantia histrionica* i *Nezara viridula* na kapuście warzywnej (*Brassica oleracea*) i fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*). Autorzy dokonali pomiarów, między innymi, parametrów fotosyntezy i emisji związków lotnych tuż po zgryzaniu przez owady. Wykazano spadek intensywności fotosyntezy podczas żerowania owadów. Nie stwierdzono związków lotnych wska-

zujących na uszkodzenie tkanek liści. Zaobserwowano wzrost zawartości jasmonidów, ale tylko tuż po zakończeniu żerowania przez owady.

Aktywność roślinożerców wpływa również na zdolności reprodukcyjne roślin. Barber wraz z zespołem (2011) zbadali wpływ żerowania nadziemnego i podziemnego *Acalymma vittatum* na wzrost, pylenie oraz zdolności reprodukcyjne ogórka siewnego (*Cucumis sativus*). Badacze zaobserwowali ogólne zahamowanie wzrostu rośliny po żerowaniu owadów na pędach oraz korzeniach. Skutkiem zgryzania korzeni przez larwy *Acalymma vittatum* była o 35% niższa produkcja żeńskich kwiatów w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Zgryzanie liści nie skutkowało zmianą produkcji ilości kwiatów. Zaobserwowano skrócony czas przebywania pszczoł na kwiatach o 25% – po uszkodzeniu liści oraz dwukrotnie dłuższy czas w porównaniu do kontroli – po uszkodzeniu korzeni. Zranienie liści nie miało wpływu na produkcję owoców, natomiast zgryzanie korzeni skutkowało 38% spadkiem ilości owoców, które były o 25% w porównaniu do roślin kontrolnych. Autorzy wykazali, że zgryzanie korzeni wywołuje odpowiedź systemiczną.

Znane jest zjawisko zwiększenia zdolności obronnych przez rośliny sąsiadujące z osobnikami zasiedlonymi przez szkodniki (Baldwin i in. 2006). Dowiedziono, że jeżeli sygnał związków lotnych jest intensywny, rośliny sąsiednie mogą wygenerować natychmiastową reakcję obronną, natomiast jeśli sygnał jest słaby, może przygotować roślinę na przyszły atak szkodnika (Turlings, Ton 2006). Przykładem jest *Phaseolus lunatus*, rosnące w sąsiedztwie osobników zaatakowanych przez szkodniki. Rośliny odbierały „sygnały ostrzegawcze”, o możliwym ataku fitofaga. Stwierdzono, że fasola, na której żerowały chrząszcze, takie jak: *Cerotoma ruficornis*, *Gynandrobotica* i *Epilachna varivestis*, emitowała związki lotne, które aktywowały mechanizmy obronne u roślin sąsiadujących, polegające na wydzielaniu z nektarników zwiększonej ilości nektaru, gdy same zostały zaatakowane przez chrząszcze (Kost, Heil 2006).

21.6. Podsumowanie

Rośliny, w toku ewolucji wykształciły różnorodne mechanizmy reakcji na uszkodzenia przez fitofagi. Receptory błonowe, obecne w komórkach roślin, umożliwiają precyzyjne rozpoznanie typu uszkodzenia oraz rozpoczęcie transdukcji sygnału o zranieniu. Uważa się, że oprócz jonów Ca^{2+} jednymi z głównych cząsteczek sygnałowych, są jasmonidy zaangażowane w regulację ekspresji genów reakcji na stres. Ostatnim etapem reakcji na zranienie, wywołanym aktywnością fitofagów

jest powstanie odpowiedzi lokalnej oraz systemicznej. Najczęściej obserwowanymi strategiami odpowiedzi w królestwie roślin są obrona, tolerancja i ucieczka. Rośliny wytwarzają liczne bariery fizyczne (kolce, ciernie, igły), chemiczne (wtórne metabolity) oraz biologiczne (relacje mutualistyczne z innymi organizmami) chroniące je przed aktywnym żerowaniem fitofagów. Dowiedziono, że odpowiedź na zgryzanie przez roślinożerców jest bardzo różnorodna i niespecyficzna dla wielu gatunków roślin.

Literatura

- Agrawal A.A. 2000. Specificity of induced resistance in wild radish: causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. *Oikos* 89:493-500.
- Agrawal A.A, Kurashige N.S. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J Chem. Ecol.*, 29: 1403-1415.
- Alborn H.T., Turlings T.C.J., Jones T.H., Stenhagen G., Loughrin J.H., Tumlinson J.H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276: 945-949.
- Alij. G., Agrawal A.A. 2012. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends Plant Sci.*, 17: 293-302.
- Baldwin J.A., Bowring S.A., Williams M.L., Mahan K.H. 2006. Geochronological constraints on the evolution of high-pressure felsic granulites from an integrated electron microprobe and geochemical study. *Lithos*, 88: 173-200.
- Barber N.A., Adler L.S., Bernardo H.L. 2011. Effects of above-and belowground herbivory on growth, pollination, and reproduction in cucumber. *Oecologia*, 165: 377-386.
- Cebrian J. 2004. Role of first-order consumers in ecosystem carbon flow, *Ecol. Lett.*, 7: 232-240.
- Chen M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci.*, 15: 101-114.
- Connell J.H. 1971. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees, [W:] Boer P.J.D., Gradwell G.R. (red.), *Dynamics of Populations*, Centre for Agricultural Publication and Documentation, Wageningen., 298-312.
- Duceppe M.O., Cloutier C., Michaud D. 2012. Wounding, insect chewing and phloem sap feeding differentially alter the leaf proteome of potato, *Solanum tuberosum* L. *Proteome sci.*, 10: 1-14.
- Dziba L.E., Provenza F.D. 2008. Dietary monoterpene concentrations influence feeding patterns of lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 109: 49-57.

- Farmer E.E., Ryan C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129-134.
- Fiala B., Maschwitz U. 1992. Food bodies and their significance for obligate ant-association in the tree genus *Macaranga* (*Euphorbiaceae*). *Bot. J. Linn. Soc.*, 110: 61-75.
- Freeland W.J., Janzen D.H. 1974. Strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. *Amer. Nat.*, 269-289.
- Gong B., Zhang G. 2014. Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense. *Acta Ecol. Sin.*, 34: 325-336.
- Haley S.L., Lamb J.G., Franklin M.R., Constance J.E., Dearing D.M. 2007. Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in juniper (*Juniperus monosperma*) by specialist and generalist woodrat herbivores, genus *Neotoma*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 146: 552-560.
- Heil M. 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends Plant Sci.* 14: 356-363.
- Kang L. 1995. The chemical defenses of plants on phytophagous insects, *Chin. Bull. Bot.*, 12: 22-27.
- Kost C., Heil M. 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *J. Ecol.*, 94: 619-628.
- Lee G.I., Howe G.A. 2003. The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J.*, 33: 567-576.
- Lev-Yadun S., Ne'eman G. 2012. Does bee or wasp mimicry by orchid flowers also deter herbivores? *Arthropod Plant Interact.*, 6: 327-332.
- Liu F.J., Xiang S., Yang X.C., Sun S.C. 2010. Comparison of leaf mass per area, photosynthetic capacity and chemical defense traits of four evergreen broad-leaved tree species under contrasting light conditions, *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 16: 462-467.
- Łukaszuk E., Ciereszko I. 2012. Odpowiedź fizjologiczna roślin na uszkodzenia mechaniczne. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa*, 4: 56-62.
- Maffei M.E., Mithöfer A., Boland W. 2007. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends PlantSci.*, 12: 310-316.
- Morrison W.E., Hay M.E. 2011. Herbivore preference for native vs. exotic plants: generalist herbivores from multiple continents prefer exotic plants that are evolutionarily native. *PLoS One*, 6:e17227.
- Quilliam R.S., Swarbrick P.J., Scholes J.D., Rolfe S.A. 2006. Imaging photosynthesis in wounded leaves of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp.Bot.*, 57: 55-69.
- Schaller M.D. 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *BBA-Mol. Cell. Res.*, 1540: 1-21.

- Schillmiller A.L., Howe G.A. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 369-377.
- Schmidt L., Hummel G.M., Thiele B., Schurr U., Thorpe M.R. 2015. Leaf wounding or simulated herbivory in young *N. attenuata* plants reduces carbon delivery to roots and root tips. *Planta*, 241: 917-928.
- Skopec M.M., Haley S., Dearing M.D. 2007. Differential hepatic gene expression of a dietary specialist (*Neotoma stephensi*) and generalist (*Neotoma albigula*) in response to juniper (*Juniperus monosperma*) ingestion. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 2: 34-43.
- Starck Z. 2002. Wpływ stresów abiotycznych na plonowanie roślin. [W:] Górecki R., Grzebiak S. (red.), *Fizjologia plonowania roślin*, UWM, Olsztyn, 447-486.
- Strauss S., Agrawal A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 179-185.
- Sulkiewicz M., Ciereszko I. 2014. Odpowiedź *Triticum aestivum* L. na zranienie mechaniczne. [W:] G. Łaska (red.), *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów*. Białystok, Polskie Towarzystwo Botaniczne: 263-273.
- Sun C., Cai Y.L., Liu Z.G., Yang L. 2010. Leaf growth of *Castanopsis fargesii* in evergreen broad-leaved forest in Tiantong National Forest Park of Zhejiang, China. *J. Ecol. Rural Environ.*, 26: 215-219.
- Szczegieliński J. 2007. Szlaki przekazywania sygnału w reakcji roślin na zranienie. *Postępy Biochemii*, 2: 121-132.
- Torregrossa A.M., Azzara A.V., Dearing M.D. 2012. Testing the diet-breadth trade-off hypothesis: differential regulation of novel plant secondary compounds by a specialist and a generalist herbivore. *Oecologia*, 168: 711-718.
- Torroba-Balmori P., Zaldívar P., Alday J.G., Fernández-Santos B., Martínez-Ruiz C. 2015. Recovering *Quercus* species on reclaimed coal wastes using native shrubs as restoration nurse plants. *Ecol. Eng.*, 77: 146-153.
- Tsegai A.T., Wang L., Wang D., Huang Y., Lin H., Li J., Liu C. 2013. Effects of spatial distribution on plant associational defense against herbivory. *Basic Appl. Eco.*, 14: 680-686.
- Turlings T.C.J., Ton J. 2006. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 421-427.
- Velikova V., Salerno G., Frati F., Peri E., Conti E., Colazza S., Loreto F. 2010. Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. *J. Chem.Ecol.*, 36: 629-641.
- Walling L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.*, 19: 195-216.

Marta Talarek* / Iwona Biziewska / Andrzej Bajguz**

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Zakład Biochemii Roślin i Toksykologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
*e-mail: marta_1990r@wp.pl
**abajguz@uwb.edu.pl

Streszczenie

Rośliny rozwijające się w naturalnych warunkach, narażone są różnorodnie biotyczne czynniki stresowe, takie jak: działanie patogenów grzybowych, bakteryjnych i wirusowych. Patogeny przyczyniają się do powstawania wielu chorób roślin, prowadzą nawet do ich śmierci. Jednak rośliny wykształciły szereg mechanizmów obronnych. Jednym z wielu mechanizmów odporności jest reakcja nadwrażliwości, która polega na obumieraniu komórek lokalnie w miejscu inwazji, co prowadzi do zablokowania ataku patogena. W regulacji reakcji nadwrażliwości stwierdzono udział, między innymi, hormonów roślinnych, np. brassinosteroidów (BR), które ze względu na wysoką aktywność biologiczną, są ważnymi regulatorami wielu procesów zachodzących w roślinach. Wpływają na metabolizm, wzrost i rozwój roślin, a także pełnią funkcję ochronną przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Współdziałają synergistycznie z innymi fitohormonami, np. etylenem, kwasem jasmonowym czy kwasem salicylowym, które decydują o nabyciu przez rośliny odporności na infekcje. Brassinosteroidy regulują aktywność genów związanych z wydłużaniem ściany komórkowej oraz wpływają na aktywność enzymów modyfikujących ścianę komórkową, np. acetyloesterazę. Inicjują biosyntezę celulozy w ścianach komórkowych *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. zainfekowanych patogenami oraz przyspieszają działanie systemu antyoksydacyjnego. Brassinosteroidy uczestniczą w mechanizmach indukcji genów i transdukcji sygnałów związanych z odpornością nabytą i systemiczną oraz syntezą białek PR (*Pathogenesis Related*). Stwierdzono, że pod wpływem BR podnosi się odporność tytoniu zainfekowanego wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) ogórka – *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci czy pomidora – *Botrytis cinerea* Pers. Ponadto hormony te indukują ekspresję genów kodujących syntezę peroksydazy oraz białek związanych z przebiegiem patogenezą PR-3 (chitynazy). W liściach jęczmienia zainfekowanego grzybem *Helminthosporium teres* Sacc., a następnie traktowanych BR, stwierdzono podwyższony poziom peroksydazy oraz wolnych kwasów fenolokarboksylowych.

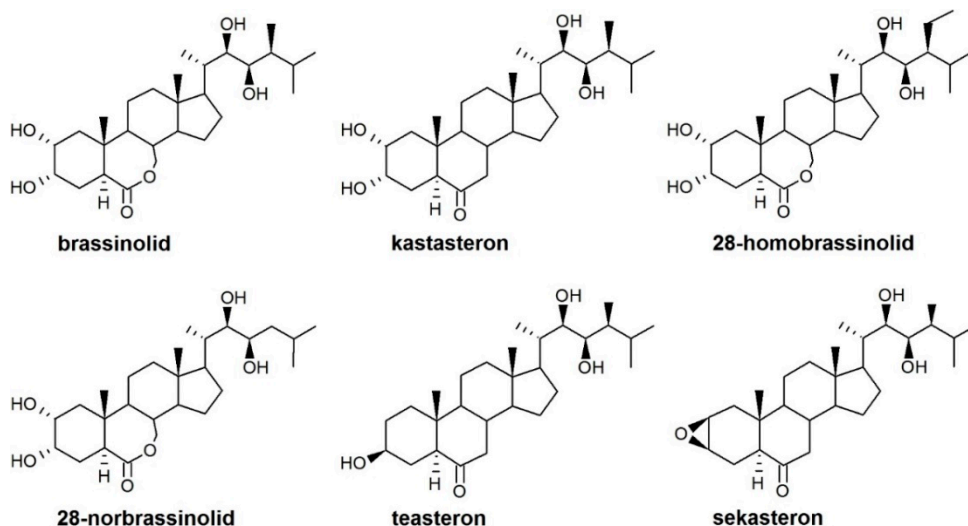
Słowa kluczowe: hormony roślinne, reakcje obronne roślin, bakterie, wirusy, grzyby

22.1. Wstęp

Rośliny występujące w naturalnym środowisku przyrodniczym narażone są na działanie wielu niekorzystnych czynników. Prawidłowe funkcjonowanie tych organizmów uzależnione jest od utrzymania homeostazy organizmu. Ważną rolę w kontroli reakcji roślin na stres pełnią fitohormony, m.in. kwas abscysynowy, jasmoniany, salicylany i brassinosteroidy (BR) (Phan Tran, Pal 2014). Praca przedstawia rolę BR w odpowiedzi roślin na stres wywołany działaniem patogenów. Niemniej jednak, nie sposób pominąć aktywności biologicznej tych fitohormonów w roślinach nienarażonych na jakikolwiek czynnik stresowy.

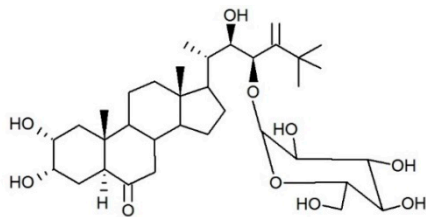
22.2. Aktywność biologiczna brassinosteroidów

Brassinosteroidy stanowią powszechnie występującą grupę steroidowych hormonów roślinnych. W 1979 roku jako pierwszy został wyizolowany brassinolid (BL). Od tego czasu poznano już 65 naturalnie występujących BR w postaci wolnej (Ryc. 22.1) oraz 5 koniugatów BR z kwasami tłuszczowymi oraz cukrami (Ryc. 22.2).

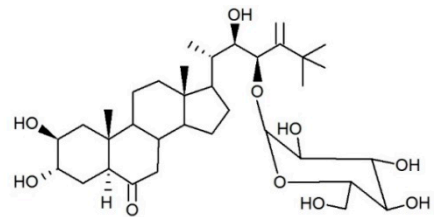


Rycina 22.1. Wybrane wzory brassinosteroidów w postaci wolnej

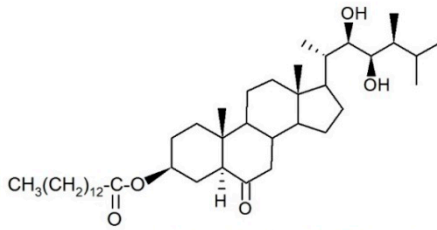
Źródło: na podstawie: Bajguz, Tretyn 2003a,b



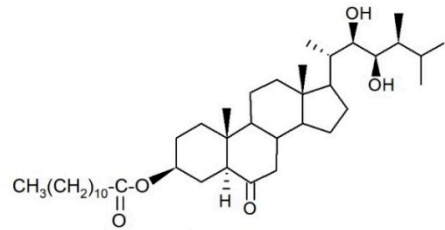
**23-O-β-glukopiranozylo-
-25-metylodolichosteron**



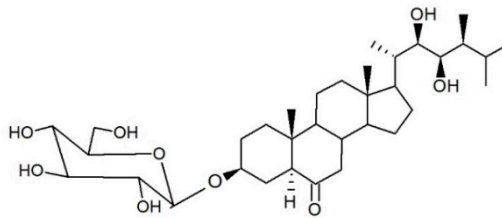
**23-O-β-glukopiranozylo-2-epi-
-25-metylodolichosteron**



3-mirystynian teasteronu



3-laurynian teasteronu



3-O-β-D-glukopiranozyd teasteronu

Rycina 22.2. Wzory koniugatów brassinosteroidowych

Źródło: na podstawie: Bajguz, Tretyn 2003a,b

Obecność tych hormonów stwierdzono u roślin okrytonasiennych, nagona-siennych, paprotników, mszaków oraz glonów (Bajguz, Tretyn 2003a,b; Bajguz 2011). Występują one w różnych częściach roślin w stężeniach tysiąckrotnie niż-szych niż inne fitohormony. Ze względu na wysoką aktywność biologiczną są waż-nymi regulatorami wielu procesów zachodzących w roślinach. Fitohormonom tym, przypisuje się również regulację mechanizmów ochronnych u roślin narażonych na stres biotyczny (działanie patogenów grzybowych, bakteryjnych czy wirusowych) oraz abiotyczny (działanie metali ciężkich, stres solny, wodny, termiczny, oksyda-cyjny czy niedobór tlenu). Brassinosteroidy mogą również współdziałać z innymi fitohormonami, zwiększając szanse rośliny zainfekowanej na obronę przed patoge-nami lub czynnikami wywołującymi stres abiotyczny (Bajguz, Hayat 2009).

Brassinosteroidy, ze względu na wysoką aktywnością biologiczną, pełnią funkcję regulacyjną wielu procesów zachodzących w roślinach. Wpływają przede wszystkim na strukturę i różnicowanie komórek. Mogą oddziaływać na wydłużanie komórek poprzez stymulację ekspresji genów związanych z rozbudową ściany komórkowej. Badania prowadzone na mutantach ryżu dowodzą, iż niedobór BR prowadzi do zmian w rozwoju, co przejawia się zaburzeniami w organizacji i wydłużaniu komórek (Hong i in. 2004). Brassinosteroidy wpływają również na białka XET (endotransglukozyłazy ksyloglukanu), które są odpowiedzialne za ksyloglukany – cukry złożone, budujące ściany komórkowe roślin. Badania Yanga i in. (2011) wykazały, iż wczesne etapy wydłużania komórek w *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. oraz soi zwyczajnej (*Glycine max* (L.) Merr.) inicjowane są przez BR. Istotnym elementem w procesie wydłużania komórek jest ciągłe dostarczanie komponentów do budowy ściany komórkowej oraz odpowiednie ukierunkowanie mikrofibryl celulozowych, które z kolei wpływają na odpowiednią orientację mikrotubul. Badania przeprowadzone na mutantach *Arabidopsis thaliana*, charakteryzujących się zaburzeniami w prawidłowej orientacji mikrotubul kory dowodzą, iż egzogenne BR przywracają prawidłową ich orientację. Ponadto, BR przyspieszają wzrost mikrotubul w siewkach ryżu siewnego (*Oryza sativa* L.) (Lisso i in. 2005). Fitohormony te wpływają również na podziały komórkowe w zielenicy *Chlorella vulgaris* Beyerinck. Zaobserwowano, iż BR 2-3-krotnie zwiększały intensywność podziału komórek glonu (Bajguz, Czerpak 1998).

Brassinosteroidy są odpowiedzialne również za prawidłowy metabolizm roślin, zaangażowane są w proces transkrypcji i translacji, poprzez regulację ekspresji odpowiednich genów i wzmacnianie aktywności enzymów. Badania przeprowadzone na *Chlorella vulgaris* wykazały, że BR stymulują wzrost zawartości białek oraz kwasów nukleinowych, co przejawia się niezwykle wysoką szybkością procesów transkrypcji i translacji (Bajguz 2000). W zależności od gatunku oraz stadium rozwojowego rośliny, BR mają różny wpływ na proces fotosyntezy. Bardzo ważnym czynnikiem jest odpowiednie stężenie hormonów, które znacznie zwiększają przepustowość aparatów szparkowych. Badania dowodzą, iż BR zwiększają intensywność fotosyntezy netto w pomidorze zwyczajnym (*Lycopersicon esculentum* Mill.) oraz ogórku siewnym (*Cucumis sativus* L.) (Ali i in. 2006; Kang i in. 2009; Hayat i in. 2010). Ponadto, wzrost szybkości procesu fotosyntezy zaobserwowano po zastosowaniu 28-homobrassinolidu (HBL) na fasolę mung (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), pszenicę (*Triticum* sp.), gorczycę (*Sinapis* sp.) oraz rzodkiew zwyczajną (*Raphanus sativus* L.) (Hayat i in. 2011).

Brassinosteroidy pełnią znaczącą rolę w transporcie asymilatów do komórek roślinnych, w tym w niezbędnej do prawidłowego rozwoju wody. Transport wody

w roślinach odbywa się za pomocą kanałów białkowych, tzw. akwaporyn. Badania przeprowadzone na dwóch mutantach (*cpd*, *bri1*) oraz dzikim typie *Arabidopsis thaliana*, które miały na celu określenie skuteczności akwaporyn, wykazały, iż protoplasty hypokotyli mutantów mają znacznie mniejszą pojemność wody niż protoplasty w dzikim typie *Arabidopsis thaliana*. Skuteczność kanałów białkowych potwierdzono tylko w przypadku mutantu *cpd*, u którego BR aktywowały przewodnictwo wodne błon plazmatycznych (Pereira-Netto 2011).

Brassinosteroidy mogą intensyfikować kiełkowanie nasion oraz ich wzrost. Mogą poprawiać zdolność do kiełkowania wielu roślin, np. eukaliptusa kamadulskiego (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), pieprzycy siewnej (*Lepidium sativum* L.), ryżu, pomidora, pszenicy oraz tytoniu (*Nicotiana* sp.). Wiadomo również, że BR wpływają na wydłużanie hipokotyli sadzonek kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.) oraz kapusty sitowatej (*Brassica juncea* (L.) Czern.) (Hayat i in. 2011).

Brassinosteroidy w ziarnach pyłku występują w najwyższych stężeniach. Potwierdza to ich znaczącą rolę we wzroście i prawidłowym rozwoju łagiewki pyłkowej. Badania Castle i in. (2003) wskazują, iż w ciemności oraz przy optymalnych warunkach oświetlenia, fitohormony te miały większy wpływ na wydłużanie łagiewki pyłkowej niż auksyny. Związki te również wywierają wpływ na kwitnienie roślin (Manzao i in. 2011). Ponadto, korzystnie oddziałują na ekspresję płci podczas rozkwitu, a także odgrywają znaczącą rolę w kontrolowaniu determinacji płci (Hartwing i in. 2011). Z kolei, egzogenne stosowanie BR prowadzi do zmniejszenia liczby kwiatów bądź może całkowicie zahamować ich kwitnienie. Co ważne, BR mogą przyspieszać starzenie się owoców poprzez intensyfikację produkcji etylenu (Hayat i in. 2011). Ponadto, steroidy mogą regulować starzenie się szczawiu (*Rumex* sp.), rzepieni (*Xanthium* sp.) oraz liści pszenicy (Saglam-Cag 2007). Nawet niewielka ilość BR w roślinach jest zdolna do inicjacji wzrostu wydłużeniowego korzeni. Brassinosteroidy, współdziałając z auksynami, mogą stymulować wzrost korzeni przybyszowych (Rietz i in. 2010). Ponadto, mogą wpływać na rozwój korzeni (Kartal i in. 2009) poprzez zwiększenie transportu auksyn (Gomes 2011).

22.3. Brassinosteroidy a odpowiedź roślin na biotyczne czynniki stresowe

Brassinosteroidy, oprócz wpływu na wzrost, rozwój i metabolizm roślin, uczestniczą w mechanizmach obronnych. Liczne badania dowodzą, iż chronią rośliny przed chorobotwórczym działaniem patogenów grzybowych, wirusowych czy

bakteryjnych. Brassinosteroidy mają ogromny wpływ na zmiany zachodzące w ścianie komórkowej, która przekształca się pod wpływem działania patogenu, w celu obrony przed jego niekorzystnym działaniem. Fitohormony te inicjują biosyntezę celulozy, a zwiększone odkładanie celulozy w ścianie komórkowej może utrudniać dostęp patogenom (Nafisim i in. 2015). Potwierdzają to badania na mutantach *Arabidopsis thaliana*, wskazujące, iż mutanty z niedoborem BR zawierają mniej celulozy niż rośliny typu dzikiego (Xie i in. 2011). Ponadto, BR regulują szereg genów związanych z wydłużaniem ściany komórkowej oraz wpływają na enzymy modyfikujące ścianę komórkową, takie jak: endotransglukosylazę ksyloglukanu, acetyloesterazę, a także białka – ekspansyny (Goda i in. 2002). Co ciekawe, nadekspresja białek BIL2, zaangażowanych w sygnalizację i ekspresję genów BR, powoduje wydłużanie komórek nawet w obecności inhibitorów biosyntezy tych fitohormonów (Bethke i in. 2014). Badania Wolfa i in. (2012) dowodzą, iż proces metyloestryfikacji pektyn jest bezpośrednio związany z wewnątrzkomórkową kaskadą sygnalizacyjną BR oraz homeostaza sygnalizacji tych fitohormonów ma ogromny wpływ na biosyntezę komórek ściany komórkowej.

Brassinosteroidy uczestniczą w mechanizmach indukcji genów i transdukcji sygnałów związanych z odpornością nabytą oraz syntezą białek PR (*Pathogenesis Related*). Stwierdzono, iż podnoszą odporność tytoniu zainfekowanego wirusem mozaiki tytoniowej (TMV), ogórka – *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci czy pomidora – *Botrytis cinerea* Pers, narażonych na działanie patogenów grzybowych. Badania dowodzą, iż w wyniku traktowania nasion firletki lepkiej (*Lychnis viscaria* L.) ekstraktem BR, zaobserwowano indukcję ekspresji genów kodujących syntezę peroksydazy, β -1,3-glukanazy oraz białek związanych z przebiegiem patogenezы PR-3 (chitynazy) (Hayat i in. 2011). Egzogenne zastosowanie BL wywołuje odporność ryżu na grzyby *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr i *Xanthomonas oryzae* (Ishiyama) Swings et al. oraz wytrzymałość tytoniu na grzyba *Oidium monilioides* (Nees) Link, przeciwko wirusowi TMV, a także niewrażliwość na bakterie *Pseudomonas syringae* Van Hall (Nakashita i in. 2003; Hayat i in. 2011). Dodatkowo, BL zwiększa odporność bawełny na nekrozy spowodowane przez patogen grzybowy *Verticillium dahlia* Kleb. (Gao i in. 2013). Podobnie, zastosowanie 24-epibrassinolidu (EBL) znacznie zmniejsza ryzyko choroby liści jęczmienia, spowodowanej przez grzyby *Helminthosporium teres* Sacc. (Volynets i in. 1997). Wyjątkowa sytuacja dotyczy oddziaływania BR na pasożytniczego grzyba *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry, przyczyniającego się do występowania zarazy ziemniaczanej. Badania Vasyukovej i in. (1994) prezentują stymulujący wpływ HBL oraz EBL w zakresie stężeń 10^{-16} – 10^{-8} M, na intensywność formowania się spor grzyba oraz wzrost strzępek. Dodatkowo, hormony steroidowe osłabiają system

immunologiczny tkanek ziemniaka, co pozwala na rozprzestrzenienie się pasożyta, ostatecznie powodując śmierć rośliny. Z kolei, doświadczenia Khripacha i in. (1996) wskazują na fakt, iż EBL zmniejsza do 34% częstość występowania zarazy ziemniaczanej wywołanej grzybem *Phytophthora infestans*.

Reaktywne formy tlenu (ROS) są niezbędnymi regulatorami procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Wpływają, między innymi, na sprzężenie oksydacyjno-fosforylacyjne, które zachodzi w mitochondriach i dostarcza energii komórkom. Ponadto, uczestniczą w apoptozie – czyli zaprogramowanej śmierci komórek oraz stanowią ważny składnik przekazu sygnału w organizmach żywych. Gwałtowny wzrost ROS w roślinach, spowodowany, np. działaniem patogenów, może prowadzić do poważnych uszkodzeń w strukturze i funkcjonowaniu komórek. Rośliny jednak nie są bezbronne wobec stresu oksydacyjnego, wywołanego działaniem patogenów i bronią się przed nim zwiększając aktywność układu antyoksydacyjnego (Neill i in. 2002). Liczne badania potwierdzają znaczącą rolę BR w regulacji aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej chroniących *Arabidopsis thaliana* czy ryż przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Goda i in. 2002; Xia i in. 2009). Brassinosteroidy stymulują również odporność *Arabidopsis thaliana* przed wirusem mozaiki ogórka poprzez wzmocnienie działania systemu antyoksydacyjnego oraz łagodzenie szkód wywołanych działaniem patogenu (Zhang i in. 2015).

Istotną rolę podczas ataku patogenów pełnią elicytory (tzw. wywoływacze), które w wyniku połączenia ze swoistymi receptorami komórkowymi, uruchamiają reakcje biochemiczne, mające na celu syntezę białek odpowiedzialnych za obronę roślin przed dalszym rozprzestrzenianiem się patogenów. Elicytory mogą pochodzić bezpośrednio od patogenu (np. produkt białkowy AVR) bądź ich rolę mogą pełnić niektóre metabolity komórek roślinnych, np. hepta- β -glukozyd. Komórkowe sygnały chemiczne, takie jak: etylen, kwas jasmonowy (JA), kwas salicylowy (SA), pełnią kluczową rolę w mechanizmach aktywacji genów komórek zainfekowanych patogenem. Związki te, wraz z udziałem przekaźników typu cGMP, cAMP, bezpośrednio wpływają na aktywność fosfatyzacji oraz kinaz, od których zależy intensywność ekspresji genów odpowiadających za odporność roślin (Bajguz, Tretyn 2003b; Bajguz, Hayat 2009).

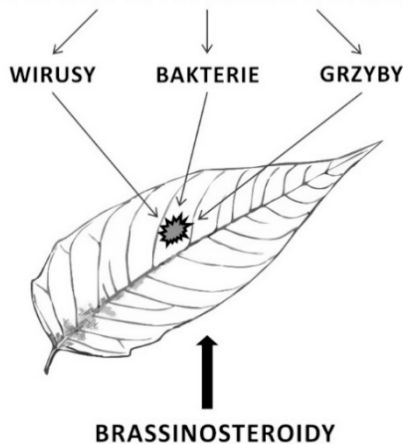
Brassinosteroidy, w celu ochrony roślin przed patogenami, mogą działać synergistycznie z innymi fitohormonami, między innymi, etylenem, JA czy SA, które decydują o nabyciu przez rośliny odporności na infekcje. Brassinosteroidy wpływają na syntezę etylenu w tkankach potraktowanych elicytorem grzybowym, jak również zainfekowanych wirusem. Etylen może być przekaźnikiem bodźców związanych z uszkodzeniem tkanki, wpływając na zmiany struktury ściany komórkowej

(lignifikacja-zwiększenie usztywnienia ściany komórkowej). Może również indukować syntezę enzymów zdolnych do niszczenia ścian komórkowych większości grzybów (chitynazy) oraz hamować działanie niektórych enzymów grzybowych, niszczących roślinne ściany komórkowe (białka PGIP). Egzogenne BR zwiększają zawartość wolnych kwasów fenolokarboksylowych, takich jak: kwas wanilinowy, protokatechusowy, *trans*- i *cis-p*-kumarowy, ferulowy, *p*-hydroksybenzoesowy. Z kolei kwasy fenolowe, w tym SA, pełnią znaczącą rolę w odpowiedzi roślin na choroby wywołane przez patogeny. Biorą udział w mechanizmach transdukcji sygnałów oraz indukcji genów związanych z odpornością systemiczną i nabytą, a także syntezą białek PR. Białko receptorowe, związane z SA, przekazuje sygnał odebrany od kwasu, genom odpowiedzialnym za syntezę białek PR oraz MAP-kinazy, które z kolei powiązane są z patogenezą i nabytą przez rośliny odpornością na choroby (Bajguz, Tretyn 2003b).

22.4. Podsumowanie

Rośliny rozwijające się w naturalnych warunkach środowiska narażone są na różne czynniki chorobotwórcze, wywołanie między innymi, poprzez działanie patogenów. Może to prowadzić do długotrwałego zahamowania równowagi w funkcjach życiowych roślin, a także nieodwracalnych zmian chorobowych. Rośliny zainfekowane patogenami często posiadają dostrzegalne zmiany cytologiczne, morfologiczne, histologiczne lub anatomiczne (Grzesiuk i in. 1999; Woźny, Przybył 2004; Agrios 2005). Jednak rośliny narażone na działanie patogenów nie są wobec nich bezbronne, ponieważ wykształciły szereg mechanizmów obronnych, w których udział posiadają fitohormony, np. brassinosteroidy (Ryc. 22.3).

BIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE



- wpływ na przekształcanie ściany komórkowej (biosynteza celulozy)
- uczestniczenie w mechanizmach indukcji genów i transdukcji sygnałów związanych z odpornością nabytą
- synteza białek PR
- wzmocnienie działania systemu antyoksydacyjnego
- stymulacja syntezy etylenu, SA, JA

Rycina 22.3. Brassinosteroidy w odpowiedzi roślin na patogeny

Źródło: opracowanie własne.

Literatura

- Agrios G.N. 2005. Plant pathology. Elsevier, Academic Press, Amsterdam.
- Ali B., Hayat S., Hasan S.A., Ahmad A. 2006. Effect of root applied 28-homobrassinolide on the performance of *Lycopersicon esculentum*. *Sci. Hort.*, 110: 267-273.
- Bajguz A. 2000. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 209-215.
- Bajguz A. 2011. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer, Dordrecht, 1-29.
- Bajguz A., Czerpak R. 1998. Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship of brassinosteroids in the green alga *Chlorella vulgaris*. *J. Plant Growth Regul.*, 17: 131-139.
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47: 1-8.
- Bajguz A., Tretyn A. 2003a. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62: 1027-1046.

- Bajguz A., Tretyn A. 2003b. Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wyd. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.
- Bethke G., Grundman R.E., Sreekanta S., Truman W., Katagiri F., Glazebrook J. 2014. *Arabidopsis* pectin esterases contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.*, 164: 1093-1107.
- Castle J., Montoya T., Bishop G.J. 2003. Selected physiological responses of brassinosteroids: a historical approach. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: bioactivity and crop productivity*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 53-54.
- Gao W., Long L., Zhu L.F., Xu L., Gao W.H., Sun L.Q., Liu L.L., Zhang X.L. 2013. Proteomic and cirus-induced gene silencing (VIGS) analyses reveal that gossypol, brassinosteroids, and jasmonic acid contribute to the resistance of cotton to *Verticillium dahliae*. *Mol. Cell. Proteomics*, 12: 3690-3703.
- Goda H., Shimada Y., Asami T., Fujioka S., Yoshida S., 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 130: 1319-1334.
- Gomes M.M.A. 2011. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer, Dordrecht, 194-242.
- Grzesiuk S., Koczkowska., Górecki R.J. 1999. Fizjologiczne podstawy odporności roślin na choroby. Wyd. ART, Olsztyn.
- Hartwig T., Chuck G.S., Fujioka S., Klempien A., Weizbauer R., Potluri D.P.V., Choe S., Johal G.S., Schulz B. 2011. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 19814-19819.
- Hayat S., Hasan S.A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A. 2010. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ. Exp. Bot.*, 69: 105-112.
- Hayat S., Irfan M., Ahmad A. 2011. Brassinosteroids: under biotic stress. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer, Dordrecht, 345-360.
- Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. 2004. Brassinosteroids and rice architecture. *J. Pestic. Sci.*, 29: 184-188.
- Kang Y.Y., Guo S.R., Li J., Duan J.J. 2009. Effect of root applied 24-epibrassinolide on carbohydrate status and fermentive enzyme activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under hypoxia. *Plant Growth Regul.*, 57: 259-269.
- Kartal G., Temel A., Gozukirmizi E.A.N. 2009. Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. *Plant Growth Regul.*, 58: 261-267.
- Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Litvinovskaya R.P., Zavadskaya M.I., Savel'eva E.A., Karas I.I., Kilcchevskii A.V., Titova S.N. 1996. A method for protection of potato from phytophthora. *Pat. Appl. BY.*, 960: 346.

- Lisso J., Steinhäuser D., Altmann T., Kopka J., Müssig C. 2005. Identification of brassinosteroid-related genes by means of transcript co-response analyses. *Nucleic Acids Res.*, 33: 2685-2696.
- Manzano S., Martínez C., Megías S., Gómez P., Garrido D., Jamilena M. 2011. The role of ethylene and brassinosteroids in the control of sex expression and flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant Growth Regul.*, 65: 213-221.
- Nafisim M., Fimognari L., Sakuragi Y. 2015. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, 112: 63-71.
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto I., Yoshida S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.*, 33: 887-898.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hancock J.T. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 128: 13-16.
- Pereira-Netto A.B. 2011. Genomic and non-genomic events involved in the brassinosteroid – promoted plant cell growth. [W:] Hayat S., Ahmad A. (red.), *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer, Dordrecht, 243-268.
- Phan Tran L.-S., Pal S. (red.). 2014 *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer Science+Business Media, New York.
- Rietz S., Dermendjiev G., Oppermann E., Tafesse F.G., Effendi Y., Holk A., Parker J.E., Teige M., Scherer G.F.E. 2010. Roles of *Arabidopsis* patatin-related phospholipases A in root development are related to auxin responses and phosphate deficiency. *Mol. Plant*, 3: 524-538.
- Saglam-Cag S. 2007. The effect of epibrassinolide on senescence in wheat leaves. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 21: 63-65.
- Vasyukova N.J., Chalenko G.I., Kaneva L.M., Khripach V.A. 1994. Brassinosteroids and potato blight. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 30: 464-470.
- Volynets A.P., Pschenichnaya L.A., Manzhelesova N.E., Morozik G.V., Khripach V.A. 1997. The nature of protective action of 24-epibrassinolide on barley plants. *Plant Growth Regul. Soc. Am.*, 24: 133-137.
- Wolf S., Mravec J., Greiner S., Mouille G., Hofte H. 2012. Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Curr. Biol.*, 22: 1732-1737.
- Woźny A., Przybył K. 2004. Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom I. Komórki *in vivo*. Cz. 2. Warunki stresu. Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
- Xia X.J., Zhang Y., Wu J.X., Wang J.T., Zhou Y.H., Shi K., Yu Y.L., Yu J.Q. 2009. Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 8406-8413.

- Xie L.Q., Yang C.J., Wang X.L. 2011. Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 62: 4495-4506.
- Yang C.J., Zhang C., Lu Y.N., Jin J.Q., Wang X.L. 2011. The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Mol. Plant*, 4: 588-600.
- Zhang D.W., Deng X.G., Fu F.Q., Lin H.H. 2015. Induction of plant virus defense response by brassinosteroids and brassinosteroid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 241: 875-885.

Uczniowie szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych o szkolnym nauczaniu biologii

Alina Stankiewicz

Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii, Pracownia Dydaktyki Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: salina@uwb.edu.pl

Streszczenie

Kolejne reformy w polskiej szkole mają służyć zwiększeniu efektywności nauczania i uczenia się. Zmiany w szkołach powinny służyć uczniom. Uzdolnieni uczniowie stanowią wyzwanie dla nauczycieli, praca z nimi jest wymagająca, łączy się z mobilizacją intelektualną i kreatywnością nauczyciela, może być także bardzo satysfakcjonująca. W ramach projektu pn.: *Białostockie Talenty XXI wieku*, realizowanego przez Centrum Kształcenia Ustawicznego, wspólnie z Instytutem Biologii UwB, przeprowadzono wśród uczniów uczestniczących w zajęciach z biologii sondaż diagnostyczny. W badaniach starano się zebrać informacje na temat, dlaczego warto uczyć się biologii, jakimi dyscyplinami biologicznymi są zainteresowani uczniowie, a także chciano poznać ich opinie na temat nauczania biologii oraz potrzebnych zmian w nauczaniu tego przedmiotu w szkołach. W niniejszej pracy zostały zaprezentowane wyniki tych badań.

Słowa kluczowe: ankiety, zdolności, wspieranie uczniów zdolnych, nauczanie biologii, gimnazja i szkoły ponadgimnazjalne

23.1. Wstęp

Zadaniem nauczyciela na wszystkich etapach edukacji jest wszechstronny rozwój uczniów. Każdy nauczyciel czyni starania, aby rozpoznać uzdolnienia uczniów, identyfikować ich potrzeby edukacyjne oraz podjąć działania mające na celu zaspokojenie tych potrzeb. W Polsce nie ma przyjętej jasnej, jednoznacznej i obligatoryjnej definicji ucznia zdolnego. W rozumieniu społecznym, uczeń zdolny to uczeń, który ma wzorowe zachowanie i najwyższe oceny z przedmiotów szkolnych. Natomiast w rozumieniu psychologicznym, uczeń zdolny to taki, który ma wysoki iloraz inteligencji, duże osiągnięcia oraz wysokie zdolności twórcze na różnych płaszczyznach życia. Na początku lat siedemdziesiątych, w Stanach Zjednoczonych, Marland, komisarz do spraw edukacji, zaproponował dokument, w którym wyróżnione zostały dziedziny stanowiące domeny uczniowskiego talentu (Grygier, Jancarz-Łanczkowska, Piotrowski, 2013). Według definicji edukacyjnej, dzieci zdolne i utalentowane, to dzieci, które osiągają dobre wyniki przynajmniej w jednej z następujących dziedzin uzdolnień: ogólne zdolności intelektualne, specyficzne zdolności akademickie, zdolności artystyczne i sceniczne, umiejętności psychomotoryczne, twórczy i produktywny sposób myślenia, umiejętności przywódcze. Powyższy podział jest szczególnie istotny ze względu na wskazanie, że uczniowie uzdolnieni nie stanowią jednorodnej grupy, i jednocześnie pozwala spojrzeć szerzej na zdolności uczniów (Grygier, Jancarz-Łanczkowska, Piotrowski, 2013).

Według Szewczuka (1985), zdolności to zespół warunków wewnętrznych jednostki, umożliwiający wykonywanie działań określonego rodzaju: im większy jest stopień złożoności działań, tym większych wymaga zdolności; im wyższy jest poziom wykonywanych działań, tym wyższy stopień warunkujących je zdolności. Z kolei psycholog Strelau (1987) podkreślał, że pojęcie zdolności wskazuje na maksymalne możliwości człowieka, czyli na górną granicę poziomu efektywności działania, którą może on osiągnąć, jeśli stworzy mu się optymalne warunki i zapewni odpowiedni trening. Z definicji tej wynika, że zdolności to możliwości człowieka, czyli potencjał, który można rozwinąć lub nie, w zależności od tego czy trafi on na właściwy grunt społeczny oraz klimat sprzyjający rozwojowi zdolności (Uszyńska-Jarmoc, Kunat, Tarasiuk 2014). Z przytoczonych definicji zdolności wynika, że uznano je za właściwość psychiczną człowieka o charakterze ogólnym, warunkującą maksymalne możliwości osoby w danej dziedzinie jej działalności. W definicjach podkreśla się, że zdolności są zawsze wynikiem rozwoju; zdolności nie istnieją, dopóki nie pojawi się działanie. Tak więc działanie jest niezbędnym warunkiem powstania zdolności (Strelau 1987).

W literaturze psychologiczno-pedagogicznej (Kupisiewicz, Kupisiewicz 2009; Strelau 1987; Szewczuk 1985) odróżnia się uzdolnienia od zdolności. W Słowniku pedagogicznym termin „uzdolnienie” zdefiniowany jest jako „*predyspozycje jednostki do ponadprzeciętnego wykonywania określonych czynności bądź działalności w określonej dziedzinie, np. literackiej, naukowej, artystycznej, sportowej, technicznej*” (Kupisiewicz, Kupisiewicz 2009). Zatem uzdolnienie jest wynikiem powstania, konfiguracji i współdziałania odpowiednich zdolności, wiadomości, umiejętności oraz różnych cech charakterologicznych człowieka (Uszyńska-Jarmoc, Kunat, Tarasiuk 2014).

23.2. Zalecenia w odniesieniu do procesu nauczania ucznia zdolnego

Szkoła jest nastawiona przede wszystkim na kształcenie ucznia średniego, do jego poziomu i możliwości są dostosowane programy nauczania, wymagania nauczycieli, tempo pracy na lekcji. Stawia to uczniów zdolnych w gorszej dla ich rozwoju intelektualnego sytuacji, gdyż nie przydziela się im zadań na miarę ich możliwości (Bereźnicki 2011). We wprowadzonych przez MEN rozporządzeniach (2001; 2013) zawarto zapisy, w których zaleca się objęcie wsparciem pedagogiczno-psychologicznym uczniów szczególnie uzdolnionych. W sytuacji zdiagnozowania uzdolnień ucznia, nauczyciel przedmiotu przygotowuje Plan Działań Wspierających, w ramach których uczeń zdolny uczestniczy w zajęciach dodatkowych. Uczniowieolni mogą ubiegać się również o indywidualny tok lub program nauczania. Plan Działań Wspierających oraz Indywidualny Program Nauczania powinny być dostosowane do potrzeb, zainteresowań i możliwości uczniów. Działania te powinny uwzględniać wszechstronny rozwój ucznia, nie tylko rozwijanie uzdolnień ogólnych i specjalnych, ale także sfery emocjonalnej (tj. zdolności rywalizacji, odporności emocjonalnej oraz świadomości uwarunkowań sukcesów i porażek, zdolności adekwatnej samooceny), sfery społecznej (umiejętności funkcjonowania i porozumiewania się w grupie, negocjacji, zrozumienia dla słabszych możliwości innych uczniów, kształtowania współodpowiedzialności i pomocy) oraz właściwej motywacji do uczenia się, wytrwałości w pokonywaniu trudności i staranności w wykonywaniu zadań.

W nauczaniu i uczeniu się przedmiotów przyrodniczych, największe znaczenie mają metody badawcze, na które składają się: eksperyment i obserwacje, modelowanie, pomiar (Stawiński 2006). Wykonywanie samodzielnie przez uczniów do-

świadzeń i obserwacji, sprzyja kształtowaniu i doskonaleniu umiejętności rozwiązywania problemów i rozumowania naukowego, wspomaga zainteresowanie uczniów przedmiotem, ułatwia przyswajanie wiadomości. Najkorzystniejsza dla rozwoju poznawczego uczniów jest sytuacja, w której mają jak największy udział w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów. Z obserwacji lekcji prowadzonych podczas praktyk studentów biologii w gimnazjach i szkołach ponadgimnazjalnych wynika, iż rzadko wykonywane są przez uczniów eksperymenty i obserwacje. Poza tym w szkołach bardzo skromne jest wyposażenie pracowni biologicznych w podstawowy sprzęt, przyrządy oraz szkło laboratoryjne i odczynniki chemiczne, stanowiące niezbędne warunki do prowadzenia ćwiczeń laboratoryjnych. Na lekcjach biologii dominują metody podające, tj. wykład, opis. Rzadko stosuje się nauczanie problemowe czy laboratoryjne. Potwierdzeniem tych obserwacji są dane z *Raportu o Stanie Edukacji 2013* (2014). W dokumencie tym stwierdzono, że uczniowie podczas lekcji z przedmiotów przyrodniczych rzadko mieli możliwość samodzielnie lub w grupach planować i przeprowadzać doświadczenia. Najczęściej byli obserwatorami eksperymentu przeprowadzanego przez nauczyciela. Od kilku lat można również obserwować obniżanie się poziomu osiągnięć uczniów z przedmiotów przyrodniczych, mierzonych podczas egzaminów po ukończeniu gimnazjum i szkół ponadgimnazjalnych. Szczególnie niezadowalająco wypadają wyniki sprawdzanych umiejętności uczniów. Podczas rozwiązywania zadań egzaminu gimnazjalnego, mniej niż połowa uczniów potrafiła rozróżnić próbę badawczą i kontrolną w opisanym i przedstawionym na rysunkach doświadczeniu, a tylko niewielka grupa uczniów (poziom wykonania zadania 14%) poradziła sobie z zaplanowaniem doświadczenia; trudności sprawiło uczniom wyciąganie wniosków z otrzymanych wyników doświadczenia (według danych ze Sprawozdań z egzaminu gimnazjalnego 2013, 2014, 2015, przygotowanych przez Centralną Komisję Egzaminacyjną). W konsekwencji, obserwuje się obniżenie zainteresowania uczniów przedmiotami przyrodniczymi, w tym biologią. Już co najmniej kilka lat wcześniej dydaktycy biologii zwracali uwagę na istnienie powiązań między kierunkiem zainteresowań uczniów a treściami nauczania i organizacją procesu nauczania (Stawiński 2006). Dlatego też ważne jest, aby zapobiec obniżaniu się poziomu zainteresowań uczniów przedmiotami przyrodniczymi i obniżaniu się wyników egzaminów z przedmiotów przyrodniczych. Szczególnie należy więc zadbać o uczniów zainteresowanych biologią i utalentowanych w tej dziedzinie.

W wspieraniu uczniów zdolnych, obok szkoły i rodziców, coraz częściej biorą udział uczelnie wyższe, organizacje i instytucje. Centrum Kształcenia Ustawicznego w Białymstoku w roku szkolnym 2014/2015 realizowało projekt pn.: *Białostockie Talenty XXI wieku*. W realizacji przedsięwzięcia brały udział: Uniwersytet w Bia-

łymstoku, Politechnika Białostocka oraz Wyższa Szkoła Finansów i Zarządzania. We współpracy CKU i UwB wpisany był cel promowania wśród uczniów kultury nauk przyrodniczych, popularyzacja nauki i badań naukowych, podwyższenie zrozumienia przez uczniów praktycznych zastosowań osiągnięć nauki i metod badawczych. Działania skierowane do uczniów zdolnych, miały służyć poszerzeniu i wzmocnieniu zainteresowań naukami biologicznymi. W Instytucie Biologii UwB zaoferowano uczniom zajęcia laboratoryjne, polegające na prowadzeniu samodzielnych obserwacji i eksperymentów, wykraczających nieco poza podstawę programową obowiązującą na danym etapie kształcenia. Współpraca Instytutu Biologii UwB z Centrum Kształcenia Ustawicznego w ramach projektu *Białostockie Talenty XXI wieku* była formą pracy z uczniami w innym, niż edukacja szkolna, zakresie.

Projekt realizowany wspólnie z CKU był nie tylko wspomaganie uzdolnionej młodzieży w jej rozwoju, ale także budowaniem, dostosowywaniem oferty edukacyjnej dla uczniów o szczególnych potrzebach poznawczych. Celem prowadzonych zajęć było dostarczenie uczniom możliwości otwierania się na nowe sposoby myślenia i wytrącenie się z intelektualnej szkolnej rutyny.

23.3. Metody i narzędzia badawcze

Uczniowie utalentowani wymagają stworzenia specyficznego środowiska nauczania-uczenia się, między innymi takiego, w którym będą mogli uczyć się, jak świadomie i autonomicznie zarządzać swoim procesem uczenia się i rozwijać potrzebne we współczesnym świecie kluczowe kompetencje poznawcze i społeczne. Podczas trwania projektu *Białostockie Talenty XXI wieku*, wśród uczniów uczestniczących w zajęciach z biologii, przeprowadzono sondaż diagnostyczny. Celem badań było poznanie oczekiwań uczniów odnośnie do zajęć w Instytucie Biologii oraz opinii o nauczaniu biologii. Respondenci wyrazili swoje stanowiska w przygotowanym kwestionariuszu ankiety. Pierwsza część kwestionariusza służyła zebraniu informacji o uczniu; drugą część stanowiły pytania dotyczące zainteresowań uczniów biologią, oczekiwań związanych z zajęciami w Instytucie Biologii oraz planami na przyszłość. Trzecia część ankiety służyła zebraniu opinii uczniów na temat nauczania biologii w szkołach; na etapie tym starano się ustalić, czy biologia jako przedmiot nauczania jest lubiana przez uczniów, jakie działy biologii w programie nauczania są według uczniów najbardziej interesujące, oraz jakie metody i środki dydaktyczne są najczęściej stosowane na lekcjach biologii.

23.4. Wyniki badań

23.4.1. Dlaczego warto uczyć się biologii? – argumenty uczniów

W badaniach uczestniczyło 40 uczniów (26 z gimnazjów i 14 ze szkół ponadgimnazjalnych). Wśród badanych dominowały dziewczęta (stanowiły one 85% gimnazjalistów i 71% uczniów szkół ponadgimnazjalnych). Jedno z pierwszych pytań w ankiecie brzmiało: Dlaczego warto uczyć się biologii? Na to pytanie podobnie odpowiedzieli uczniowie gimnazjów i szkół ponadgimnazjalnych. Wypowiedzi uczniów uporządkowano w kilka grup. Najczęściej uczniowie wskazywali na utylitarny charakter współczesnej biologii. Świadczą o tym takie wypowiedzi jak: *„wiedza biologiczna pomaga nam w leczeniu chorób”*; *„wiąże się z naszym funkcjonowaniem i przydaje się w życiu”*; *„dowiadujemy się, z czego tak naprawdę jesteśmy zbudowani”*; *„dzięki niej możemy bardziej wspierać środowisko”*; *„dzięki niej możemy się dowiedzieć, jak wszystko co żywe funkcjonuje”*; *„zwiększa świadomość roli poszczególnych istnień w ekosystemie”*; *„jest to nauka bardzo bliska człowiekowi, a jej zastosowanie w codziennym życiu może ułatwić funkcjonowanie”*; *„jest to jedna z nauk, która w szczególności pozwala na zrozumienie działania świata, a przede wszystkim organizmu człowieka”*; *„daje dużo możliwości w przyszłym życiu”*. Bardzo interesująca jest wypowiedź o znaczeniu biologii w dalszym samokształceniu: *„wyrabia” w człowieku ciekawość i umiejętności logicznego myślenia”*.

Kolejna grupa wypowiedzi uczniów to wskazanie na całościowy, uniwersalny charakter biologii jako nauki. Respondenci podkreślali, że biologia jest nauką, która pozwala lepiej poznać i zrozumieć świat. Ilustrują to następujące wypowiedzi: *„biologia pozwala odkrywać świat”*; *„dostarcza nam wiedzy o otaczającym świecie”*; *„jest królową nauk”*; *„dzięki niej możemy otrzymać odpowiedź na pytanie o działanie i funkcjonowanie życia na Ziemi”*; *„pozwala szukać odpowiedzi na różne pytania dotyczące życia”*; *„jest związana z ludzkością i otaczającym ją światem”*; *„rozwija naszą wiedzę i dzięki niej poznajemy świat”*; *„rozwija ona nasze możliwości oraz pozwala wykorzystywać zainteresowania w zdobywaniu wiedzy o świecie”*; *„uczy nas o nas samych, o naszej naturze, o otaczającym świecie, o tym jak powinniśmy o niego dbać”*; *„można się dużo dowiedzieć o otaczającym świecie i nas samych”*. Kolejna grupa wypowiedzi, to uznanie biologii jako nauki wspólnie najszybciej rozwijającej się: *„nauka przyszłościowa, która ciągle się rozwija i ma duży wpływ na nasze życie”*; *„jest najciekawszą dziedziną nauki, w której cały czas możemy coś odkrywać”*; *„jest to jedna z najbardziej tajemniczych dyscyplin naukowych”*; *„jest ona dziedziną nauki ściśle związana z życiem codziennym i przyszłością ludzi”*. Uczniowie podkreślali, że jest to jedna z najbardziej interesujących nauk: *„można uczyć się nowych*

niesamowitych rzeczy”; „jest najciekawszą dziedziną nauki, w której cały czas możemy coś odkrywać”; „jest ciekawa i potrafi wytłumaczyć wiele zagadek z życia”.

23.5. Z czego wynikają zainteresowania uczniów biologią?

Badani uczniowie wskazywali własną aktywność i wewnętrzną motywację w rozwijaniu zainteresowań biologią. Świadczą o tym następujące wypowiedzi: „zawsze interesowałam się botaniką i zoologią oraz anatomią”; „z ciekawości i chęci poznania świata”; „z obserwacji prowadzonych od 9. roku życia”; „z chęci dowiedzenia się, jak funkcjonują organizmy żywe”; „od dziecka bardzo swobodnie czuję się szukając informacji, ucząc się tej dziedziny”; „z ciekawości poznawania funkcjonowania ciała człowieka”; „z zainteresowań zwierzętami, człowiekiem, zarówno pod względem anatomicznym, jak i mikrobiologicznym oraz ich czynnościami życiowymi”; „z zamiłowania do świata przyrody i jego tajemnic”; „z sympatii dla zwierząt i roślin”. Wypowiedzi te, charakterystyczne są dla uczniów zdolnych, o skonkretyzowanych zainteresowaniach oraz o wysokiej motywacji wewnętrznej w uczeniu się.

W innych wypowiedziach uczniowie wiąжали zainteresowanie biologią z planami na przyszłość. Większość ankietowanych chciałaby w przyszłości studiować medycynę, o czym świadczą następujące wypowiedzi: „mam zamiar pójść na studia medyczne”; „chcę w przyszłości zostać lekarzem”. Część ankietowanych ogólnie wypowiedziała się na temat swojej przyszłości w taki oto sposób: „z tego co mam zamiar robić w przyszłości”; „w przyszłości chciałabym wykonywać zawód związany z biologią”. W rozwoju zainteresowań biologią, zdaniem badanych, miała udział szkoła i nauczyciele. W tej grupie najwięcej ankietowanych (30%) stwierdziło, iż ich zainteresowanie biologią wynikało z „ciekawych lekcji biologii w szkole”; „zainteresowania lekcjami przyrody w szkole”; „że mam dobrych nauczycieli, umiejących zachęcić do przedmiotu”. Znaczenie szkoły i nauczyciela w rozwoju zainteresowań biologią różnicowało badanych. Żaden z badanych uczniów szkół ponadgimnazjalnych, nie dostrzegł wpływu szkoły i nauczycieli w rozwijaniu swoich zainteresowań biologicznych. A gimnazjaliści przeciwnie: aż w 65% wskazało wpływ szkoły i nauczycieli w rozwoju ich zainteresowań biologią. Wypowiedzi te mogą wskazywać na to, że w gimnazjum w dużym stopniu nauczyciele mogą wpływać na zainteresowania i motywacje uczniów do uczenia się przedmiotów, zaś uczniowie rozpoczynający naukę w szkołach ponadgimnazjalnych, w większości posiadają już skonkretyzowane zainteresowania. Na rozwój zainteresowań uczniów biologią mają także wpływ rodzice. Świadczą o tym następujące wypowiedzi: „często z rodzicami cho-

dzimy na wycieczki krajoznawcze”; „z zawodu mojej mamy (nauczyciel biologii); „mój pradziadek był lekarzem i przekazał mi swoje zainteresowania biologią”.

23.6. Oczekiwania uczniów odnośnie zajęć w Instytucie Biologii UwB

Głównym argumentem decydującym o zgłoszeniu się na zajęcie warsztatowe w Instytucie Biologii UwB, była chęć samodoskonalenia i samorozwoju. Tej postawy dowodzą wypowiedzi typu: *„chciałabym uzupełnić swoją wiedzę nowymi informacjami”; „liczę, że pogłębię swoją wiedzę i dowiem się ciekawych rzeczy”; „chciałabym pogłębiać swoją wiedzę i uczyć się w nowy dla mnie sposób”; „mogę się nauczyć tu wielu nowych umiejętności i odbyć ciekawe warsztaty”; „chcę się dowiedzieć więcej o świecie”; „uwielbiam uczyć się biologii i dowiadywać się nowych rzeczy z tej dziedziny”; „daje mi możliwość rozwijania już nabytych umiejętności oraz poznawania zupełnie nowych dla mnie dziedzin biologii”; „chcę rozwinąć własną znajomość biologii w szerszej perspektywie niż jest to możliwe w szkole”; „chcę rozwinąć umiejętności i poszerzyć własną wiedzę”; „lubię uczyć się nowych rzeczy niekoniecznie z książek”.* Kolejnym argumentem przemawiającym za udziałem w warsztatach, były plany uczniów na przyszłość: *„chcę studiować medycynę i być lekarzem”; „chciałabym się rozwijać i w przyszłości chcę być biologiem sądowym lub lekarzem medycyny sądowej”; „chcę aktywnie uczęszczać na zajęcia i dowiadywać się o rzeczach, które w szczególnie sposób zaciekawiają mnie i uzupełnią moją wiedzę, ale również pomogą wybrać dalsze drogi kształcenia”; „chcę zdawać maturę rozszerzoną z tego przedmiotu”.* Kilku uczniów stwierdziło, iż zostali zgłoszeni do udziału w warsztatach przez swoich nauczycieli: *„zostałem zaproponowany przez nauczyciela”; „jestem laureatem konkursu biologicznego, pani w szkole powiedziała o projekcie, a ja od razu zechciałam wziąć w nim udział”; „zostałam zapisana i źle się czuję jak odmawiam”.* Pojedyncze wypowiedzi ankietowanych uczniów szkół ponadgimnazjalnych, odnośnie do ich udziału w zajęciach, wynikały z ciekawości, jak odbywają się zajęcia w uczelni wyższej: *„interesuje mnie wykorzystanie nowych sprzętów w poznawaniu biologii”; „byłam ciekawa, jak wyglądają takie zajęcia i chciałabym dowiedzieć się czegoś nowego, czego nie dowiem się w szkole”; „chcę poszerzyć swoją wiedzę i nauczyć się właściwego prowadzenia badań i doświadczeń, aby w przyszłości móc tą wiedzę wykorzystać”; „mam nadzieje na nową dawkę wiedzy i zdobytych doświadczeń w laboratoriach”.*

Kolejne pytanie w ankiecie dotyczyło oczekiwań ankietowanych odnośnie do zajęć w Instytucie Biologii UwB. W wypowiedziach uczniowie podkreślali chęć uczestniczenia w zajęciach praktycznych, z wykorzystaniem sprzętu i aparatury badawczej: „*wykonywać różne doświadczenia, pomagające zrozumieć dany temat*”; „*aby można było uczestniczyć w zajęciach praktycznych, w doświadczeniach, w zajęciach terenowych*”; „*aby była praca w laboratoriach*”; „*zrozumieć pracę badawczą*”; „*dużo zajęć praktycznych, doświadczeń, abym mogła aktywnie uczestniczyć w zajęciach*”; „*aby były różne eksperymenty*”; „*aby zostało ukazanych jak najwięcej sposobów poznawania biologii za pomocą specjalistycznego sprzętu zlokalizowanego w kampusie*”. Wśród wyrażanych argumentów była również chęć sprawdzenia się w nowych sytuacjach: „*sprawdzić, w jakiej dziedzinie najlepiej bym się czuła, co najbardziej mnie interesuje*”. Uczniowie wskazywali także swoje oczekiwania odnośnie do tematyki zajęć: „*było na temat roślin i najbardziej skomplikowanego systemu, jakim jest organizm człowieka lub zwierzęcia*”; „*dowiedzieć się, jak najwięcej o życiu, a szczególnie o faunie naszej planety*”; „*by była budowa organizmu człowieka, genetyka, ochrona środowiska i o żywności*”; „*była medycyna, zajęcia związane z medycyną*”; „*dokształcić się pod kątem matury i studiów medycznych*”. Niektórzy uczniowie nie mieli sprecyzowanych oczekiwań, stwierdzali tylko: „*aby zajęcia były ciekawie prowadzone*”; „*dużo się działo, abym mogła uczestniczyć w ciekawych, żywych zajęciach*”; „*aby, nigdy nie było nudno*”.

W ankiecie zapytano także uczniów, jak wykorzystają zdobytą podczas warsztatów wiedzę i umiejętności. Respondenci przedstawili kilka sposobów wykorzystania tych kompetencji: np. poprzez branie udziału w konkursach i olimpiadach oraz w dalszym kształceniu: „*w dalszym kształcenia w kierunku biologii*”; „*dostania się do wymarzonego liceum*”; „*dostania się na studia*”; „*w dalszym kształceniu i rozwoju*”; „*wykorzystam w wyborze studiów*”; „*przygotowania do studiów medycznych i zawodu lekarza*”; „*dalszego rozwoju w zakresie biologii i własnej przyszłości*”; „*w podejmowaniu decyzji o wyborze zawodu*”. Część ankietowanych wykorzysta zdobytą wiedzę i umiejętności podczas lekcji biologii, egzaminu gimnazjalnego i maturalnego, podczas ogólnych wypowiedzi na temat biologii oraz w dalszym samodoskonaleniu, samodzielnym prowadzeniu badań, a także np. „*do rozwiązywania interesujących mnie zagadek*”; „*w sprawdzeniu, ustaleniu, co mnie interesuje*”; „*w prowadzeniu własnych projektów naukowych*”. Kilku ankietowanych stwierdziło, iż uczestniczy w zajęciach wyłącznie dla własnej satysfakcji i spełnienia marzeń.

23.7. Nauczanie biologii w szkole

Uczniowie, jako podmiot oddziaływań dydaktycznych, są również twórcami procesu dydaktycznego. W zależności od ich możliwości, wiedzy, zainteresowań dostosowuje się cele, metody nauczania i form pracy. Dlatego interesujące było, jakie opinie mają uczniowie o szkolnym nauczaniu biologii. Większość badanych (92%) uważa, że biologia jest najbardziej interesującym przedmiotem w szkole. Pytano ich także, czy w ich szkołach biologia jest lubianym przedmiotem. Wyrażając swoją opinię w tej kwestii, połowa badanych uczniów ocenia, że w ich szkołach biologia przez większość uczniów jest przedmiotem lubianym, 35% badanych uważa, że dla większości uczniów w ich szkołach biologia jest przedmiotem obojętnym, zaś 15% respondentów jest zdania, że biologia jest przedmiotem nielubianym przez uczniów w szkołach. Ankietowanych poproszono także o wskazanie, które działy biologii są ich ulubionymi. Jak się okazało, najbardziej lubianym działem biologii, zarówno dla uczniów gimnazjum (88%), jak i szkół ponadgimnazjalnych (93%) jest genetyka. Ten dział nie uzyskał w badaniach negatywnej oceny (brak ocen „Bardzo nie lubię” i „Nie lubię”). Kolejnym lubianym działem biologii, w opinii badanych gimnazjalistów (88%) i uczniów szkół ponadgimnazjalnych (86%), była anatomia i fizjologia człowieka. W dalszej kolejności, najwięcej pozytywnych ocen uzyskała zoologia kręgowców (57% gimnazjum i 79% szkoła ponadgimnazjalna). Najmniej lubianą dziedziną biologii, w ocenie uczniów gimnazjum, jest botanika (45% ocen „Bardzo nie lubię” i „Nie lubię”) oraz ochrona środowiska (15% ocen „Bardzo nie lubię” i „Nie lubię”); podobnie o botanice i ochronie środowiska wypowiedzieli się uczniowie szkół ponadgimnazjalnych (36% ocen „Bardzo nie lubię” i „Nie lubię”).

Analizując przedstawione wyniki, można dostrzec związek między odpowiedziami ankietowanych a kierunkami ich dalszego kształcenia, który dla zdecydowanej większości uczniów jest związany z medycyną. Informacje o ulubionych działach biologii można wykorzystać do ustalenia tematyki zajęć dodatkowych. Szczególną uwagę należy też zwrócić na wskazane przez ankietowanych nielubiane działy biologii. Planowanie i prowadzenie lekcji biologii z tych działów, wymaga szczególnie trafnego i atrakcyjnego doboru celów, treści metod i środków dydaktycznych, tak aby zainteresować nimi uczniów.

W badaniach zapytano uczniów o stosowane na lekcjach biologii metody nauczania i środki dydaktyczne. Zdaniem uczniów gimnazjum, najczęściej stosowanymi na lekcjach metodami nauczania są: pogadanka (66%), eksperymenty (66%), praca z podręcznikiem (59%). Bardzo rzadko stosowana jest obserwacja (73%) i metoda projektów (86%). Często na lekcjach biologii w gimnazjum, uczniowie otrzymują różne materiały w formie krzyżówek, zadań, które po rozwiązaniu, należy

wkleić do zeszytów. Zdaniem uczniów szkół ponadgimnazjalnych, na lekcjach biologii najczęściej stosowana jest: pogadanka (91%), praca z podręcznikiem (64%), wykład (55%). W rezultacie więc, dominują na lekcjach biologii w tych szkołach metody nauczania, w których aktywność uczniów jest niewielka. Najrzadziej w szkołach ponadgimnazjalnych stosowane są: eksperymenty (82%), metoda projektów (82%), obserwacje (73%), a zatem metody, które w największym stopniu decydują o kształtowaniu umiejętności rozwiązywania problemów, formułowania hipotez, planowania doświadczeń, odróżniania próby kontrolnej od badawczej, wyciągania wniosków. Najczęściej wykorzystywanym środkiem dydaktycznym na lekcjach biologii jest podręcznik (79% w gimnazjum i 86% w szkołach ponadgimnazjalnych). Najrzadziej, zdaniem badanych uczniów, na lekcjach biologii w gimnazjum wykorzystuje się przyrządy, szkło laboratoryjne (83%), instrukcje ćwiczeniowe (82%), okazy naturalne i zielnikowe (67%). Zdaniem uczniów, na lekcjach biologii w liceum najrzadziej stosuje się prezentacje multimedialne (79%), instrukcje ćwiczeniowe (79%), okazy naturalne i zielnikowe (58%), przyrządy i szkło laboratoryjne (58%) oraz materiały źródłowe (79%). Rzadko stosowane na lekcjach biologii środki dydaktyczne, wymieniane przez uczniów, są potwierdzeniem faktu, że na lekcjach biologii uczniowie nie prowadzą obserwacji, nie wykonują eksperymentów czy pomiarów. Wykorzystywanie na lekcjach jednorodnych, mało zróżnicowanych metod nauczania i środków dydaktycznych, nie sprzyja rozwijaniu zainteresowań i zdolności uczniów, wręcz przeciwnie: może skutkować obniżeniem ich poziomu. Zdaniem 52% badanych gimnazjalistów, eksperymenty na lekcjach biologii odbywają się raz na 1-2 miesiące, lub raz w semestrze, zaś 22% badanych stwierdziło, że nie odbywają się one w ogóle. Zdaniem 58% badanych uczniów szkół ponadgimnazjalnych, eksperymenty na lekcjach biologii odbywają się raz na 3-4 miesiące lub raz w semestrze. Opinie te mogą potwierdzać, że na lekcjach biologii, zarówno w gimnazjum i liceum, uczniowie rzadko samodzielnie przeprowadzają obserwacje i eksperymenty.

W przeprowadzanych badaniach sondażowych poproszono uczniów o wypowiedzi na temat tego, jak lubią uczyć się biologii. Badani gimnazjaliści podczas lekcji najbardziej lubią samodzielnie wykonywać eksperymenty (33%), dyskutować o problemach badawczych, pracować w grupach. Uczniowie lubią, gdy nauczyciel ciekawie wyjaśnia trudne zagadnienia na przykładach z codziennego życia. Lubią się uczyć, prowadząc obserwacje okazów naturalnych, modeli, analizując prezentacje multimedialne, aktywnie współtworząc lekcję, np. przynosząc okazy zielnikowe, artykuły z różnych czasopism, nad którymi dyskutują. Uczniowie szczególnie doceniają nieskrępowaną rozmowę z nauczycielem, wymianę poglądów, argumentów. Uczniowie wyraźnie podkreślają potrzebę dialogu na lekcjach. Najbardziej uczniowie

wie lubią lekcje dotyczące anatomii i fizjologii człowieka oraz zwierząt. Nie lubią na lekcjach sporządzać długich notatek. Podobne wypowiedzi przedstawili uczniowie szkół ponadgimnazjalnych. Najwięcej spośród nich (72%) na lekcjach biologii chciałoby wykonywać doświadczenia, prowadzić obserwacje makroskopowe i mikroskopowe, pracować w grupach, prowadzić ciekawe dyskusje, rozmawiać z nauczycielem, odbywać zajęcia w terenie. Uczniowie gimnazjum proponują, aby główne zmiany w nauczaniu biologii w gimnazjum polegały na zwiększeniu zajęć praktycznych, polegających na prowadzeniu obserwacji, doświadczeń, zajęć w terenie. Proponują także zwiększenie liczby godzin biologii w tygodniu, a także dokonanie zmian w doborze i zakresie treści kształcenia (np. proponują rozszerzyć treści z genetyki oraz z anatomii i fizjologii człowieka). Uczniowie proponują zmienić rozkład materiału w podręczniku na mniejsze działy, łatwiejsze do opanowania. Ankietowani uczniowie chcieliby, aby uczył ich nauczyciel z charyzmą, zaangażowany w pracę, ciekawie prowadził lekcje. Tylko jeden spośród 40 badanych uczniów przyznał, że ma wspaniałą nauczycielkę biologii. Uczniowie szkół ponadgimnazjalnych również uważają, iż na lekcjach biologii powinno być więcej zajęć praktycznych, takich jak: prowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem aparatury, przyrządów i szkła laboratoryjnego, zajęć terenowych, obserwacji mikroskopowych. Respondenci wskazali, że na lekcjach powinno się nie tylko uczyć ich pod kątem matury, ale również wdrażać do myślenia biologicznego, stawiania hipotez, dyskutować nad różnymi problemami.

Wypowiedzi uczniów o szkolnym nauczaniu biologii mogą posłużyć do zwiększenia efektywności nauczania biologii w szkołach, a także być dla nauczycieli podpowiedzią jak indywidualizować nauczanie i organizować zajęcia dodatkowe dla uczniów zainteresowanych biologią. Szkoła nie może nie uwzględniać uwag uczniów o nauczaniu.

23.8. Podsumowanie

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż uczenie się biologii w opinii badanych uczniów to przygoda odkrywania nieznanego, wyzwanie do poznawania siebie i złożoności świata. Wyniki pozwalają także na stwierdzenie, że szkoła nie zaspokaja wszystkich potrzeb uczniów zdolnych; szczególnie, jeśli chodzi o stosowane metody nauczania i środki dydaktyczne. Uczniowie chcą aktywnie uczestniczyć w procesie nauczania-uczenia się, prowadzić ożywione dyskusje, eksperymentować, brać udział w zajęciach terenowych. Zebrane wyniki ankiet pozwoliły również na zebranie cech charakterystycznych ankietowanych uczniów: cechuje

ich chęć opanowania szerszego zakresu materiału nauczania niż w szkole oraz świadomość swoich potrzeb edukacyjnych. Uczniowie posiadają urozmaicone cele uczenia się, które dotyczą zaspokojenia ciekawości, rozwoju zainteresowań, a także sprawdzania się w nowych sytuacjach, poznania swoich możliwości, realizacji odległych planów życiowych, tj. studia, praca zawodowa. Uczniowie chcą, aby proces uczenia się przypominał proces badawczy, ponieważ tylko w takich warunkach uczenie się będzie dla nich wyzwaniem intelektualnym. Ankietowani zwrócili uwagę na rolę nauczyciela w ich edukacji, od którego wymagają emocjonalnego zaangażowania, pozytywnego i życzliwego stosunku. Według uczniów, nauczyciel, obok kompetencji merytorycznych i metodycznych, powinien mieć charyzmę, stymulować ich zainteresowania, nowoczesnie organizować proces nauczania.

Sprostac potrzebom edukacyjnym uczniów zdolnych nie jest łatwo. Należy szukać coraz lepszych sposobów i możliwości pracy z uczniem zdolnym, co nie może być procesem incydentalnym. Uczniów zdolnych nie można zostawić bez opieki i wsparcia pedagogiczno-dydaktycznego ze strony szkoły, a także uczelni wyższych.

Literatura

- Bereźnicki F. 2011. Podstawy dydaktyki. Impuls, Kraków.
- Grygier U., Jancarz-Łanczkowska B., Piotrowski K. T. 2013. Jak odkrywać i rozwijać uzdolnienia przyrodnicze uczniów w szkole podstawowej, gimnazjum i szkole ponadgimnazjalnej. ORE, Warszawa.
- Kupisiewicz Cz., Kupisiewicz M. 2009. Słownik pedagogiczny. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Osiągnięcia uczniów kończących gimnazjum w roku 2013. Sprawozdanie z egzaminu gimnazjalnego 2013. CKE, Warszawa. http://cke.edu.pl/images/files/gimnazjum/sprawozdanie_2013/2013_Gimnazjum.pdf.
- Osiągnięcia uczniów kończących gimnazjum w roku 2014. Sprawozdanie z egzaminu gimnazjalnego 2014. CKE, Warszawa. http://cke.edu.pl/images/files/Sprawozdanie_2014/2014_Egzamin_gimnazjalny_p.pdf.
- Osiągnięcia uczniów kończących gimnazjum w roku 2015. Sprawozdanie z egzaminu gimnazjalnego 2015. CKE, Warszawa. http://cke.edu.pl/images/_EGZAMIN_GIMNAZJALNY/Informacje_o_wynikach/Sprawozdanie_z_egzaminu_gimnazjalnego_2015.pdf.
- Raport o stanie edukacji 2013. Liczą się nauczyciele. 2014. ORE, Warszawa.
- Rozporządzenie Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 19 grudnia 2001 r. w sprawie warunków i trybu udzielania zezwoleń na indywidualny program lub tok nauki oraz organizacji indywidualnego programu lub toku nauki (Dz. U. z 2002 r., Nr 3, poz. 28).

Rozporządzenie Ministra Edukacji Narodowej z dnia 30 kwietnia 2013 r. w sprawie zasad udzielania i organizacji pomocy psychologiczno-pedagogicznej w publicznych przedszkolach, szkołach i placówkach. (Dz. U z 2013 r., poz. 532).

Sprawozdanie z egzamin maturalnego 2014. Biologia.

http://cke.edu.pl/images/_EGZAMIN_MATURALNY_OD_2015/Informacje_o_wynikach/2014/sprawozdanie/Biologia.pdf.

Sprawozdanie z egzaminu maturalnego 2013. Biologia. http://cke.edu.pl/images/_EGZAMIN_MATURALNY_OD_2015/Informacje_o_wynikach/2013/2013_Matura.pdf.

Stawiński W. (red.), 2006. Dydaktyka biologii i ochrony środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Strelau J. 1987. O inteligencji człowieka. Wiedza Powszechna, Warszawa.

Szewczuk W. (red.) 1985. Słownik psychologiczny. Wiedza Powszechna, Warszawa.

Uszyńska-Jarmoc J., Kunat B., Tarasiuk M. J. 2014. Sukcesy uczniów zdolnych. Fakty – narracje – interpretacje. CKU, Białystok.

Spis rycin

| | | |
|---------------------|---|---------|
| Rycina 1.1. | Struktura krystaliczna Rubisco szpinaku (<i>Spinacia oleracea</i>) | 11 |
| Rycina 1.2. | Struktura genów kodujących podjednostkę SS (<i>rbcS-1a</i> , <i>rbcS-1b</i> , <i>rbcS-2b</i> , <i>rbcS-3b</i>) oraz genu kodującego podjednostkę LS Rubisco <i>Arabidopsis thaliana</i> | 12 |
| Rycina 2.1. | Schemat ilustrujący reakcje zachodzące podczas fotooddychania | 26 |
| Rycina 2.2. | Schemat ilustrujący funkcjonowanie fotooddychania podczas stresu | 27 |
| Rycina 2.3. | Odpowiedzi stresowe związane z nadmiernym wzrostem transportu elektronów podczas fotosyntezy | 28 |
| Rycina 3.1. | Udział kluczowych enzymów metabolizmu węglowodanów w rozładunku floemu | 43 |
| Rycina 3.2. | Aktywność inwertazy po zranieniu liści rozetowych <i>A. thaliana</i> (6 tydzień wzrostu) | 45 |
| Rycina 7.1. | Metoda waloryzacji fitocenozy Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszewskiej i Wysockiego (2009) | 93 |
| Rycina 7.2. | Zróżnicowanie fitosocjologiczne i florystyczne szaty roślinnej w dolinie Słoi | wkładka |
| Rycina 9.1. | Średnie wielkości struktury ekologicznej populacji sasanki otwartej <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill., odpowiednio: w Puszczy Augustowskiej, w Puszczy Knyszyńskiej oraz w Puszczy Piskiej | 121 |
| Rycina 9.2. | Wysokość osobników w populacji sasanki otwartej <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej | 123 |
| Rycina 9.3. | Średnica przyziemnej rozety osobników w populacji sasanki otwartej <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill. w Nadleśnictwie Pomorze w Puszczy Augustowskiej | 123 |
| Rycina 10.1. | Lokalizacja wiercenia PG2 wykonanego na potrzeby badań paleoekologicznych oraz stanowisk archeologicznych w jego otoczeniu | 131 |
| Rycina 10.2. | Diagram prezentujący wyniki analizy palinologicznej i analiz numerycznych (wybrane krzywe) | 133 |
| Rycina 10.3. | Diagram prezentujący zestawienie palinologicznych wskaźników antropogenicznych na tle danych archeologiczno-historycznych | 134 |
| Rycina 10.4. | Model wiek/głębokość wykonany w programie Depth/Age Polpal | 135 |
| Rycina 12.1. | Stosunek liczby żywych do martwych ektomykoryz w próbach korzeni drobnych dorosłych drzew topoli <i>Populus nigra</i> 'Italica' (wyrażony w procentach) na poszczególnych stanowiskach badawczych | 165 |
| Rycina 12.2. | Wskaźnik ogólnej różnorodności biologicznej ektomykoryz (indeks Shannona) dla poszczególnych stanowisk badawczych | 167 |
| Rycina 15.1. | Mapka terenu z lokalizacją badanych fontann | 203 |
| Rycina 16.1. | Lokalizacja wsi Janowice, gmina Juchnowiec Kościelny | 215 |
| Rycina 18.1. | Losy jonów metali w komórkach glonów | 244 |

| | | |
|------------------------|---|-----|
| Rycina 19.1. | Główne składowe systemu antyoksydacyjnego | 255 |
| Rycina 19.2. | Mechanizmy obronne aktywowane przez BR występujące u roślin w odpowiedzi na stres metalami ciężkimi | 258 |
| Rycina 20.1. | Procesy wzrostowe i metaboliczne, na które wpływa askorbinian | 268 |
| Rycina 20.2.A-B | Wpływ egzogenego askorbinianu na aktywność katalazy (CAT) (A); reduktazy glutationowej (GR) (B) w komórkach <i>C. vulgaris</i> z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną do ¼ zawartością fosforu (¼ P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie ± SD | 271 |
| Rycina 20.2.C-D | Wpływ egzogenego askorbinianu na aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX) (C); oksydazy askorbinianowej (AO) (D); w komórkach <i>C. vulgaris</i> z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną do ¼ zawartością fosforu (¼ P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie ± SD | 272 |
| Rycina 21.1. | Przykłady odpowiedzi roślin na aktywność roślinożerców | 282 |
| Rycina 21.2. | Uproszczona klasyfikacja fitofagów | 284 |
| Rycina 22.1. | Wybrane wzory brassinosteroidów w postaci wolnej | 294 |
| Rycina 22.2. | Wzory koniugatów brassinosteroidowych | 295 |
| Rycina 22.3. | Brassinosteroidy w odpowiedzi roślin na patogeny | 301 |

Spis tabel

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Tabela 7.1. | Obliczenie sumarycznej rangi walorów | 94 |
| Tabela 7.2. | Waloryzacja doliny Słoi metodą Mahona i Millera (2003), w modyfikacji Łukaszeńskiej i Wysockiego (2009) | 98 |
| Tabela 10.1. | Wyniki określenia wieku osadów profilu PG2 metodą izotopową | 135 |
| Tabela 12.1. | Charakterystyka gleb stanowisk badawczych | 164 |
| Tabela 12.2. | Procentowy udział morfotypów ektomykoryz dorosłych drzew <i>Populus nigra</i> 'Italica' w ogólnej liczbie ektomykoryz na poszczególnych stanowiskach badawczych | 166 |
| Tabela 13.1. | Wyniki analizy wariancji ANOVA parametrów kolonizacji mykoryzowej korzeni kasztanowca białego <i>A. hippocastanum</i> | 179 |
| Tabela 13.2. | Kolonizacja mykoryzowa korzeni kasztanowca białego <i>A. hippocastanum</i> L. na stanowiskach w Bydgoszczy (stanowisko przyuliczne, Ogród Botaniczny UKW) i w Arboretum Kórnickim | 179 |
| Tabela 13.3. | Odczyn gleby i zawartość wody w glebie (%) na stanowiskach badawczych jesienią 2012 i wiosną 2013 roku | 180 |
| Tabela 13.4. | Zależność między zawartością wody w glebie na stanowiskach miejskich (Bydgoszcz) i pozamiejskim (Arboretum Kórnickie) a kolonizacją mykoryzową korzeni kasztanowca białego <i>A. hippocastanum</i> | 180 |
| Tabela 14.1. | Znaczenie gospodarcze podrodziny bobowatych | 189 |
| Tabela 15.1. | Skład gatunkowy grzybów izolowanych z wyznaczonych fontann oraz częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów w czasie pobierania materiału do badań | 205 |
| Tabela 16.1. | Porosty synantropijne wsi Janowicze (gm. Juchnowiec Kościelny) i przyległych okolic | 220 |
| Tabela 17.1. | Skala porostowa | 231 |
| Tabela 20.1. | Wpływ egzogenego askorbinianu na zagęszczenie komórek, zawartość barwników asymilacyjnych, stężenie białek, zawartość MDA w komórkach <i>C. vulgaris</i> z kultur kontrolnych (+P), z obniżoną zawartością fosforu do ¼ (¼ P), bez fosforu (-P). Wyniki średnie ± SD | 270 |
| Tabela 20.2. | Wpływ egzogenego askorbinianu na badane parametry komórek w kulturach z pełną zawartością fosforu (+P), z obniżoną do ¼ w porównaniu do kontroli zawartością fosforu (¼ P) oraz bez fosforu (-P). (wzrost/spadek/brak zmian zawartości/aktywności)..... | 274 |