Wiadomości Botaniczne **37**(1/2): 43–58, 1993

MIKORYZA W SIEDLISKACH SKAŻONYCH METALAMI TOKSYCZNYMI

Mycorrhiza in toxic metal polluted sites

Katarzyna TURNAU

Summary. This review is concerned with the responce of mycorrhizae to toxic metal exposure. Some heavy metals are required by biological systems as structural and catalytic components of proteins and enzymes, and as cofactors essential to normal growth and development. In excess they become extremely toxic to cells. While some species of plants and fungi may be severely restricted by toxic metals, some species posses ability to adapt rapidly and to evolve mechanisms of tolerance to toxic or lethal levels of these elements. There is mounting evidence that several species of mycorrhizal fungi might be essential for the survival of plants growing near mining or smelting operations, industrial wastes as well as on some natural soil types. A variety of mechanisms occur in fungal cells for the removal of heavy metals. These mechanisms range from physicochemical interactions, such as adsorption, to processes that depend on cell metabolism, such as intracellular metal accumulation or extracellular precipitation of metals, as a result of excreted metabolities. Most of these mechanisms are however known from investigations on saprophytic fungi and only revealed for few mycorrhizal species. Among all mycorrhizal kinds the relation between toxic metals and the ericoid mycorrhiza is the most detailed case. The given data however, show that the mycorrhiza population responce to metal toxicity as well as the biochemical and molecular basis of tolerance is still poorly understood.

Key words: heavy metals, mycorrhiza, detoxification mechanisms

Dr hab. Katarzyna Turnau, Instytut Botaniki ,Uniwersytet Jagielloński, ul. Lubicz 46, 31–512 Kraków

WSTĘP

Istotą współżycia organizmów tworzących mikoryzę jest przekazywanie związków mineralnych z gleby do rośliny za pośrednictwem strzępek mikobionta, oraz transport produktów fotosyntezy z rośliny do grzybni. Stosując ogólnie przyjęty podział mikoryz wyróżniamy ektomikoryzę (grzybnia rozwija się na zewnątrz komórek roślin), endomikoryzę (grzybnia wnika do wnętrza komórek kortykalnych rośliny i nie tworzy mufki wokół korzenia) oraz typ pośredni, ektendomikoryzę (grzybnia penetruje komórki rośliny, równocześnie tworząc mufkę wokół korzenia). Charakteryzując wpływ metali toksycznych na mikoryzy w niniejszym opracowaniu uwzględniono dwa pierwsze typy, choć i w ich obrębie znajdują się grupy całkowicie dotychczas pominięte przy tego rodzaju badaniach.

GRZYBNIA ABSORPCYJNA

Bez względu na typ mikoryzy strukturą chłonącą substancje (w tym również metale toksyczne) ze środowiska zewnętrznego jest grzybnia ekstramatrykalna (strzępki absorpcyjne i sznury grzybni) przerastająca podłoże. Za jej pośrednictwem może odbywać się również wymiana substancji pomiędzy sąsiadującymi roślinami [1].

Jak dotąd niewielu badaczy mikoryzy poświęciło więcej uwagi strzępkom absorpcyjnym choć to właśnie one wydają się mieć największe znaczenie w regulacji transportu metali toksycznych, ewentualnej ich detoksyfikacji i selekcji już na powierzchni grzybni. Większość informacji pochodzi z badań nad grzybami saprofitycznymi i pasożytami, ale już wstępne obserwacje świadczą o zasadności wykorzystania tych badań w przypadku grzybów mikoryzowych. Zadaniem grzybni absorpcyjnej jest ochrona własna jak i symbiotycznego partnera. Realizacja tego zadania może nastąpić albo poprzez wytwarzanie substancji wiążących nadmiar metali, albo przez umiejętność szybkiego odcinania części skażonych za pomocą systemu sept (ryc. 1 A–D).

Ogólnie wiadomo, iż w wyniku obecności metali toksycznych w podłożu zarówno liczebność populacji jak i różnorodność gatunków mikroorganizmów ulega obniżeniu [37]. Rozwijają się organizmy, które dzięki adaptacji genetycznej lub fizjologicznej mają zdolność rozwoju i reprodukcji w takim siedlisku. Wiele związków organicznych wydzielanych na zewnątrz grzybni może mieć znaczenie w detoksykacji metali. Do nich należy kwas cytrynowy i szczawiowy. Ostatnio zwraca się również coraz większą uwagę na tzw siderofory, wiążące w warunkach naturalnych jony żelaza, przekazywane potem do wnętrza komórek gdzie są akumulowane. Pewne typy tych związków mogą brać udział w detoksyfikacji galu, niklu, uranu, toru i miedzi [36, 39, 40]. Podobnie, wydzielane jony fosforanowe mogą tworzyć nierozpuszczalne sole z metalami ciężkimi. Niezwykle ważne są też barwniki. Do grupy tej należy melanina [36, 38]. Z jej obecnością wiąże się zróżnicowanie komórek (nawet w obrębie tej samej grzybni) pod względem reakcji na metale toksyczne.

Inne mechanizmy służą detoksyfikacji metali wewnątrz komórek. Elementy te stwierdzono w różnego rodzaju osmofilnych ziarnistościach, których przykładem mogą być granule polifosforanowe, zlokalizowane wewnątrz wakuoli [37]. Na obecność metali takich jak Cd, Cu, Hg, Pb i Zn w podłożu niektóre organizmy reagują wytwarzaniem specyficznych białek jak metalotioneina, lub bogatych w grupy sulfhydrylowe peptydów jak kadystyna [96, 103, 104].

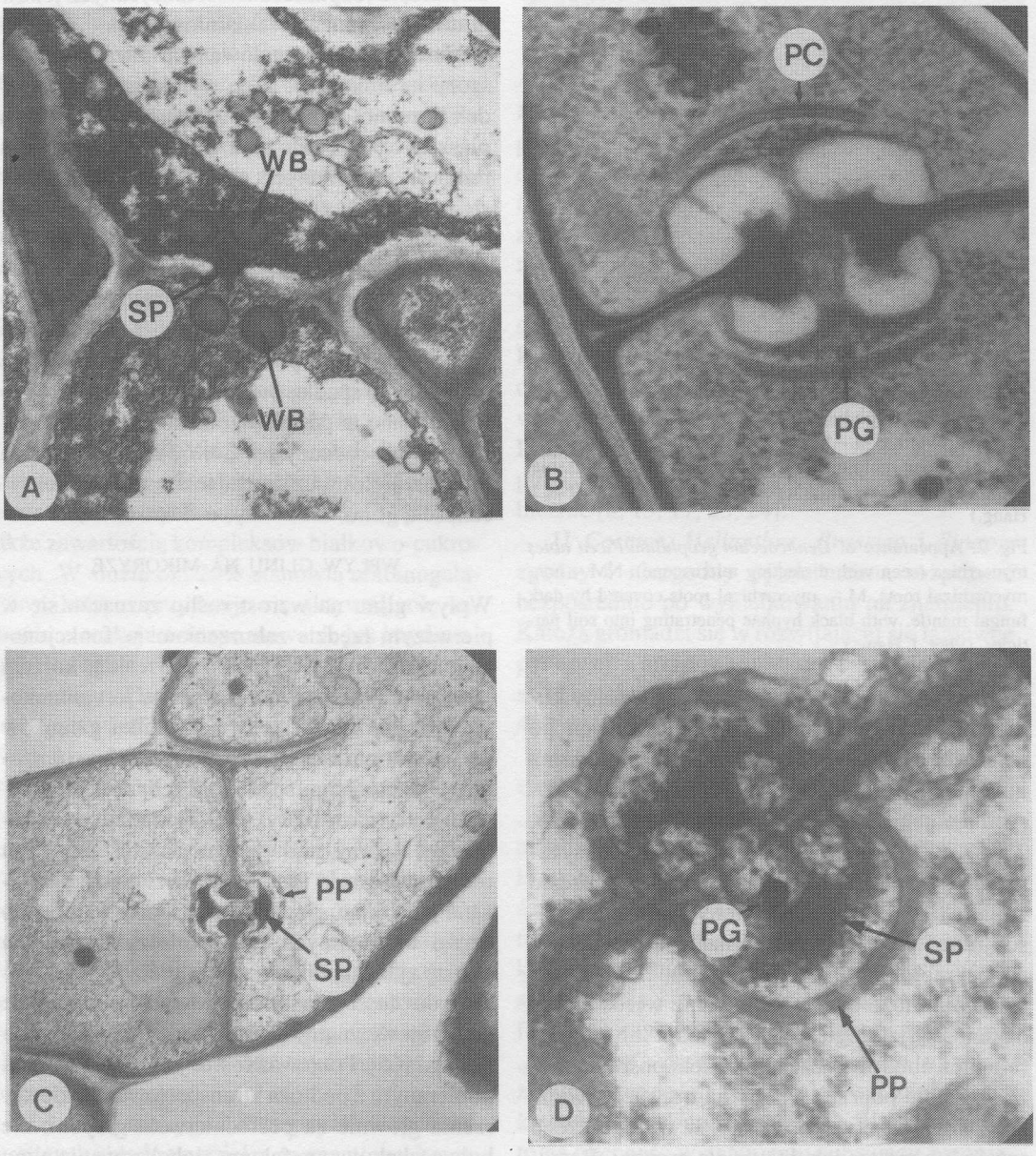
EKTOMIKORYZA

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Organizmami najczęściej tworzącymi ektomikoryzę są grzyby z klasy Asco- i Basidiomycetes, a wyjątkowo z klasy Zygomycetes (*Endogone* spp.) [1]. Ten typ mikoryzy charakteryzuje się występowaniem mufki wokół korzenia, oraz tzw. sieci Hartiga, która stanowi system strzępek wrastających pomiędzy komórki kortykalne i ściśle oplatających je (ryc. 2, 3). Miejscem wymiany substancji pomiędzy dwoma symbiontami jest obszar przylegania sieci Hartiga do komórek korzenia. Sciany komórkowe obu partnerów ulegają modyfikacji, a w cytoplazmie do nich przylegającej zaobserwować można zgrupowanie organelli świadczące o wzmożonej aktywności metabolicznej komórki.

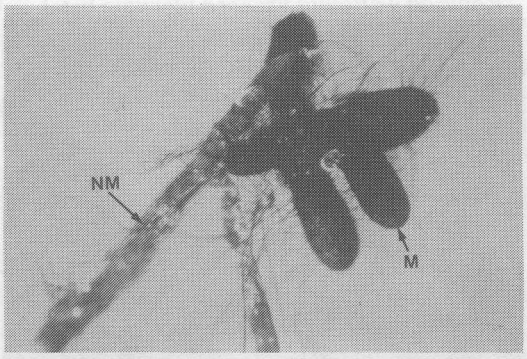
Mikoryzy nie są strukturami statycznymi, podlegają zmianom podczas ontogenezy (od stadiów inicjalnych, poprzez dojrzałe, do stadiów zamierania). Mogą też podlegać rozwojowi cyklicznemu, przechodząc w stan uśpienia, a następnie w stan wzmożonej aktywności. Analiza żywotności korzeni mikoryzowych wskazuje, iż tylko niewielki ich procent jest w pełni aktywny. Jako pierwsza najczęściej zamiera grzybnia mufki. Obumarcie komórek mufki nie zatrzymuje jednak transportu związków mineralnych przez strzępki ekstramatrykalne do sieci Hartiga. Nadal pełni ona również funkcje ochronne względem komórek korzenia.

Na żywotność obu partnerów w symbiozie wpływa cały szereg czynników. W 1990 roku odbyła się w Jackson (Wyoming, USA) ósma konferencja NACOM (North American Conference on Mycorrhizae) poświęcona w głównej mierze roli ektomikoryzy w reakcji roślin na zanieczyszczenia (CO_2, CO, CH_4, NO_x, SO_2, O_3, UV, zanieczyszczenia związkami organicz-



Ryc. 1. Septy grzybów z klasy Ascomycetes (A) i Basidiomycetes (B-D) pozwalające na określenie przynależności systematycznej mikoryz; W – ciałka Woronina, PC – parentosom ciągły, PP – parentosom perforowany, PG – ziarno polifosforanowe, SP – osmofilny materiał zasklepiający otwór septowy i blokujący międzykomórkowy transport substancji w przypadku uszkodzenia strzępki lub jej śmierci.

Fig. 1. Fungal septal structures of Ascomycetes (A) and Basidiomycetes class (B – D) helpful in identification of mycorrhiza; W – Woronin bodies, PC – continuous parenthesomes, PP – perforate parenthesome, PG – polyphosphate granule, SP – osmophilic material plugging septal pore and blocking intercellular nutrient transport on the hyphal death or damage.



Ryc. 2. Zewnętrzny wygląd mikoryzy *Cenococcum geophilum* utworzonej na korzeniach świerka (obserwowanej za pomocą mikroskopu binokularnego); NM – niemikoryzowe korzenie świerka, M – korzenie mikoryzowe pokryte ciemno zabarwioną mufą grzybową i charakterystyczną, czarną, sztywną grzybnią wrastającą pomiędzy grudki gleby. (Fot. I. Hang.)

Fig. 2. Appearance of *Cenococcum geophilum/Picea abies* mycorrhiza (seen with dissecting microscope); NM – non-mycorrhizal roots, M – mycorrhizal roots covered by dark fungal mantle, with black hyphae penetrating into soil particles. (Phot. I. Hang.)

nymi i metalami toksycznymi) oraz zmiany klimatyczne. W materiałach opublikowanych po tej konferencji czytelnik może znaleźć obszerną informację na temat większości czynników, których działanie badano w ostatnich latach [3, 25, 28, 67, 87]. Występowanie elementów toksycznych w podłożu, pociągające za sobą często zmiany fizyko-chemiczne gleby, w dwojaki sposób może wpływać na współzależności pomiędzy symbiontami. Bezpośrednim efektem ich działania może być zahamowanie wzrostu albo czynności fizjologicznych korzenia lub grzybni (albo też obu równocześnie). Efekt pośredni może wystąpić poprzez wpływ na transport związków węgla w obrębie rośliny, w wyniku czego rośnie lub maleje ich dostęp dla grzybni. Rezultatem jest często zahamowanie produkcji substancji służących detoksyfikacji tych metali. Pociąga to za sobą spadek aktywności biochemicznej i redukcję procesu poboru substancji odżywczych z gleby.

Związane z zanieczyszczeniami środowiska obniżenie wartości pH podłoża przyczynia się do wzrostu rozpuszczalności toksycznych jonów glinu. W warunkach szklarniowych poddano badaniom wpływ symulowanych kwaśnych deszczy na mikoryzy. Jako wynik uzyskano spadek liczebności mikoryz, szczególnie w glebach piaszczystych [63], oraz redukcję oddychania mikoryz utworzonych przez *Thelephora terrestris* i *Pisolithus tinctorius* [14]. Zmiany w składzie gatunkowym grzybów mikoryzowych obserwowali Dighton i Skeffington [26] którzy wiązali je jednak bardziej ze wzrostem dostępności jonów glinu aniżeli bezpośrednio z obniżeniem wartości pH. W badaniach tych nie stwierdzono spadku biomasy korzeni mikoryzowych. Dane te potwierdzone zostały przez szereg innych badaczy [6, 34, 62]. Dodatkowych informacji dostarczają badania nad samą toksycznością glinu.

WPŁYW GLINU NA MIKORYZĘ

Wpływ glinu na wzrost roślin zaznacza sie w pierwszym rzędzie zaburzeniami w funkcjonowaniu korzeni [31, 88]. Zarówno reakcja korzeni jak i ich mikoryzowych partnerów jest gatunkowo specyficzna. W przypadku kilku gatunków grzybów tworzących symbiozę z *Abies balsamea* odnotowano spadek liczebności tworzonych przez nie mikoryz [32]. Dodatkowo stwierdzono, iż przy podwyższonym stężeniu glinu rośnie zawartość fosforu w korzeniach, powiązana jednak ze spadkiem transportu fosforu do części nadziemnych [18]. Autorzy łączyli ten fakt ze zjawiskiem adsorpcji i precypitacji kompleksów fosforowo-aluminiowych w materiale zarówno wewnątrz – jak i miedzykomórkowym korzeni [65]. Ponieważ fosfor jest pierwiastkiem pobieranym z podłoża i transportowanym do korzenia głównie za pośrednictwem grzybni, nie było zaskakującym faktem zlokalizowanie glinu w ziarnistościach polifosforanowych, zwanych inaczej metachromatycznymi. Ziarnistości te występują powszechnie w wakuolach komórek grzybów [55, 105, 106]. Pomimo iż glin zostaje w ten sposób odizolowany od cytoplazmy, równoczesnie zablokowane zostaje źródło fosforanów, co prowadzi do zahamowania wzrostu

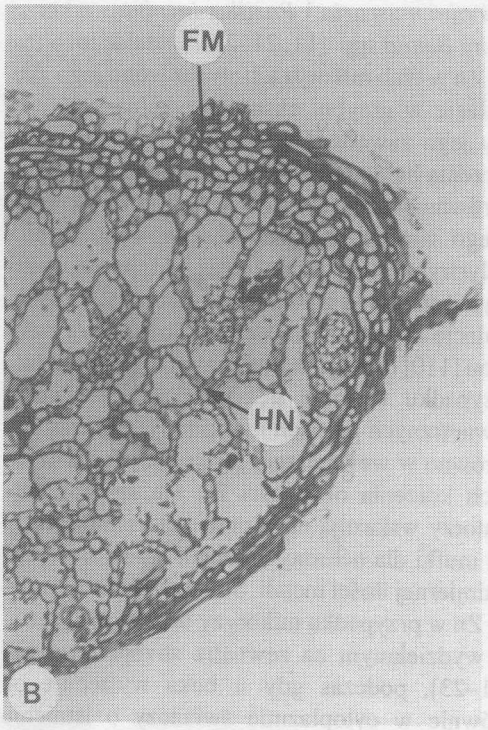
grzybni. W chwili obecnej nie ma żadnych danych wyjaśniających dalsze losy glinu w przypadku uruchomienia fosforanów. Akumulację glinu stwierdzono również w bogatym w fosfor materiale odkładanym na powierzchni grzybni u *Suillus variegatus* [109] oraz w melaninowej warstwie pokrywającej ciemno zabarwione strzępki mikoryz z grupy *Cenococcum* [107]. Pomimo iż glin wiązany jest przez bogate w fosfor substancje odkładane na powierzchni grzybni mufki lub grzybni ekstramatrykalnej, rola mikoryzy jako filtra biologicznego względem tego pierwiastka nadal nie jest jasna. Przeprowadzone ostatnio badania nad mikoryzą *Lactarius rufus* z korzeniami *Picea abies* wykazały, iż faktyczną barierę dla glinu stanowi endoderma [46, 50]. Niestety, w tym przypadku brakuje z kolei danych odnośnie istnienia mechanizmów blokujących Al w obrębie grzybni.

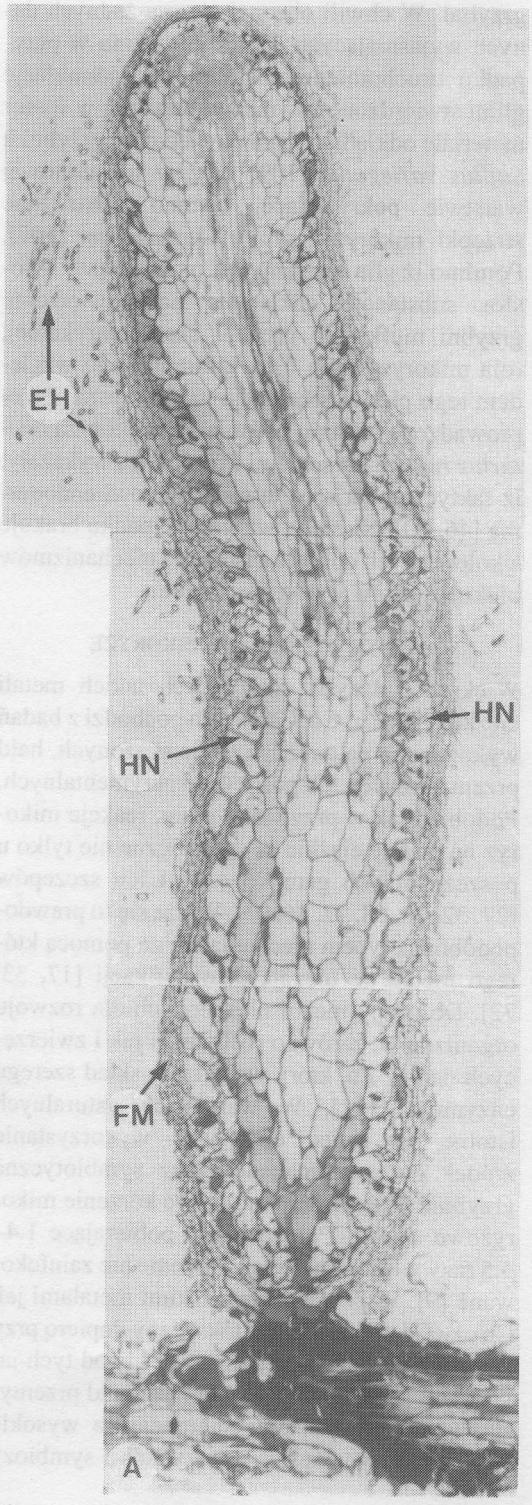
WPŁYW CYNKU NA MIKORYZĘ

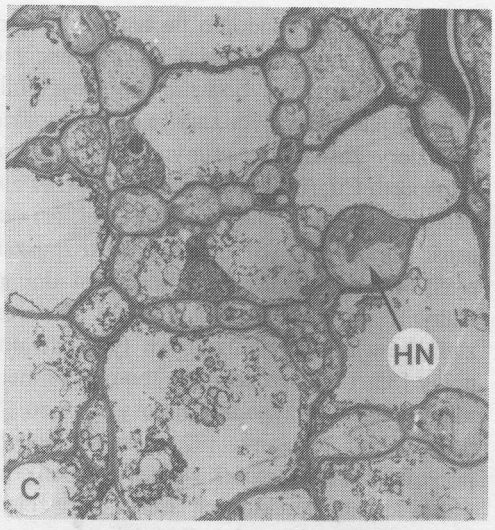
Większość danych dotyczących takich metali ciężkich jak Zn, Cu, Cd czy Pb pochodzi z badań wykonanych na terenach silnie skażonych, hałd przemysłowych lub poletek eksperymentalnych. Podobnie jak w przypadku glinu, reakcje mikoryz na metale ciężkie są specyficzne nie tylko u poszczególnych gatunków ale i ich szczepów [27, 32, 48, 68, 72, 86, 93]. Wiąże się to prawdopodobnie z typem mechanizmu, za pomocą którego metale te ulegają detoksyfikacji [17, 33, 72]. Do grupy metali niezbędnych dla rozwoju organizmów, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych należy Zn, który wchodzi w skład szeregu enzymów [111]. W warunkach naturalnych istotne jest więc efektywne wykorzystanie źródeł Zn, wspomagane przez symbiotyczną grzybnię. Przykładem mogą być korzenie mikoryzowe siewek *Pinus radiata* pobierające 1.4–4.5 razy więcej Zn aniżeli korzenie nie zainfekowane [9]. W porównaniu z takimi metalami jak Cu czy Cd, metal ten jest toksyczny dopiero przy znacznie wyższych stężeniach [111] od tych jakie spotkać można np. na terenach hałd przemysłowych. Podwyższoną tolerancję na wysokie stężenia Zn wykazano w przypadku symbiozy *Amanita muscaria* i *Paxillus involutus* z korzeniami *Betula* spp. [11, 21–24]. Badając lokalizację Zn w tych mikoryzach stwierdzono jego akumulację w grzybni ekstramatrykalnej, podczas gdy jego zawartość w mufce oraz w tkankach korzenia była mniej więcej podobnie niska [23]. Porównując mikoryzy *Fagus sylvatica*, pobrane z tego samego siedliska, obserwowano różnice w dystrybucji Zn w zależności od typu symbiozy a tym samym od gatunku mikobionta [29]. Akumulację Zn w mufce stwierdzono w mikoryzach dębu [110] oraz buka, przy czym w tym ostatnim przypadku wysokie stężenie Zn notowano w zewnętrznych partiach mufki [57], podczas gdy zarówno w wewnętrznej jej części jak i w tkankach korzenia obecności Zn nie stwierdzono. Autorzy wskazują na istotne znaczenie zwartości mufki dla ochrony korzenia przed dostępem nadmiernej ilości metali. Stwierdzenie akumulacji Zn w przypadku mikoryzy brzozy w materiale wydzielanym na zewnątrz strzępek grzybni [21–23], podczas gdy u buka występuje on głównie w cytoplazmie świadczy o istnieniu różnych, specyficznych dla danego gatunku, mechanizmów detoksyfikacji tego metalu [57].

WPŁYW MIEDZI NA MIKORYZĘ

Znacznie mniej wiadomo na temat odporności ektomikoryz na Cu. Z badań nad tolerancją tego metalu u roślin i grzybów nie tworzących mikoryz wynika, iż mechanizmy te można podzielić na cztery zasadnicze grupy: (a) zahamowanie transportu Cu, (b) detoksyfikacja poprzez związanie w obrębie ściany komórkowej, (c) odporność enzymów, (d) utworzenie rozpuszczalnych związków np. z aminokwasami akumulowanymi w obrębie wakuoli, (e) utworzenie związków nierozpuszczalnych typu metalotioneiny [35, 111]. Szczególnie ten ostatni mechanizm, choć w przypadku mikoryz bardzo słabo dotychczas poznany [72], prawdopodobnie przyniesie w przyszłości wiele wyjaśnień odnośnie tolerancji niektórych mikoryz względem miedzi. Zdolność produkcji białek z grupy metalotioneiny stwierdzono np. u *Pisolithus tinctorius* [72]. Związki te produkowane są przez


FM
HN
B


EH
HN
HN
FM
A


HN
C

szczepy odporne, w warunkach występowania metali ciężkich. Proces tworzenia tego typu substancji wiąże się z przeznaczeniem dodatkowych ilości związków węgla, które czerpane są od symbionta roślinnego. W warunkach niezaburzonych biorą one udział w innych procesach fizjologicznych. Z tego względu ogólny stan żywotności rośliny może w istotny sposób wpłynąć na wydajność mechanizmów obronnych [51, 101]. Duże nadzieje odnośnie wyjaśnienia mechanizmów odporności na metale toksyczne, wiąże się również z zagadnieniem barwników w obrębie mufki korzeniowej, a w szczególności z melaniną, której rola w wiązaniu Cu jest dobrze udokumentowana. Wzmożenie pigmentacji grzybni w obecności Cu u takich gatunków jak *Pisolithus tinctorius*, *Boletinellus merulioides* i *Suillus granulatus* wiąże się ze stymulacją produkcji tyrozynazy, enzymu aktywnego w czasie syntezy tych barwników [44]. Zarówno sam barwnik jak i enzymy (w zależności od gatunku grzyba tworzące się wewnątrz lub na zewnątrz komórek grzybni) biorące udział w jego syntezie, mogą przyczynić się do detoksyfikacji miedzi, tworząc z nią trwałe związki. Wśród nielicznych badań nad mikoryzami hodowanymi przy różnych stężeniach Cu, na uwagę zasługują obserwacje brzozy *Betula papyrifera*, u której przy wyższych stężeniach Cu wykazano negatywny wpływ badanych symbioz na wzrost siewek [52]. Te same gatunki grzybów korzystnie wpływały na wzrost siewek gdy zamiast Cu metalem testowanym był Ni. W tym przypadku obecność mikoryzy łączyła się ze znacznie niższą zawartością Ni w częściach nadziemnych niż w korzeniach. U dotychczas badanych roślin akumulujących Ni w dużych ilościach, metal ten stwierdzono w kompleksach z kwasem cytrynowym lub malonowym [111]. Ze względu na zdolność produkcji tego typu kwasów organicznych u grzybów mikoryzowych i tu można spodziewać się podobnego mechanizmu odporności.

WPŁYW ŻELAZA NA MIKORYZĘ

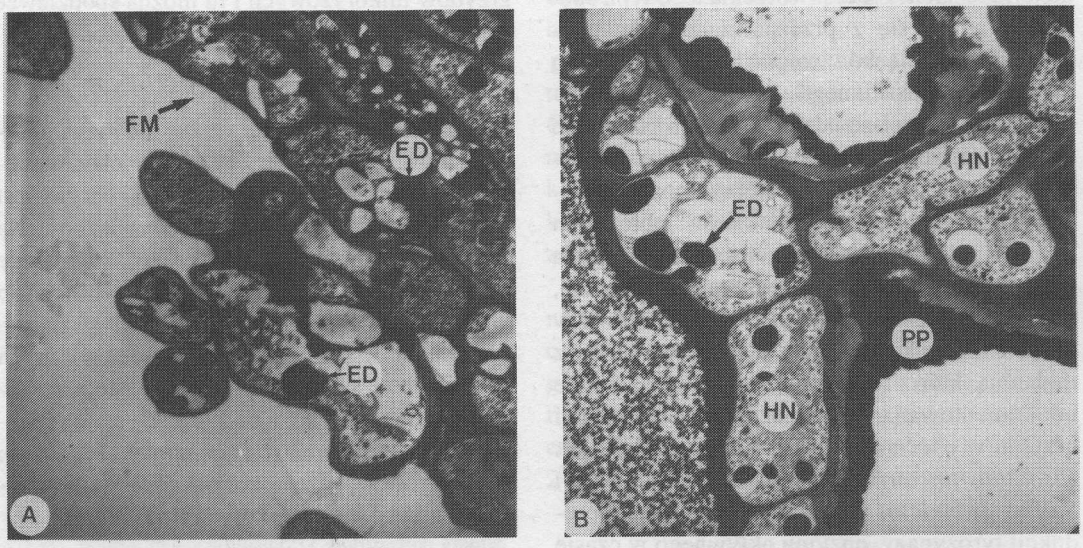
Jony żelaza są niezwykle ważne dla rozwoju organizmów żywych. Pierwiastek ten, choć występujący w naturze obficie, zazwyczaj obecny jest w formie trudno rozpuszczalnych związków. Na ogół większym problemem jest więc stworzenie warunków uwalniających ten pierwiastek do roztworu glebowego, aniżeli jego toksyczność. W ostatnich latach pojawiło się szereg danych na temat tzw. sideroforów, które pośredniczą w transporcie jonów Fe z podłoża. Związki te wydzielane są na zewnątrz organizmów. Produkcja sideroforów wykazana została również w przypadku grzybów ektomikoryzowych [84, 99].

WPŁYW KADMU NA MIKORYZĘ

Podobną do Zn i Cu lokalizację wykazuje Cd choć nie ma on podobnego do nich znaczenia. W niskich stężeniach nie jest on toksyczny dla roślin choć może być akumulowany w ich organizmie w ilościach szkodliwych dla roślinożerców. Z tego względu możliwość zatrzymania Cd w grzybni mikoryz jest zagadnieniem interesującym. Grzyby mikoryzowe wykazują duże zróżnicowanie pod względem tolerancji na ten pierwiastek. Cd całkowicie hamuje wzrost grzybni *Cenococcum graniforme* już przy stężeniach niższych niż 2ppm, podczas gdy w przypadku *Telephora terrestris* zjawisko to obserwowane jest dopiero przy stężeniu 350 ppm [66]. Cd nie tylko zmienia tempo wzrostu ale i ogólny obraz kolonii. Przykładem może być *Paxillus involutus*, którego grzybnia hodowana na pożywkach z dodatkiem tego metalu staje się gęstsza poprzez zwiększenie liczebności odgałęzień wyrastają-

Ryc. 3. Podłużny przekrój przez korzeń mikoryzowy dębu (A) i brzozy (B, C) z widoczną mufką korzeniową (FM), siecią Hartiga (HN) oraz grzybnią (EH) transportującą substancje z gleby do korzeni. Mikoryza dębu utworzona była przez grzyb z klasy Basidiomycetes (patrz ryc. 1C) podczas gdy w przypadku brzozy partnerem mikoryzowym był grzyb z klasy Ascomycetes (patrz ryc. 1A).

Fig. 3. Longitudinal section through oak (A) and birch (B, C) mycorrhizal roots with visible fungal mantle (FM), Hatig net (HN) and extramatrical hyphae (EH) transporting substances from soil to plant roots. Oak mycorrhiza was formed by basidiomycete member (see Fig. 1C) while in case of birch fungal partner belong to ascomycete class (see Fig. 1A).



Ryc. 4. Przekrój przez mikoryzę Paxillus involutus utworzoną na korzeniach sosny oglądany w mikroskopie transmisyjnym (TEM): A – mufka grzybowa (FM), B – sieć Hartiga (HN); W komórkach grzybni widoczny elektrono-gęsty materiał (ED) odkładany wewnątrz wakuol. W materiale tym, podobnie jak w polifenolach (PP) komórek roślinnych, zlokalizowano szereg metali ciężkich (EELS, ESI).

Fig. 4. Section through Paxillus involutus/Pinus sylvestris mycorrhiza (TEM); A – fungal mantle (FM), B – Hartig net (HN); Inside fungal hyphae electron-dense material (ED), deposited in vacuoles is visible. In this material, similarly as in polyphenolic material of plant cells, heavy metals were localized (EELS, ESI).

cych z tego samego miejsca, jak również przez zmniejszenie odległości pomiędzy poszczególnymi punktami rozgałęzień [20]. W badaniach tych stwierdzono obniżenie szybkości wzrostu P. involutus oraz silniejsze rozbudowanie grzybni rosnącej pod powierzchnią pożywki agarowej.

Obserwacje nad mikoryzami sosny pobranymi z poletek eksperymentalnych w Puszczy Niepołomickiej wykazały lokalizację Cd w ziarnistościach polifosforanowych jak również w barwnikach pokrywających grzybnię ekstramatrykalną oraz w przestrzeniach międzykomórkowych mufy korzenia mikoryz z grupy *Cenococcum*. Dodatkowo stwierdzono akumulację substancji wiążących Cd w wakuolach, oraz na powierzchni grzybni mikoryz *Paxillus involutus* (ryc. 4), przy czym substancje te zawierały duże ilości N i S, co poparte pozytywnymi wynikami testu Gomori-Swifta, sugeruje obecność związków typu fitochelatyn [106, 108].

WPŁYW OŁOWIU NA MIKORYZY

Przy znacznie wyższych stężeniach aniżeli w przypadku poprzednio omawianych metali, hamowany jest wzrost roślin przez Pb. Akumulowany jest on głównie w korzeniach [91] co wiązane jest z powolnym transportem tego pierwiastka [74]. Tempo transportu wzrasta przy obniżeniu pH, braku $CaCO_3$ oraz niskiej zawartości fosforu. Badania nad mikoryzą *Lactarius rufus* i *Paxillus involutus* u świerka, hodowanego w kulturach aksenicznych, nie wykazały istnienia mechanizmów ograniczających transport z grzybni do komórek korzenia [46, 49, 51]. Nie stwierdzono wzrostu stężenia Pb w częściach nadziemnych u *Pinus taeda*, wraz ze wzrostem

stężenia Pb w podłożu [15]. Zanotowano natomiast spadek ogólnej liczby ektomikoryz oraz liczebności morfotypów, przy charakterystycznym wzroście liczebności mikoryz z *Cenococcum geophilum*. Autorzy pracy upatrują w tych zmianach przyczyny długoterminowych upośledzeń w odżywianiu rośliny, bilansie wodnym oraz redukcji żywotności. Podobne wyniki uzyskali inni badacze [12, 27].

WPŁYW INNYCH CZYNNIKÓW NA EKTOMIKORYZĘ

Znacznie trudniejsze są badania prowadzone w siedliskach znajdujących się pod działaniem szeregu czynników stresowych. Wykonano szereg obserwacji porównawczych w terenach przemysłowo skażonych oraz wolnych od zanieczyszczeń, wykazując uszkodzenia u obu symbiontów mikoryzowych w terenach zanieczyszczonych [6, 7, 60, 69, 90, 95].Wprawdzie nie stwierdzono zmian w liczebności mikoryz pod wpływem zanieczyszczeń, jednak zanotowano obniżenie ich aktywności i różnorodności [56]. Wielu badaczy zwraca również uwagę na wzrost udziału mikoryz utworzonych przez grzyby z rodzaju *Cenococcum* [47, 62]. W porównaniu z innymi gatunkami, te ciemno zabarwione mikoryzy, o twardej mufce korzeniowej, choć dostarczają gospodarzowi małych ilości fosforu, zwiększają jednak odporność na suszę i niekorzystne warunki fizyko-chemiczne podłoża [58, 70, 79].

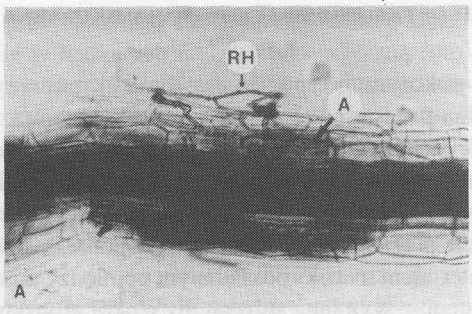
ENDOMIKORYZA

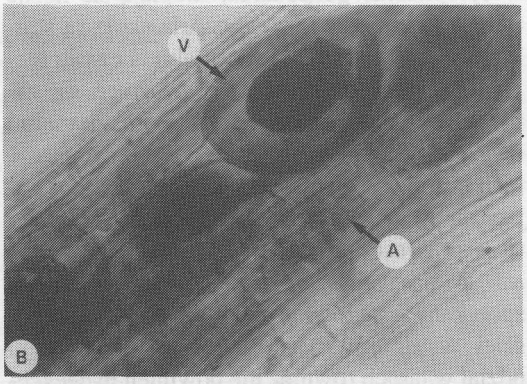
Cechą charakterystyczną mikoryzy endotroficznej jest penetracja komórek kortykalnych korzenia przez strzępki grzybni. Grzybnia rozwijająca się w glebie tworzy dwa rodzaje strzępek: absorpcyjne oraz tzw „runner hyphae" rosnące wzdłuż korzenia, a cechujące się szczególnie grubymi ścianami komórkowymi (ryc. 5). Jak dotychczas problem transportu metali potencjalnie toksycznych badano w przypadku mikoryzy erikoidalnej (u wrzosowatych) oraz mikoryzy VA (pęcherzykowo-arbuskularnej).

MIKORYZA PĘCHERZYKOWO-ARBUSKULARNA

W mikoryzach typu VA grzybnia ekstramatrykalna penetruje tkanki korzenia, tworząc w komórkach kortykalnych drzewkowate rozgałezienia nazywane arbuskulami oraz pęcherzyki (ryc.5). Poprzez cienkie ściany arbuskul, otoczonych plazmalemmą komórek gospodarza oraz materiałem matriks odkładanym pomiędzy nimi, następuje wymiana substancji. Wokół arbuskul, w cytoplazmie gospodarza, skupiają się liczne mitochondria oraz plastydy. Arbuskule są strukturami krótkotrwałymi i po jakimś czasie ulegają degeneracji. Pęcherzyki tworzące się zarówno wewnątrz komórek jak i pomiędzy nimi uważane są, ze względu na występowanie w nich kropli tłuszczowych, za organy magazynujące substancje zapasowe. Ten typ mikoryzy tworzony jest przez grzyby z grupy *Zygomycetes*. W naszych szerokościach geograficznych spotykany jest głównie u roślin zielnych, najczęściej w zbiorowiskach łąkowych, choć jego udział w lasach również nie powinien być lekceważony [108]. W tropikach występuje również u większości drzew i krzewów.

Strzępki grzybów tworzących mikoryzę VA pobierają z podłoża takie pierwiastki jak: P, Ca, Zn, Cu, S, B, N i Cl a następnie przekazują je do korzeni symbiotycznych roślin [2, 8, 13, 16, 81–83, 98, 102, 112]. Rozwój mikoryzy wpływa w szczególności na podwyższenie zawartości fosforu w roślinie. W wyniku kolonizacji korzeni roślin zielnych przez grzybnię mikoryzową stwierdzono również znaczny wzrost stężenia Cu w częściach nadziemnych [41, 42] oraz w korzeniach [43, 54] lub w całej roślinie [61]. Zjawisku temu towarzyszy wzrost stężenia fosforu. Również badania nad wzrostem drzewek cytrusowych na podłożach o różnej zawartości miedzi i fosforu potwierdziły te obserwacje [100]. Inne badania wykazały wzrost zawartości miedzi w roślinach po wprowadzeniu grzybów VA [53, 73, 85]. Stwierdzono również spadek zawartości miedzi i cynku u roślin mikoryzowych po zastosowaniu nawożenia związkami fosforu, które spowodowało redukcję stopnia







Ryc. 5. Struktury widoczne w korzeniach endomikoryzowych za pomocą mikroskopu świetlnego (A, B) oraz transmisyjnego, elektronowego (C); A,B – strzępki (RH) rosnące po powierzchni korzenia, penetrujące komórki kortykalne i tworzące wewnątrz nich zwoje (kłębki grzybni) lub arbuskule (A), stanowiące silnie rozgałęzioną grzybnię. Widoczne są również pęcherzyki (V), uważane za struktury magazynujące substancje zapasowe; C – arbuskule (A) otoczone plazmalemmą (P) komórki kortykalnej oraz matriks (M),gromadzącą się pomiędzy plazmalemmą gospodarza a ścianą komórkową grzybni (Fot. 5 B – T. Pawłowska).

Fig. 5. Endomycorrhizal structures seen inside endomycorrhizal roots using light (A, B) or electron microscope (C): A, B – sections through endomycorrhizal roots with runner hyphae (RH) growing on root surface, penetrating hyphae (PH) and hyphae forming peletons or arbuscules (A). Also vesicles (V), which are believed to serve as storage structures, are visible; C – arbuscules (A) lined with host plasmalemma (PL) and matrix (M) deposited between fungal cell wall and host plasmalemma (Phot. 5 B – T. Pawłowska).

penetracji przez symbiotyczne grzyby [42]. Jak dotąd tylko nieliczni badacze zajmowali się tym problemem w warunkach podwyższonej toksyczności metali lub w przypadku nadmiernych ich ilości (w wyniku emisji przemysłowych). Szereg gatunków grzybów tworzących mikoryzę VA reaguje w takich przypadkach zahamowaniem wzrostu. Spadek infekcji mikoryzowej automatycznie wiąże się wtedy z obniżeniem poboru innych pierwiastków, co z kolei obniża odporność rośliny [5, 75]. Z drugiej strony jednak stwierdzono występowanie innych szczepów tych samych gatunków, tworzących mikoryzy z roślinami zasiedlającymi tereny silnie zanieczyszczone. Podobnie więc jak w przypadku grzybów ektomikoryzowych, również w tym przypadku zmienność pod względem odporności na metale ciężkie może przyczynić się do kolonizacji terenów skażonych [4, 19, 42, 45, 94]. Jak dotychczas nie udało się wykazać na czym polegają mechanizmy odpornościowe tej grupy grzybów. W ostatnich latach przeprowadzono obserwacje za pomocą mikroskopii elektronowej wyposażonej w spektroskop analizujący, dystrybucję metali w mikoryzach *Pteridium aquilinum* [105], pobranych z terenów eksperymentalnie potraktowanych dawką do 2000t km^{-2} pyłów kadmowych. Wykazały one, iż takie metale jak kadm i glin pobierane są przez grzybnię absorpcyjną, a następnie najczęściej towarzysząc granulom polifosforanowym, transportowane są do wnętrza komórek kortykalnych. Metale, które ostatecznie dostają się do cytoplazmy gospodarza, gromadzą się w osmofilnych ziarnistościach zawierających stosunkowo duże ilości azotu i siarki co sugeruje detoksyfikację tych metali za pomocą fitochelatyn roślinnych.

MIKORYZA ERIKOIDALNA

Inny rodzaj endomikoryzy stwierdzono u roślin wrzosowatych, które często obejmują dominację na podłożach o niskich wartościach pH, co łączy się ze wzrostem toksyczności metali. Siedliska te, których przykładem mogą być wrzosowiska, gleby serpentynowe lub zwałowiska przemysłowe, charakteryzują się wolnym tempem mineralizacji (w szczególności związków azotu). Zarówno azot jak i fosfor transportowany jest do korzeni za pośrednictwem grzybni mikoryzowej, która czerpie je ze związków organicznych występujących w podłożu [71, 76, 97]. W przeciwieństwie do mikoryzy VA, endofity wrzosowatych należą do klasy Ascomycetes. Większość badań przeprowadzonych pod kątem działania metali toksycznych dotyczy *Hymenoscyphus ericeae* oraz *Oidiodendron griseum*, zdolnych do tworzenia symbiozy ze wszystkimi dotychczas przetestowanymi gatunkami roślin wrzosowatych. W komórkach kortykalnych włosowatych korzeni rozwija się grzybnia silnie rozgałęziona, często w postaci zwojów. Zajmuje ona aż do 70% objętości komórki gospodarza. Żywotność takiej wewnątrzkomórkowej grzybni wynosi od 4–5 tygodni i kończy się degeneracją cytoplazmy gospodarza [30]. Grzybnia zewnętrzna, której biomasa jest 10-krotnie mniejsza niż biomasa grzybni wewnątrzkomórkowej, rośnie po powierzchni korzenia kolonizując każdą z komórek kortykalnych z osobna. Na każdy centymetr korzenia *Calluna vulgaris* przypada około 250–2000 punktów penetracji [80]. Większość strzępek grzybni ekstramatrykalnej rośnie wzdłuż korzeni. Grzybnia ta penetruje podłoże w odległości nie większej niż 1 cm od powierzchni korzenia, przy czym większość rozwija się w strefie do 0.5 cm. Jest ona zdolna do wydzielania kwaśnej fosfatazy, enzymu którego produkcja stymulowana jest przy niskim stężeniu nieorganicznych związków fosforu [76] oraz do korzystania z organicznych fosforanów [71]. Pamiętając o wzmożonej toksyczności takich pierwiastków jak glin czy żelazo, w miejscach zasiedlanych przez rośliny wrzosowate istotnym zagadnieniem jest relacja pomiędzy tymi jonami a aktywnością enzymów służących uruchomieniu materii organicznej. Badania wykazały, iż enzymy te są szczególnie odporne na działanie metali toksycznych, tylko wówczas gdy w podłożu występuje niskie stężenie związków zawierających fosfor. W przypadku glinu aktywność fosfatazy produkowanej przez grzybnię była nieznacznie hamowana dopiero przy stężeniu 200mg/l [92], podczas gdy np. aktywność tego enzymu spada o 30% w przypadku niemikoryzowych korzeni *Agrostis capillaris* hodowanych przy stężeniu tylko 8mg/l [64]. Jony żelaza, w stężeniu od 25 do 100 mg/l, stymulują aktywność tego enzymu u *Hymenoscyphus* ericae [92]. Laboratoryjne badania nad odpornością mikoryzowych i niemikoryzowych roślin wrzosowatych potwierdzają udział grzybni endofitów w detoksyfikacji metali [10, 77, 78], które w głównej mierze pozostają w częściach podziemnych roślin. Metale te blokowane są na powierzchni i w obrębie ściany komórkowej grzybni. Badacze brytyjscy pracujący pod kierunkiem prof. Reada uważają, iż metale te wiązane są przez grupy karboksylowe związków pektynowych, które występują nie tylko na powierzchni grzybni ekstramatrykalnej ale również w matriks rozwijającej się wewnątrz komórek kortykalnych, pomiędzy endofityczną grzybnią a plazmalemmą gospodarza. Mechanizm taki byłby istotnie niezwykle efektywny, choćby ze względu na dużą powierzchnię grzybni wewnątrzkomórkowej – jak dotąd jednak nie ma przekonywujących dowodów na taką ich lokalizację. Wstępne badania nad rozmieszczeniem metali potencjalnie toksycznych w grzybni *Oidiodendron griseum* wykazały, że występują one w pigmencie pokrywającym trzonki konidialne oraz w ścianie konidiów. Wewnątrz grzybni metale akumulowane są w amorficznej substancji oraz w ziarnistościach polifosforanowych, znajdujących się w wakuolach.

Na odporność roślin wrzosowatych na niekorzystne warunki siedliskowe niewątpliwie wpływ ma również wzmożony transport jonów wapnia poprzez grzybnię mikoryzową [59] oraz

możliwość detoksyfikacji metali za pomocą sideroforów [89].

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Mikoryza jest zjawiskiem powszechnie występującym w zbiorowiskach lądowych i w chwili obecnej jej znaczenie w odżywianiu roślin nie podlega już wątpliwościom. Oba organizmy tworzące symbiozę potrzebują dla swego rozwoju szeregu metali ciężkich. Znacznie łatwiejszy dostęp do nich mają jednak strzępki grzybów. Przy niskich stężeniach metali ciężkich w podłożu, lub ich małej dostępności dla korzeni roślin, udział symbiotycznej grzybni jest warunkiem koniecznym. Obecność ich nadmiernych ilości w środowisku powoduje jednak zaburzenie równowagi symbiozy, ograniczając liczebność gatunków zdolnych do przeżycia. Pozostają tylko te, zarówno wśród roślin jak i grzybów, które zdolne są do szybkiej adaptacji i tolerancji dzięki odpowiednim mechanizmom obronnym. Zestawione powyżej informacje świadczą o istnieniu mikoryzowych gatunków grzybów, mogących umożliwić roślinom zasiedlenie terenów skażonych. Jest to szczególnie ważne w przypadku gatunków obligatoryjnie mikoryzowych, do których należą drzewa. Przy obecnym stanie zbadania zagadnienia, wciąż jeszcze jednak nie można odpowiedzieć na pytanie na ile efektywnym filtrem względem metali toksycznych jest symbiotyczna grzybnia. Jak się okazuje, akumulacja tych metali w korzeniach mikoryzowych nie stanowi tu wystarczającego argumentu, bowiem jak wykazano np. dla Pb, faktyczną barierę stanowiła w badanych przypadkach endoderma. Akumulacja w korzeniach mikoryzowych nie jest więc jednoznaczna z akumulacją w grzybni symbiotycznej. Wiemy, iż szereg metali ciężkich dociera do miejsca wymiany substancji między symbiontami wraz z fosforem, tworzącym ziarna polifosforanowe. Co dzieje się dalej, jest w tej chwili niewiadome. Interesujące będzie śledzenie procesu współdziałania obu organizmów w walce o przetrwanie. W chwili obecnej takich badań zupełnie brak. Wiemy jedynie, iż transport zarówno związków węgla do grzybni jak i szeregu pierwiastków lub związków do komórek korzenia, wzajemnie wpływa na procesy detoksyfikacji.

Duże nadzieje na wyjaśnienie zagadnienia rokuje zastosowanie do badań technik mikroskopii elektronowej lub protonowej, połączonych z różnego rodzaju aparaturą ujawniającą dystrybucję poszczególnych elementów. Tego rodzaju metody w połączeniu z badaniami histochemicznymi zapewne uzupełnią naszą wiedzę.

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje Panu Profesorowi Stanisławowi Więckowskiemu oraz Panu Docentowi Zbigniewowi Miszalskiemu, których wnikliwość pozwoliła na uniknięcie szeregu usterek w tekście oraz za pomoc w skompletowaniu bibliografii.

LITERATURA

[1] ALLEN M. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge Univ. Press.

[2] AMES R. N., REID C. P. P., PORTER L. K., CAMBARDELLA C. 1983. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ^{15}N labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* **95:** 381–396.

[3] ANDERSEN C. P., RYGIEWCZ P. T. 1991. Stress interactions and Mycorrhizal Plant Response: Understanding Carbon Allocation Priorities. Environ. Pollution **73**(3, 4): 217–244.

[4] ANTONOVICS, J., BRADSHAW, A. D., TURNER, R. G. 1971. Heavy metal tolerance in plants. Advances in Ecological Res. **7:** 1–85.

[5] BAKER A. J. M. 1978. Zinc-phosphorus interactions in a zinc tolerant and non-tolerant population of *Silene maritima* Wilt. *New Phytol.* **81:** 331–340.

[6] BLASCHKE, H. 1988. Mycorrhizal infection and changes in fine-root development of Norway spruce influenced by acid rain in the field. In Ectomycorrhiza and Acid Rain, ed. A. E. Jansen, J. Dighton & A. H. M. L. Bresser. Proc. Worksh. Exp. Meeting, Berg en Dal. CEC, Air Pollution Report, 12.

[7] BLASCHKE, H., BREHMER U., Schwartz, H. 1985. Wurzelschäden und Waldsterben: Zur Bestimmung morphometrischer Kenngröser von Feinwurzelsystemen mit dem IBAS-erste Ergebnisse, *Forstw. Cbl.* **104:** 199–205.

[8] BOWEN G. D. 1980. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In Tropical Mycorrhiza Re-

search. Ed. P Mikola, pp 165–190. Clarendon Press, Oxford.

[9] BOWEN G. D., SKINNER M. F., BEVEGE D. I. 1974. Zinc uptake by mycorrhizal and uninfected roots of *Pinus radiata* and *Araucaria cunninghamii*. *Soil Biol. Biochem.* **6:** 141–144.

[10] BRADLEY, R., BURT, A. J., READ D. J. 1982. The biology of mycorrhiza in the Ericaeae. VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance. *New Phytol.* **91:** 197–209.

[11] BROWN, M. T., WILKINS D. A. 1985. Zinc tolerance of mycorrhizal Betula. New Phytol. **99:** 101–106.

[12] BURTON K. W., MORGAN E., ROIG A. 1984. The influence of heavy metals upon the growth of sitka spruce in South Wales. II. Greenhouse experiments. *Plant and Soil* **78:** 271–282.

[13] BUWALDA, J. G., STRIBLEY D. P., TINKER P. B. 1983. Increased uptake of bromine and chloride by plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **93:** 217–225.

[14] CARNEY, J. L., GARRET, H. E., HEDRICK H. G. 1978. Influence of air pollutant gases on oxygen uptake of pine roots with selected ectomycorrhizae. *Phytopathology* **68:** 1160–3.

[15] CHAPPELKA A. H., KUSH J. S., RUNION G. B., MEIER S., KELLEY W. D. 1991. Effects of soil-applied lead on seedling growth and ectomycorrhizal colonization of loblolly pine. *Environ. Pollut.* **72:** 307–316.

[16] COOPER K. M., TINKER P. B. 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytol.* **81:** 43–52.

[17] CROMACK K., Jr, TODD R. L., MONK C. D. 1975. Patterns of basidiomycete nutrient accumulation in conifer and deciduous forest litter. *Soil Biol. Biochem.* **7:** 265–8.

[18] CUMMING J. R., ECKERT R. T., EVANS L. J. 1985. Effects of aluminium on potassium uptake by red spruce seedlings. *Can. J. Bot.* **16:** 1099–103.

[19] DAFT M. J., HACKSCAYLO E., NICKOLSON T. H. 1975. Arbuscular mycorrhizas in plants colonising coal spoils in scotland and Pennsylvania. W: F. E. SANDERS, B. MOSSE, P. B. TINKER (red.), *Endomycorrhizas* pp. 561–580. Academic Press, London.

[20] DARLINGTON A. B., RAUSER W. E. 1988. Cadmium alters the growth of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: a new growth model accounts for changes in branching. *Can. J. Bot.* **66:** 225–229.

[21] DENNY H. J., WILKINS D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula* spp. I. Effect of external concentration of zinc on growth and uptake. *New Phytol.* **106:** 517–524.

[22] DENNY H. J., WILKINS D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula* spp. II. Microanalytical studies of zinc uptake into root tissues. *New Phytol.* **106:** 525–534.

[23] DENNY H. J., WILKINS D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula* spp. III. Variation in response to zinc ampng ectomycorrhizal associates. *New Phytol.* **106:** 535–544.

[24] DENNY H. J., WILKINS D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula*. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytol.* **106:** 533–545.

[25] DIGHTON J., JANSEN A. E. 1991. Atmospheric Pollutants and Ectomycorrhizae: More Questions Than Answers? *Environ. Pollution* **73**(34): 179–204.

[26] DIGHTON J. A., SKEFFINGTON R. A. 1987. Effects of artificial acid precipitation on the mycorrhizas of Scots pine seedlings. *New Phytol.* **107:** 191–202.

[27] DIXON, R. K., BUSCHENA, C. A. 1988. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant and Soil* **105:** 191–202.

[28] DIXON R. K., TURNER D. P. 1991. The Global Carbon Cycle and Climate Changes: Responses and Feedbacks from Below-ground Systems. Environ. *Pollution* **73**(3/4): 245–262.

[29] DONNER B., HEYSER W. 1988. Buchenmykorrhizen: Möglichkeiten der Elementselektion. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* (in press).

[30] DUDDRIDGE J. A., READ D. J. 1982. An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Rhododendron ponticum*. *Can. J. Bot.* **60:** 2345–6.

[31] ELDHURST T., GORANSSÖN A., INGESTAD T. 1987. Aluminium toxicity in forest tree species. W: T. C. HUTCHINSON, K. M. MEEMA (red.), *Effects of Pollutants on Forests, Wetlands and Agricultural Ecosystems*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 401–9.

[32] ENTRY J. A., CROMACK K., Jr, STAFFORD S. G., CASTELLANO M. A. 1987. The effect of pH and aluminium concentration on ectomycorrhizal formation in Abies balsamea. *Can. J. For. Res.* **17:**865–71.

[33] ERNST W. 1976. Physiological and Biochemical Aspects of Metal Tolerance. W: T. A. MANSFIELD (red.), *Effects of Air Pollutants on Plants*, Cambridge University Press, New York.

[34] ESTIVALENT D., PERRIN R., Le TACON F., GARBAYE J. 1988. Microbial aspects of forest decline in the Vosges. W: A. E. JANSEN., J. DIGHTON, A. H. M. L. BRESSER (red.), Ectomycorrhiza and Acid Rain, Proc. Workshop. Exp. Meeting, Berg an Dal.

[35] FERNANDES J. C., HENRIQUES F. S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review* **57**(3): 246–273.

[36] GADD G. M. 1980. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiol. Letters* **9:** 237–240.

[37] GADD G. M. 1990. Metal tolerance. (in) Microbiology of extreme environments. (ed.) Clive Edwards, Open University Press Milton, Keynes, Oxford, Alden Press: 178–218.

[38] GADD. M., de ROME L. 1988. Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29:** 610–617.

[39] GADD G. M., EDWARDS S. W. 1986. Heavy-metal-in-

duced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connexions with iron metabolism. *Trans. Br. mycol. Soc.* **87**(4): 533–546.

[40] GADD G. M., GRIFFITHS A. J. 1980. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **74**(2): 387–392.

[41] GILDON A., TINKER P. B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **95:** 247–261.

[42] GILDON A., TINKER P. B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. II. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytol.* **95:** 263–268.

[43] GNEKOW M. A. & MARSCHNER H. 1989. Role of VA mycorrhiza in growth and mineral nutrition of apple (*Malus pumila* var. *domestica*) rootstock cuttings. *Plant and Soil* **119:** 285–293.

[44] GRUHN C. M., MILLER O. K. 1991. Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* **95**(3): 268–272.

[45] HARLEY, J. L. 1970. The importance of micro-organisms to colonizing plants. *Transactions and Proceedings of the Botanical Society of Edinburgh* **41:** 65–70.

[46] HODSON M. J., WILKINS D. A. 1991. Localization of aluminium in the roots of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] inoculated with *Paxillus involutus* Fr. *New Phytol.* **118:** 273–278.

[47] HOLOPAINEN T. & VAITTINEN S. 1988. Observations on Scots pine mycorrhizae in the surroundings of a fluting mill. *Karstenia*, **28:** 35–9.

[48] JANA Z., NADA G. 1989. Influence of Aluminium on Mycorrhizae. In Agriculture, Ecosystems and Environment. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 569–73.

[49] JENTSCHKE G., FRITZ E., GODBOLD D. L. 1991. Distribution of lead in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce seedlings. *Physiol. Plant.* **81:** 417–422.

[50] JENTSCHKE G., GODBOLD D. L., HÜTTERMANN A. 1991. Culture of mycorhhizal tree seedlings under controlled conditions: Effects of nitrogen and aluminium. *Physiol. Plant.* **81:** 408–416.

[51] JOHNSON, A. H. 1989. Decline of red spruce in the Northern Appalachians: Determining if air pollution is an important factor. In Biologic Markers of Air Pollution Stress and Demage in Forests. National Academy Press, Washington, DC pp. 91–104.

[52] JONES M. D., HUTCHINSON T. C. 1986. The effect of mycorrhizal infection on the responce of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytol.* **102:** 429–442.

[53] KLEINSCHMIDT G. D., GERDEMANN J. W. 1972. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. *Phytopathol.* **62:** 1447–1453.

[54] KOTHARI S. K., MARSCHNER H. & RÖMHELD V. 1991. Contribution of the VA mycorhizal hyphae in aquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil* **131:** 177–185.

[55] KOTTKE I. 1991. Electron-energy-loss spectrometry and imaging technique for subcellular localization of elements in mycorrhizae. *Methods in Microbiology* **21:**

[56] KOWALSKI S. 1987. Mycotrophy of trees in converted stands remaining under strong pressure of industrial pollution. *Angew. Botanik* **61:** 65–83.

[57] KUMPFER W., HEYSER W. 1989. Zinc accumulation in beech mycorrhizae – a mechanism of zinc tolerance? Agricult., *Ecosyst. Environ.* **28:** 279–283.

[58] LANGLOIS C. G., FORTIN J. A. 1984. Seasonal variations in the uptake of [32P]phosphate ions by excised ectomycorrhizae and lateral roots of *Abies balsamea*. *Can. J. For. Res.* **14:** 412–15.

[59] LEAKE J. R., READ D. J. 1989. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XV. The effect of mycorrhizal infection on calcium uptake by *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *New Phytol.* **113:** 535–544.

[60] LISS B., BLASCHKE H., SCHOTT P. 1984. Vergleichende Feinwurzeluntersuchungen an gesunden und erkrankter Altfichten auf zwei Standorten in Bayern – ein Beitrag zur Waldsterbensforschung. *Eur. J. For. Path.* **14:** 340–356.

[61] MANJUNATH A. & HABTE M. 1988. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant and Soil* **106:** 97–103.

[62] MARKKOLA A. M., OHTONEN R. 1988. Mycorrhizal fungi and biological activity of humus layer in polluted pine forests in the surrounding of Oulu. *Karstenia* **28:** 45–7.

[63] MCAFEE B. J., FORTIN J. A. 1987. The influence of pH on the competetive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. *Can. J. For. Res.* **17:** 859–64.

[64] MCCAIN S., DAVIES M. S. 1984. Effects of pretreatment with phosphate in natural populations of *Agrostis capillaris* L. II. Interactions with aluminium on the acid phosphatase activity and potassium leakage of intact roots. *New Phytol.* **96:** 589–599.

[65] MC CORMICK L. H., BORDEN F. Y. 1974. The occurrence of aluminium phosphate precipitate in plant roots. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **38:** 931–4.

[66] MCCREIGHT J. D., SCHROEDER D. B. 1982. Inhibition of growth of nine ectomycorrhizal fungi by cadmium, lead and nickel in vitro. *Environ. Exp. Bot.* **22:** 1–7.

[67] MEIER S. 1991. Quality versus quantity: Optimizing Evaluation of Ectomycorrhizae for Plants Under Stress. Environ. *Pollution* **73**(3/4): 205–216.

[68] MEIER S., ROBARGE W. P., BRUCK R. I. & GRAND L. F. 1989. Effects of simulated rain acidity on ectomycorrhizae of red spruce seedlings potted in natural soil. *Environ. Pollut.* **59:** 315–324.

[69] MEYER F. H. 1987. Das Wurzelsystem geschädigter Waldbestände. Allg. Forst Zeitschr. 27–**29:** 254–7.

[70] MIKOLA P. 1948. On the physiology and ecology of *Cenococcum graniforme*, especially as a mycorrhizal fungus of birch. *Commun. Institut. For. Fenn.* **36:** 1–101.

[71] MITCHELL D. T., READ D. J. 1981. Utilization of inorganic and organic phosphates by the mycorrhizal endophytes of *Vaccinium macrocarpon* and *Rhododendron ponticum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76:** 255–260.

[72] MORSELT A. F. W., SMITS W. T. M., LIMONARD T. 1986. Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in Ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **96:** 417–420.

[73] MOSSE B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopatology* **11:** 171–196.

[74] NAKOS G. 1979. Lead pollution: Fate of lead in the soil and its effects on *Pinus halepensis*. *Plant and Soil* **53:** 427–443.

[75] OLSEN S. R. 1972. Micronutrients interactions. W: J. J. MORTVEDT, P. P. GIORDANO, W. L. LINDSAY (red.), *Micronutrients in Agriculture* pp. 243–264. Soil Science Society of America, Madison.

[76] PEARSON V., READ D. J. 1975. The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **64:** 1–7.

[77] READ D. J. 1983. The biology of mycorrhiza in the Ericales. *Can. J. Bot.* **61:** 985–1004.

[78] READ D. J. 1984. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. W: D. H. JENNINGS, A. D. M. RAYNER (red.)., *The ecology and physiology of the fungal mycelium.* Cambridge Univ.Press, Cambridge: 215–240.

[79] READ D. J., KIANMEHR H., MALIBARI A. 1977. The biology of mycorrhiza in *Helianthemum* Mill. *New Phytol.* **78:** 305–12.144

[80] READ D. J., STRIBLEY D. P. 1975. Some mycological aspects of the biology of mycorrhizas in the Ericaceae. W: F. E. SANDERS, B. MOSSE, P. B. TINKER (red.), *Endomycorrhizas*, pp. 105–17. London, New York: Academic Press.

[81] RHODES L. H., GERDEMANN J. W. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytol.* **75:** 555–561.

[82] RHODES L. H., GERDEMANN J. W. 1978a. Translocation of calcium and phosphate by external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Soil. Science* **126:** 125–126.

[83] RHODES L. H., GERDEMANN J. W. 1978b. Hyphal translocation and uptake of sulphur by vesicular-arbuscular mycorrhizae of onion. *Soil Biology and Biochemistry* **10:** 355–360.

[84] RODRIQUEZ R. K., KLEMM D. J., BARTON L. L. 1984. Iron metabolism by an ectomycorrhizal fungus, Cenococcum graniforme. *J. Plant Nutr.* **7**(1/5): 459–468.

[85] ROSS J. P. 1971. Effect of phosphate fertilization on the yield of mycorrhizal and non-mycorrhizal soybeans. *Phytopathol.* **61:** 1400–1403.

[86] ROUILLON R., POULAIN C., BASTIDE J. & COSTE C. M. 1989. Degradation of the herbicide chlorpropham by some ectomycorrhizal fungi in pure culture. In Agriculture, Ecosystems and Environment, Vol. 28. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 421–424.

[87] SCHAFER S. R. & SCHOENEBERGER M. M. 1991. Mycorrhizal Mediation of Plant Response to Atmospheric Change: Air Quality Concepts and Research Considerations. *Environ. Pollution* **73**(3/4): 163–178.

[88] SCHIER G. A. 1985. Response of red spruce and balsam fir seedlings to aluminium toxicity in nutrient solutions. *Can. J. For. Res.* **15:** 29–33.

[89] SCHULER R., HASELWANDTER K. 1988. Hydroxamate siderophore production by ericoid mycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr.* 11(6–11): 907–913.

[90] SCHÜTT P., COWLING E. B. 1985. Waldsterben, a general decline of forests in Central Europe: Symptoms, development and possible causes. *Plant Dis.* **69:** 548–558.

[91] SEILER J. R., PAGANELLI D. J. 1987. Photosynthesis and growth response of red spruce and loblolly pine to soil applied lead and simulated acid rain. *For. Sci.* **33:** 668–675.

[92] SHAW G., READ D. J. 1989. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XIV. Effects of iron and aluminium on the activity of acid phosphatase in the ericoid endophyte Hymenoscyphus ericae (Read) Korf and Kernan. *New Phytol.* **113:** 529–533.

[93] SIMMONS G. L., KELLY J. M. 1989. Influence of O_3, rainfall acidity and soil Mg status on growth and ectomycorrhizal colonization of loblolly pine roots. *Water, Air, Soil Pollut.* **44:** 159–71.

[94] SMITH R. A. H., BRADSHAW A. D. 1979. The use of metal tolerant plant populations of the reclamation of metallferrous waste. *Journal of Applied Ecology* **16:** 595–612.

[95] SOBOTKA A. 1964. Effects of industrial exhalations on soil biology of Norway spruce stands in the Ore Mountains, *Lesnicky Casopis* **37:** 987–1002.

[96] STEFFENS J. C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41:** 553–575.

[97] STRIBLEY D. P., READ D. J. 1980. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VII. The relationship between mycorrhizal infection and and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytol.* **86:** 365–371.

[98] SWAMINATHAN K., VERMA B. C. 1979. Responses of three crop species to vesicular arbuscular mycorrhizal infection on zinc deficient Indian soils. *New Phytol.* **82:** 481–487.

[99] SZANSZILO P. J., POWELL P. E., REID C. P. P., CLINE G. R. 1981. Production of hydroxamate siderophore iron chelators by ectomycorrhizal fungi. *Mycologia* **73:** 1158–1174.

[100] TIMMER L. W., LEYDEN R. F. 1980. The relationship of mycorrhizal infection to phosphorus-induce copper deficiency in sour orange seedling. *New Phytol.* **85:** 15–23.

[101] TINGEY D. T., ANDERSEN C. P. 1991. The physiological basis of differential plant sensitivity to changes in atmospheric quality. W: G. E. TAYLOR, Jr, L. F. PITELKA, M. T. CLEGG. (red.), *Ecological Genetics and Air Pollution.* Springer-Verlag, New York, pp. 209–34.

[102] TINKER P. B. 1978. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiologie Vegetale* **16:** 743–751.

[103] TUKENDORF A. 1990. Rola kompleksów metaloproteinowych w tolerancji roślin wyższych na toksyczne stężenia metali ciężkich. Rozprawa habilitacyjna Uniw. M. Curie-Skłodowska – Lublin 39.

[104] TUKENDORF A. 1989. Białka i peptydy wiążące metale ciężkie. *Post. Biochem.* **35:** 141–153.

[105] TURNAU K., KOTTKE I., OBERWINKLER F. 1993. Element distribution in *Pteridium aquilinum* mycorrhiza. *New Phytol.* **123:** 313–324.

[106] TURNAU K., KOTTKE I., OBERWINKLER F. 1993. Element localization in *Paxillus involutus – Pinus sylvestris* mycorrhizas using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Bot. Acta* 245–249.

[107] TURNAU K., KOTTKE I., OBERWINKLER F. 1992. Heavy metal distribution in mycorrhizas from strongly polluted sites. Proceedings of IUFRO Congress on Air Pollution and Interactions between Organisms in Forest Ecosystems. Sept. 9–11. 1992 245–249.

[108] TURNAU K., MITKA J., KĘDZIERSKA A. 1992. Mycorrhizal status of herb-layer plants in a fertilized oak-pine forest. *Plant and Soil.* **143:** 148–152.

[109] VÅRE H. 1990. Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry. *New Phytol.* **116:** 663–668.

[110] WASSERMANN J. L., MINEO L., MAJUMDAR S. K., VANTYNE 1987. Detection of heavy metals in oak mycorrhizae northeastern Pensylvanian forests using X-ray microanalysis. *Can. J. Bot.* **65:** 2622–2627.

[111] WOOLHOUSE W. H. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. Enzycl. *Plant Physiol.* **7:** 245–307.

[112] XIAO-LIN L., MARSCHNER H., ECKHARD G. 1991. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil* **136:** 49–57.