

**Uniwersytet Śląski w Katowicach**

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Wydział Nauk Przyrodniczych

**PRACA DOKTORSKA**

**Żaneta Gieroń**

**„Tolerancja i akumulacja metali ciężkich  
u *Arabidopsis arenosa* – badania terenowe  
i laboratoryjne nad mechanizmami  
hyperakumulacji”**

Promotor:

dr hab. Eugeniusz Małkowskiego, prof. UŚ

Promotor pomocniczy:

dr Krzysztof Sitko

Katowice 2023

*Pragnę serdecznie podziękować*

***dr hab. Eugeniuszowi Małkowskiemu, prof. UŚ***

*za mądrość, przekazanie ogromu wiedzy i cenne wskazówki, udzielane podczas pisania  
i przygotowywania mojej rozprawy doktorskiej.*

***dr Krzysztofowi Sitko***

*za wielką pomoc, wsparcie i niezwykle zaangażowanie w proces badawczy, jak również  
gotowość do dyskusji i motywację do dalszych działań.*

***dr Michałowi Szopińskiemu i Paulinie Zieleźnik-Rusinowskiej***

*za nieocenioną pomoc i niezliczone godziny spędzone nad badaniami, jak również za dobre  
rady i zrozumienie.*

*Pragnę również podziękować narzeczonemu*

***Krzysztofowi Musiałowi***

*za nieustającą wiarę w moje możliwości i wsparcie w najtrudniejszych chwilach.*

***Rodzicom***

*za poświęcenie włożone w moje wykształcenie i motywację do podjęcia tego wyzwania.*

# Spis treści

Wykaz skrótów .....	5
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 <i>Arabidopsis arenosa</i> – ogólne informacje.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Adaptacja do autopoliploidalności.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 <i>Arabidopsis arenosa</i> a toksyczne metale śladowe .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Tolerancja metali śladowych i interakcja z mikroorganizmami glebowym .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Eksperyment I .....</b>	<b>22</b>
<b>Ekofizjologia <i>Arabidopsis arenosa</i>, nowego hyperakumulatora Cd i Zn.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Cel .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Materiały i metody.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1 Opis stanowisk badawczych.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 Fluorescencja chlorofilu <i>a</i> i pomiar zawartości barwników .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3 Pobór i analiza prób roślinnych i glebowych .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.4 Cytometria przepływowa .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Wyniki.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Akumulacja metali w pędach roślin .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.2 Zawartość barwników .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.3 Zawartość jądrowego DNA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.4 Fluorescencja chlorofilu <i>a</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.5 Analiza głównych składowych .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Eksperyment II.....</b>	<b>30</b>
<b>Właściwości fizjologiczne <i>Arabidopsis arenosa</i> pod wpływem traktowania Zn lub Cd w warunkach kontrolowanych .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Cel .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Materiały i metody.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.1 Materiał roślinny, metody uprawy i pomiar wzrostu roślin .....</b>	<b>30</b>

3.2.2	<b>Pomiary zawartości metali w liściach i korzeniach</b> .....	31
3.2.3	<b>Pomiary zawartości barwników i fluorescencji chlorofilu <i>a</i></b> .....	31
3.2.4	<b>Pomiary natężenia fotosyntezy i transpiracji</b> .....	32
3.2.5	<b>Analiza statystyczna</b> .....	32
3.3	<b>Wyniki</b> .....	33
3.3.1	<b>Wzrost roślin</b> .....	33
3.3.2	<b>Akumulacja pierwiastków</b> .....	34
3.3.3	<b>Zawartość barwników</b> .....	38
3.3.4	<b>Wymiana gazowa</b> .....	40
3.3.5	<b>Stan i wydajność fotosystemów</b> .....	42
4.	<b>Dyskusja</b> .....	48
4.1	<b>Wpływ Cd lub Zn na biomasę roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych</b> .....	48
4.2	<b>Akumulacja pierwiastków w pędach roślin z naturalnych stanowisk oraz roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych</b> .....	49
4.3	<b>Zróznicowana zawartość jądrowego DNA pomiędzy populacjami <i>Arabidopsis arenosa</i> z Europy Środkowej</b> .....	51
4.4	<b>Wpływ warunków środowiskowych lub traktowania metalami na zawartość barwników w roślinach badanych <i>in situ</i> oraz uprawianych w warunkach kontrolowanych</b> .....	52
4.5	<b>Wpływ metali toksycznych w środowisku oraz w warunkach kontrolowanych na wydajność aparatu fotosyntetycznego</b> .....	54
5.	<b>Podsumowanie i wnioski</b> .....	57
6.	<b>Streszczenie</b> .....	59
7.	<b>Summary</b> .....	61
8.	<b>Bibliografia</b> .....	63

## Wykaz skrótów

- $F_0$  – początkowa ( $t = 0$ ) wartość fluorescencji chlorofilu, gdy wszystkie centra reakcji są otwarte;
- $F_m$  – maksymalna wartość fluorescencji chlorofilu, gdy wszystkie centra reakcji są zamknięte;
- FNR – oksydoreduktaza ferredoksyno-NADP<sup>+</sup> (ang. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reductase);
- $F_v$  – zmienna fluorescencja chlorofilu;
- M – populacje z terenów metalonośnych;
- NM – populacje z terenów niemetalonośnych;
- NMP – populacje z terenów niemetalonośnych, ale znajdujące się na terenie zanieczyszczonym;
- OEC – kompleks uwalniający tlen (ang. Oxygen Evolving Complex);
- OJIP – test oparty na pomiarze sygnału fluorescencji chlorofilu a w czasie 1 sekundy, wyróżniający charakterystyczne punkty/przedziały czasowe, w tym O, J, I oraz P;
- PCA – analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis);
- PSI – fotosystem I;
- PSII – fotosystem II;
- $Q_A$  – pierwszy nośnik chinonowy związany z PSII;
- $\Delta V_t$  – względna, zmienna fluorescencja chlorofilu;
- $\delta R_o$  – prawdopodobieństwo redukcji przez elektron końcowych akceptorów PSI;
- $\psi_o$  – prawdopodobieństwo transportu elektronów z  $Q_A^-$  na plastochinon;
- $\phi D_o$  – kwantowa wydajność rozpraszania energii ( $t = 0$ );
- $\phi E_o$  – kwantowa wydajność transportu elektronów z  $Q_A^-$  na plastochinon;
- $\phi P_o$  – maksymalna wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych (przy  $t = 0$ ), świadcząca o prawdopodobieństwie wychwytywania energii zaabsorbowanych fotonów (czyli ekscytonów migrujących po antenie) przez centra reakcji PSII;
- $\phi R_o$  – kwantowa wydajność redukcji końcowych akceptorów PSI przez elektron;

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o dwie opublikowane prace oraz wyniki nie publikowane. Prace opublikowane to:

**Gieroń, Ż.**, Sitko, K., Małkowski, E. 2021a. The Different Faces of *Arabidopsis arenosa*—A Plant Species for a Special Purpose. *Plants* 10, 1342. (IF<sub>2021</sub>=4,658; pkt=70)

<https://doi.org/10.3390/plants10071342>

**Gieroń, Ż.**, Sitko, K., Zieleźnik-Rusinowska, P., Szopiński, M., Rojek-Jelonek, M., Rostański, A., Rudnicka, M., Małkowski, E., 2021b. Ecophysiology of *Arabidopsis arenosa*, a new hyperaccumulator of Cd and Zn. *J. Hazard. Mater.* 412, 125052. (IF<sub>2021</sub>=14,224; pkt=200)

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125052>

Pierwsza publikacja, przeglądowa, stanowi podstawę rozdziału Wstęp, natomiast druga publikacja, badawcza, stanowi podstawę rozdziału Eksperyment I.

# 1. Wstęp

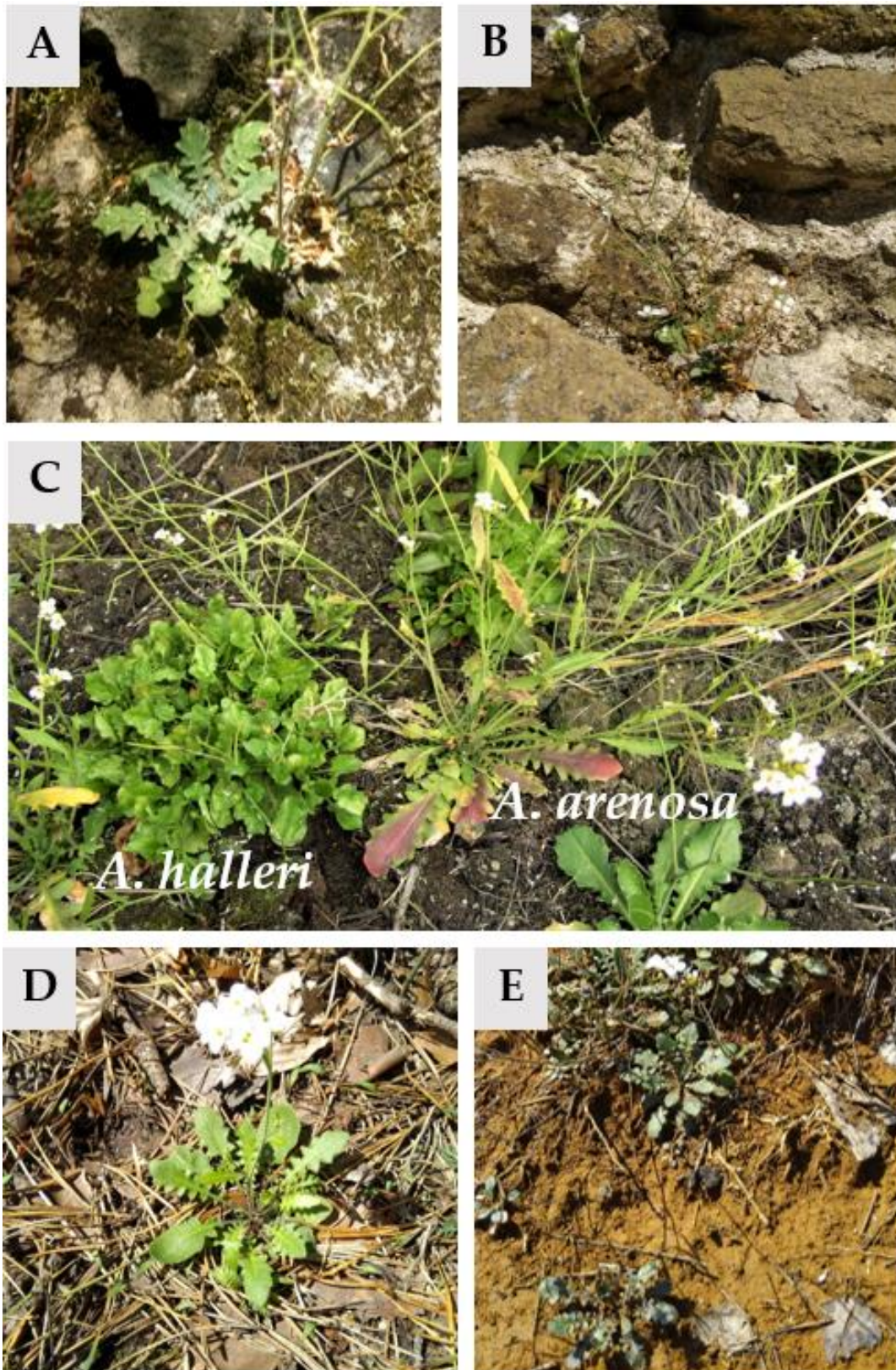
## 1.1 *Arabidopsis arenosa* – ogólne informacje

*Arabidopsis arenosa*, wcześniej gatunek znany jako *Cardaminopsis arenosa*, to gatunek roślin kwitnących z rodziny *Brassicaceae*, który obejmuje dwa podgatunki: *A. arenosa* ssp. *arenosa* i *A. arenosa* ssp. *borbasii* (Al-Shehbaz and O’Kane, 2002; Clauss and Koch, 2006; Gieroń et al., 2021a). *A. arenosa* jest modelowym gatunkiem rośliny wykorzystywanym do badania naturalnego zjawiska autoploidyzacji, czyli duplikacji całego genomu w obrębie jednego gatunku, w przeciwieństwie do allopoliploidów, które są wynikiem duplikacji genomu w wyniku hybrydyzacji międzygatunkowej. *A. arenosa* jest bliżej spokrewniona ze swoimi diploidalnymi taksonami siostrzanymi *A. lyrata* i *A. halleri* (hyperakumulator metali), niż z *A. thaliana*. Chociaż *A. arenosa* i *A. halleri* są blisko spokrewnione, badania porównujące oba gatunki są nadal nieliczne (Al-Shehbaz and O’Kane, 2002; Ramsey and Schemske, 2002; Preite et al., 2019; Szopiński et al., 2019; Gieroń et al., 2021a). Cechą wyróżniającą ten gatunek jest jego naturalne występowanie zarówno w formie diploidalnej ( $2n = 2C = 16$ ), jak i tetraploidalnej ( $2n = 4C = 32$ ), w przeciwieństwie do *A. halleri*, u którego stwierdzono jedynie formy diploidalne ( $2n = 2C = 16$ ) (Peer et al., 2006; Bento et al., 2015; Hollister, 2015; Kolář et al., 2016; Gieroń et al., 2021a).

*Arabidopsis arenosa* rośnie na terenach piaszczystych, suchych łąkach i poboczach dróg, a więc w środowiskach charakteryzujących się nieurodzajnymi glebami. Rośliny tego gatunku występują na wielu stanowiskach w Europie, jednak ich rozmieszczenie różni się w zależności od poziomu ploidalności. Formy tetraploidalne odnotowano w Słowenii, Francji i Belgii, na zachód i północ od Karpat, natomiast formy diploidalne występują w Europie Południowo-Wschodniej, na Półwyspie Bałkańskim i w północnych Węgrzech. Ponadto łuk Karpat, w szczególności Karpat Zachodnich, jest jedną z dwóch stref kontaktowych, w których współistnieją zarówno populacje diploidalne, jak i tetraploidalne. Druga strefa kontaktu obu cytotypów znajduje się na terenie Słowenii (Banášová et al., 2012; Schmickl et al., 2012; Yant et al., 2013; Kolář et al., 2016; Gieroń et al., 2021a). *A. arenosa* podobnie jak np. *A. halleri*, jest pseudometalofitem (Wierzbicka and Rostański, 2002; Bothe and Słomka, 2017; Wójcik et al., 2017; Gieroń et al., 2021a), który jest gatunkiem wykorzystywanym do badań nad adaptacją do środowisk silnie zanieczyszczonych toksycznymi metalami śladowymi (Przedpełska i Wierzbicka, 2007; Sitko et al., 2017; Preite et al., 2019; Szopiński et al., 2019; Gieroń et al.,

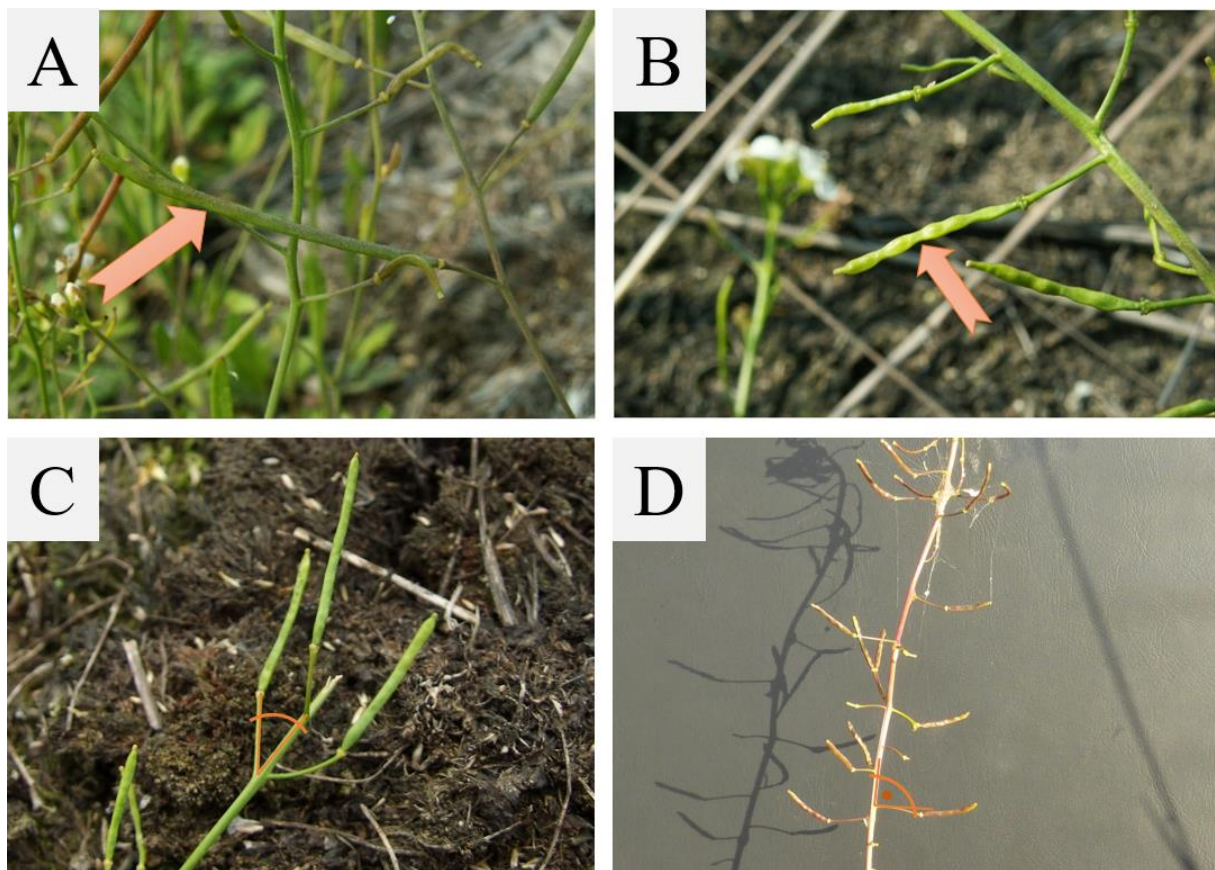
2021a). Oba gatunki można powszechnie spotkać na stanowiskach metalonośnych i niemetalonośnych (Fiałkiewicz i Rostański, 2006; Przedpelska i Wierzbicka, 2007; Szarek-Łukaszewska i Grodzinska, 2007; Szarek-Łukaszewska i Grodzińska, 2011; Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Zdjęcia form diploidalnych i tetraploidalnych *A. arenosa* przedstawiono na rys. 1.





Rys. 1. Zdjęcia *Arabidopsis arenosa* *in situ*. A - diploid (2C) z Csesznek, Węgry; B - diploid (2C) z Szigliget, Węgry; C - porównanie *A. arenosa* (4C) i *A. halleri* (2C) w Piekarach Śl. w Polsce; D - tetraploid (4C) z Kluczy, Polska; E - tetraploid (4C) z Dołków, Polska. (wg Gierón i in., 2021, zmienione)

*Arabidopsis arenosa* jest dwuletnią lub krótko żyjącą byliną, która nie tworzy rozłogów. Liście ułożone są w rozetę przy podłożu. Kształt blaszki liściowej jest obły, pierzasty do lirowatego, z trzema do jedenastu bocznymi klapami po każdej stronie. Łodygi tego gatunku roślin są wzniesione, proste lub z kilkoma lub więcej rozgałęzieniami od podstawy. *A. arenosa* wytwarza drobne kwiaty, których płatki są białe do lawendowych, obustronnie jajowate, obłe lub ścięte na wierzchołku (Al-Shehbaz i O’Kane, 2002; Gieroń et al., 2021a). Łuszczyzny *A. arenosa* są zawsze gładkie i wzniesione do góry, w przeciwieństwie do *A. halleri*, u której występują przewężenia pomiędzy nasionami (rys. 2). Ponadto łuszczyzny *A. arenosa* są ustawione pod ostrym kątem do szypułki, podczas gdy u *A. halleri* łuszczyzny są prawie prostopadłe do szypułki (rys. 2). Okres kwitnienia i wytwarzania owoców trwa od kwietnia do lipca, lub rzadziej do sierpnia.



Rys. 2. Zdjęcia łuszczyzn *A. arenosa* (A, C) w porównaniu z łuszczyznami *A. halleri* (B, D). Na zdjęciu B strzałka wskazuje jedno z charakterystycznych przewężeń na łuszczyznach *A. halleri*, które nie występują u *A. arenosa* (strzałka na zdjęciu A). Zdjęcia C i D pokazują różnice w położeniu łuszczyzn w stosunku do szypułek u obu gatunków (patrz pomarańczowy łuk) (wg Gieroń i in., 2021, zmienione)

## 1.2 Adaptacja do autopoliploidalności

*Arabidopsis arenosa* występuje w przyrodzie jako populacje diploidalne i autotetraploidalne. Zdolność do powielania całego genomu autotetraploidalnych populacji *A. arenosa* jest ściśle związana z przystosowaniem tetraploidów do powielania bez występowania błędów w mejozie, a więc, co najważniejsze, unikania powstawania multiwalentów lub uniwalentów, które powodują sterility (Higgins et al., 2014; del Pozo i Ramirez-Parra, 2015; Lloyd i Bomblies, 2016; Gieroń et al., 2021a). Tetraploidalne osobniki *A. arenosa* wykazują w mejozie diploidalne parowanie chromosomów, gdzie biwalenty wybierane są losowo z czterech homologów (Hollister et al., 2012; Yant et al., 2013; Hollister, 2015; Gieroń et al., 2021a). Analiza porównawcza genomów populacji diploidalnych i autotetraploidalnych pozwoliła na wyodrębnienie grupy 44 genów o rozbieżnej selekcji pomiędzy poziomami ploidalności, odpowiedzialnych za zdolność *A. arenosa* do stabilnej mejozy, a w konsekwencji do tworzenia kolejnych pokoleń autotetraploidalnych populacji tego gatunku. Ten zestaw genów wpływa głównie na ścieżkę inicjacji crossing over, ale jest również zaangażowany w inne funkcje, takie jak kohezję lub segregację chromosomalną, strukturę chromatyny, naprawę DNA i regulację transkrypcji (Hollister et al., 2012; Yant et al., 2013; Higgins et al., 2014; Hollister, 2015; Gieroń et al., 2021a). W skład tego zestawu wchodzi geny *ASYNAPTIC 1* i *3* (*ASY1* i *ASY3*), które kodują kluczowe elementy osi chromosomowej w płytce równikowej i są wyraźnym dowodem ewolucji adaptacyjnej, polegającej na mutacji zmieniającej pojedynczy aminokwas (Yant et al., 2013; Hollister, 2015; Lloyd i Bomblies, 2016; Gieroń et al., 2021a). Inne geny w tej ważnej grupie to *SISTER CHROMATID COHESION2* (*SCC2*), odpowiedzialny za kodowanie kohezyny ładowanej do DNA przez adherynę podczas mejozy (Hollister, 2015; Sebastian i Prasad, 2015; Gieroń et al., 2021a), a także *STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 3, 5 i 6* (*SMC3*, *SMC5* i *SMC6*), geny związane z mejozą, które wykazują oznakę selektywnego wymiatania (ang. selective sweep) (Watanabe et al., 2009; Hollister et al., 2012; Yant et al., 2013; Gieroń et al., 2021a). Ponadto, geny meiotyczne wykazują najsilniejsze cechy odporności na introgresję w populacjach tetraploidalnych, czyli zwiększoną dywergencję między cytotypami, przy udziale ograniczonego zróżnicowania w tetraploidach, oraz monofiletyzm tetraploidów w strefach kontaktu obu cytotypów. Wynika to z konieczności wykluczenia wprowadzania diploidalnych alleli meiotycznych do tetraploidów, co skutkowałoby powstawaniem multiwalentów (Baduel et al., 2016; Monnahan et al., 2019; Gieroń et al., 2021a).

Wykazano również, że autopoliploidalność może zwiększać plastyczność genomu, umożliwiając roślinom adaptację do bardziej heterogenicznych warunków. W rezultacie, tetraploidalne populacje *A. arenosa* zasiedlają miejsca zanieczyszczone przez działalność człowieka, wykraczając poza naturalne tereny zajmowane przez diploidalnych przodków (Parisod et al., 2010; del Pozo i Ramirez-Parra, 2015; Monnahan et al., 2019; Gieroń et al., 2021a).

### 1.3 *Arabidopsis arenosa* a toksyczne metale śladowe

*Arabidopsis arenosa* jest gatunkiem uważanym za pseudometalofit, czyli roślinę, która zasiedla zarówno stanowiska metalonośne, jak i niemetalonośne (Przedpełska i Wierzbicka, 2007; Preite et al., 2019; Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Od wielu lat gatunek ten uważany jest jako ekskluder, czyli roślinę zdolną do przetrwania na glebach metalonośnych, utrzymującą fizjologiczną zawartość cynku (Zn) i niską kadmu (Cd) w jego tkankach nadziemnych w roślinach rosnących *in situ* (Peer et al., 2006; Pollard et al., 2014; Gieroń et al., 2021a). Niemniej jednak zaczęły pojawiać się pierwsze doniesienia o zdolności kilku populacji *A. arenosa* do hyperakumulacji Zn (Szopiński et al., 2019, 2020; Gieroń et al., 2021b, 2021a), zgodnie z ogólnie przyjętą definicją zaproponowaną przez Van der Ent et al. (2013). Terminem hyperakumulator określa się rośliny, które są w stanie pobrać i zakumulować z gleby określone stężenie toksycznych metali śladowych w pędach lub liściach. Należy również podkreślić, że w hyperakumulatorach metale śladowe powinny być łatwo transportowane z korzenia do pędu w celu ich akumulacji w organach nadziemnych bez wykazywania obserwowalnych objawów fitotoksyczności (Brooks et al., 1977; Rascio, 1977; Rascio i Navari-Izzo, 2011; van der Ent et al., 2013; Pollard et al., 2014; Bothe i Słomka, 2017; Gieroń et al., 2021a). Hyperakumulacja Zn została po raz pierwszy opisana dla *Noccaea caerulescens*, również z rodziny *Brassicaceae*, w 1865 roku (Krämer, 2010). Obecnie odnotowano około 721 gatunków roślin, które wykazują hyperakumulację metali śladowych. Liczba ta stanowi 0,2% wszystkich znanych gatunków roślin, a nowych gatunków hyperakumulacyjnych przybywa (Brooks, 1998; Baker, 2000; Krämer, 2010; Rascio i Navari-Izzo, 2011; van der Ent et al., 2013; Pollard et al., 2014; Reeves et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). Z tej grupy roślin hyperakumulujące Cd i Zn wykazano głównie w rodzinie *Brassicaceae* oraz u kilku gatunków z innych rodzin, na przykład

*Crassulaceae* (*Sedum alfredii*, *Sedum plumbizincicola*) (Macnair, 2003; Verbruggen et al., 2009; Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). We wcześniejszych badaniach Nadgórska-Socha i in. (Nadgórska-Socha et al., 2015) wykazali, że zawartość metali takich jak Cd, Zn, Pb, Fe i Mn jest znacznie wyższa u *A. arenosa* w porównaniu z *Plantago lanceolata* i *Plantago major* uprawianymi w glebach zanieczyszczonych metalem *in situ*. Ponadto u *A. arenosa* współczynnik translokacji (stosunek stężenia metalu w pędach do stężenia metalu w korzeniach) był powyżej 1 dla Cd i Zn, co sugerowało hyperakumulację obu metali (Nadgórska-Socha et al., 2015; Gieroń et al., 2021a). Ostatnie badania potwierdziły zdolność *A. arenosa* do hyperakumulacji Cd i Zn (Gieroń et al., 2021b, 2021a). W niniejszej rozprawie, u *A. arenosa* wykazano większą zdolność do hyperakumulacji Zn niż Cd, gdyż cecha ta dla Zn została udowodniona w pięciu z sześciu badanych populacji metalonośnych, podczas gdy hyperakumulację Cd stwierdzono tylko w trzech populacjach metalonośnych (Gieroń et al., 2021b). Ponadto wykazano przystosowanie kolejnych dwóch populacji *A. arenosa* z południowo-zachodniej Polski do wzrostu w glebie zanieczyszczonej metalami śladowymi. Nie podano jednak informacji, czy obie populacje są hyperakumulatorami Zn lub Cd (Preite et al., 2019; Gieroń et al., 2021a).

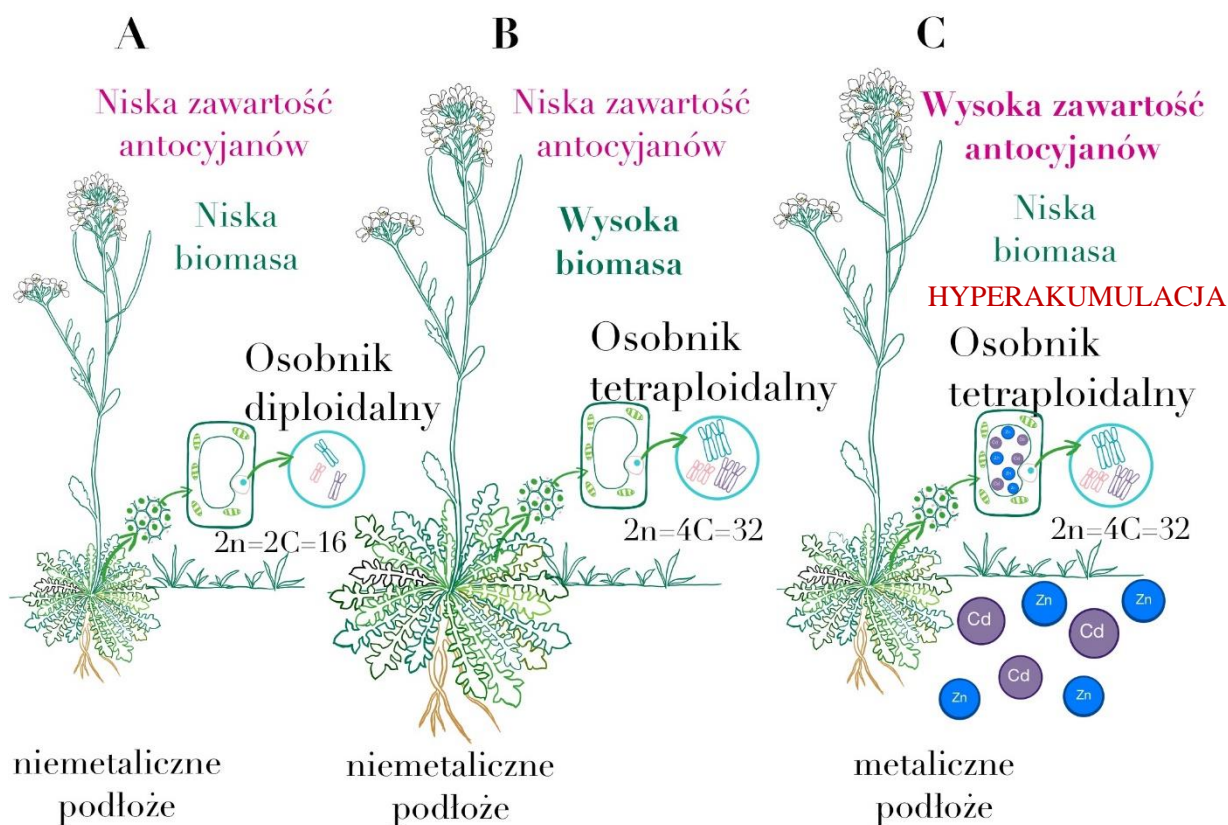
Populacje *A. arenosa* w różnych siedliskach wykazują specyficzne cechy morfologiczne. Na przykład, długość liści roślin rosnących na pogórnym zwale miedzi (Cu) była 2,5 razy mniejsza niż liści roślin rosnących w glebie nie zanieczyszczonej. Natomiast długość korzeni sadzonek ze zwału była wyraźnie większa w porównaniu z roślinami z terenu referencyjnego (Turisová et al., 2013; Wójcik et al., 2017; Gieroń et al., 2021a). Podobnie, populacja *A. arenosa* rosnąca na zwale Zn/Pb miała mniejsze rozmiary, grubsze i węższe liście, z mniejszą ilością trichomów. Ponadto test korzeniowy wykazał większą tolerancję na Cd, Zn i Pb dla populacji ze zwału w porównaniu z populacją referencyjną (Przedpeńska i Wierzbicka, 2007; Gieroń et al., 2021a). Z drugiej strony, zarówno metalonośne (M), jak i niemetalonośne (NM) tetraploidalne rośliny *A. arenosa* rosnące w roztworze hydroponicznym bez metali śladowych wykazywały wyższą biomasę nadziemną w porównaniu z roślinami *A. halleri* (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Jednakże w podłożu zawierającym Cd zaobserwowano bardziej znaczący spadek biomasy w populacji NM, niż w populacji M *A. arenosa* (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Biomasa korzeni również zmniejszyła się pod wpływem traktowania Cd o mniej niż 50% w populacji M i około 90% w populacji NM w porównaniu do kontroli (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Podobnie traktowanie Zn spowodowało ograniczenie wzrostu korzeni zarówno u *A. arenosa* jak i *A. halleri* (Szopiński

et al., 2019; Gieroń et al., 2021a). Obecność Zn może również zwiększać objętość i długość korzenia rośliny hyperakumulatora, co wykazano dla *S. alfredii* (Li et al., 2009; Gieroń et al., 2021a).

W odróżnieniu od akumulacji i translokacji metali, fotosynteza u roślin hyperakumulujących była rzadko badana. W związku z tym odporność aparatu fotosyntetycznego na toksyczne działanie metali śladowych u tej grupy roślin jest słabo poznana (Bayçu et al., 2018; Küpper et al., 2019; Morina i Küpper, 2020; Gieroń et al., 2021a), w porównaniu z dużą liczbą danych dotyczących roślin uprawnych (Pogrzeba et al., 2017; Bączek-Kwinta et al., 2019; Rusinowski et al., 2019b, 2019a; Małkowski et al., 2020; Bury et al., 2021; Gieroń et al., 2021a). Badania parametrów aparatu fotosyntetycznego *A. arenosa in situ* wykazały zdolności adaptacyjne i wysoki poziom tolerancji populacji M na metale śladowe. Niemniej jednak populacje NM miały lepsze parametry strumienia energii PSII w porównaniu z populacjami M. Bardzo zaskakującą obserwacją było wykazanie, że wartości parametrów badanych dla populacji ze skrajnie zanieczyszczonego obszaru były bliższe populacji NM, niż większości populacji M (Gieroń et al., 2021b, 2021a). W przypadku *A. arenosa* z silnie zanieczyszczonych terenów w Piekarach Śląskich (Polska) stwierdzono wyjątkowo wysoką odporność aparatu fotosyntetycznego na metale. Parametry fotosyntezy były podobne jak u roślin ze stanowisk referencyjnych. Może to wynikać ze znacznego zróżnicowania odporności aparatu fotosyntetycznego na metale śladowe pomiędzy populacjami z terenów metalonośnych, ponieważ tak wysoka odporność nie jest obserwowana u wszystkich populacji ze stanowisk metalonośnych (Gieroń et al., 2021b, 2021a). U *N. caerulea* Cd i Zn były akumulowane głównie w wakuolach komórek epidermy, w związku z czym metale te były nietoksyczne dla PSII. Ekspozycja na 800  $\mu\text{M}$  Zn lub 40  $\mu\text{M}$  Cd w eksperymencie hydroponicznym zwiększyła translokację  $\text{Ca}^{2+}$  do części nadziemnych i zwiększyła pobór  $\text{Fe}^{3+}$  jako mechanizm fotoprotekcyjny PSII (Bayçu et al., 2017; Gieroń et al., 2021a). Podobny mechanizm stwierdzono u *A. halleri*, ale metale śladowe były gromadzone w wakuolach parenchymy liści (Zhao et al., 2000; Gieroń et al., 2021a). Inną reakcję wykazali Morina i Küpper (Morina i Küpper, 2020) dla *A. halleri* traktowanej Cd, którzy stwierdzili, że Cd gromadzi się głównie w żyłkach liści i ogranicza dystrybucję Fe i Zn z żyłek. Nie stwierdzono natomiast wpływu na dystrybucję Ca. Zaburzenia homeostazy pokarmowej liści po traktowaniu Cd mogą być więc głównym czynnikiem postępującej inhibicji centrów reakcji PSII i spadku wydajności kwantowej transportu elektronów (Morina i Küpper, 2020; Gieroń et al., 2021a). Brak jest danych na temat mechanizmu sekwestracji metali śladowych w liściach

*A. arenosa*. Wykazano, że metalonośną populację *A. arenosa* charakteryzują podobne wartości fluorescencji chlorofilu *a* do metalonośnej populacji *A. halleri* (hyperakumulator Zn i Cd). Stwierdzono również istotnie wyższy wskaźnik zawartości chlorofilu w M i NM populacjach *A. arenosa* w porównaniu z populacjami *A. halleri*. Ponadto wyższa zawartość tego barwnika u *A. arenosa* w porównaniu do M populacji *A. halleri* może świadczyć o lepszym stanie fizjologicznym tej populacji *A. arenosa* (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a).

Polifenole takie jak flawonole i antocyjany, są powszechnie uznawane za związki chemiczne zaangażowane w ochronę przed stresem w roślinach i pełnią wielorakie funkcje w procesach aklimatyzacji do nadmiernej ilości toksycznych metali śladowych (Gieroń et al., 2021a; Muszyńska et al., 2021; Šamec et al., 2021). Wykazano u *A. thaliana*, że antocyjany odgrywają istotną rolę w ochronie przed stresem wywołanym działaniem metalami (Baek et al., 2012). Muszyńska et al. (2018) wykazali, że zwiększona akumulacja kwasów fenolowych zapewnia skuteczną neutralizację ROS indukowanych metalami w ekotypach *Alyssum montanum* z terenów metalonośnych. Ponadto, akumulacja flawonoli w liściach była reakcją charakterystyczną dla M ekotypów *A. montanum* podczas traktowania metalami (Muszyńska et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). Także wyższy poziom wskaźnika zawartości antocyjanów odnotowano w populacjach *A. arenosa* pochodzących ze stanowisk metalonośnych niż niemetalonośnych (rys. 3), co wskazuje na zwiększoną tolerancję populacji metalonośnych na toksyczne działanie metali śladowych (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021b, 2021a). Wartości tego parametru dla populacji M i NM *A. arenosa* były jednak niższe, niż dla populacji M *A. halleri* (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Stwierdzono również, że flawonole i antocyjany mają istotny udział w odpowiedzi na działanie metali śladowych u gatunków roślin hyperakumulujących i niehyperakumulujących, prowadząc do zwiększenia zdolności antyoksydacyjnych i chelatujących metali (Šamec et al., 2021; Gieroń et al., 2021a). Ogólne porównanie metalonośnych i niemetalonośnych populacji *A. arenosa* przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Kilka cech różniących populacje *A. arenosa*. (A) Diploidalne populacje ze stanowisk niemetalonośnych charakteryzują się niską zawartością antocyjanów i niską biomasą. (B) Tetraploidalne populacje ze stanowisk niemetalonośnych charakteryzują się niską zawartością antocyjanów i wysoką biomasą. (C) Populacje tetraploidalne z terenów metalonośnych charakteryzują się wysoką zawartością antocyjanów i niską biomasą; dodatkowo mają zdolność do hyperakumulacji metali śladowych (wg Gieroń i in., 2021, zmienione).

Pomimo rosnącego zainteresowania naukowego *A. arenosa*, mechanizm radzenia sobie tego gatunku z toksycznymi metalami śladowymi w naturalnych siedliskach jest nadal nieznan. Mimo że *A. arenosa* często występuje na tych samych stanowiskach co *A. halleri*, badania porównawcze obu gatunków wykazały odmienne strategie akumulacji metali. U *A. arenosa* tylko populacje metalonośne wykazywały hyperakumulację Zn i Cd, podczas gdy cecha ta była obserwowana zarówno u M, jak i NM populacji *A. halleri* (Sitko et al., 2017; Stein et al., 2017; Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021b, 2021a). Badania molekularne wskazały, że hyperakumulacja metali śladowych wiąże się ze zmianą poziomu ekspresji licznych genów (tab. 1). Pierwszym etapem jest pobieranie i transport metalu przez korzenie. Podstawową rolę w tym procesie odgrywiają przedstawiciele rodziny ZIP (zinc-regulated



transporter/iron-regulated transporter-like proteins), których ekspresja jest wysoka w korzeniach i/lub pędach hyperakumulatorów (Verbruggen et al., 2009; Balafrej et al., 2020; Merlot et al., 2021; Gieroń et al., 2021a).

Tabela 1. Geny, którym przypisano rolę w mechanizmach hyperakumulacji i hipertolerancji toksycznych metali śladowych u *Arabidopsis halleri* (Ah), *Noccaea caerulescens* (Nc) i *Arabidopsis arenosa* (Aa) (wg Gieroń i in., 2021, zmienione).

Gen	Adnotacja	Funkcja	Gatunek
<i>ZIP4</i>	ZIP rodzina, Zn transporter	Wychwytywanie metali w komórkach	Ah, Nc, Aa?
<i>ZIP5</i>	ZIP rodzina, Zn transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>ZIP6</i>	ZIP rodzina, Zn transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>ZIP9</i>	ZIP rodzina, Zn transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>ZIP19</i>	ZIP rodzina, Zn transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>ZIP23</i>	ZIP rodzina, Zn transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>IRT1</i>	ZIP rodzina, Fe <sup>2+</sup> białko transportowe		Ah, Nc, Aa?
<i>IRT3</i>	ZIP rodzina, Zn <sup>2+</sup> /Fe <sup>2+</sup> białko transportowe	Ah, Nc, Aa?	
<i>ZNT1</i>	Zn transporter w <i>Noccaea caerulescens</i>	Napływ metali do komórek odpowiedzialnych za załadunek ksylemu	Nc
<i>ZNT2</i>	Zn transporter w <i>Noccaea caerulescens</i>		Nc
<i>ZTN5</i>	Zn transporter w <i>Noccaea caerulescens</i>		Nc
<i>HMA3</i>	pompa ATPazowa metali w błonie plazmatycznej	Wakuolarna sekwestracja metali	Ah, Nc, Aa?
<i>HMA4</i>	pompa ATPazowa metali w błonie plazmatycznej	Załadunek metali do ksylemu	Ah, Nc, Aa?
<i>MTP1</i>	Metal tolerance protein	Wakuolarna sekwestracja metali	Ah, Nc, Aa?
<i>YSL3</i>	Fe-NA transporter	Załadunek i rozładunek ksylemu; transport dalekodystansowy	Ah, Nc, Aa?
<i>YSL5</i>	Metal-NA transporter		Nc, Aa?
<i>YSL6</i>	Metal-NA transporter		Ah, Nc, Aa?
<i>FRD3</i>	Transporter cytrynianu		Ah, Nc, Aa?
<i>NRAMP1</i>	Wakuolarny transporter metali	Sekwestracja Zn w wakuoli komórek liści	Nc, Aa?
<i>NRAMP3</i>	Wakuolarny transporter metali		Ah, Nc, Aa?
<i>NRAMP4</i>	Wakuolarny transporter metali		Nc, Aa?
<i>NRAMP5</i>	Wakuolarny transporter metali		Nc, Aa?

Transportery ZIP19 i ZIP23 są głównie odpowiedzialne za pobieranie cynku przez korzenie *A. halleri* i *N. caerulescens* (Balafrej et al., 2020). U gatunków nie będących hyperakumulatorami ekspresja kilku genów ZIP jest niska i wzrasta podczas niedoboru Zn (Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a; Merlot et al., 2021). Ponadto stwierdzono, że traktowanie Cd indukuje wyższą ekspresję genów związanych z pobieraniem i transportem Cd w korzeniach (*IRT1*,

*ZIF1*) i pędach (*ZIF1* i *YSL3*), a także z sekwestracją wakuolarną Cd (*HMA3*) (Corso et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). IRT1 (iron-regulated transporter 1) kodujący mało selektywny transporter Fe w epidermie korzenia jest również zaangażowany w pobieranie Zn, Cd i/lub niklu (Ni) (Gieroń et al., 2021a; Merlot et al., 2021). Dlatego wykazano, że różny poziom ekspresji tych genów u *A. halleri* wiąże się ze zróżnicowaną akumulacją tych metali w pędach (Corso et al., 2018; Schwartzman et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). Następnie Zn dostaje się do kory pierwotnej korzenia z udziałem ZIP4 i/lub IRT1, a następnie do endodermy poprzez IRT3 i transportery ZIP5, ZIP19, ZIP23 (Mortel et al., 2006; Verbruggen et al., 2009; Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Ze względu na obecność pasemek Caspariego dalszy transport Zn możliwy jest jedynie poprzez transportery ZIP4/ZNT1. Zwiększoną ekspresję genów kodujących te transportery wykazano w korzeniach zarówno *A. halleri* jak i *N. caerulea* (Talke et al., 2006; Balafrej et al., 2020; Merlot et al., 2021; Gieroń et al., 2021a). Kolejnym etapem jest załadunek metali do ksylemu, w którym pośredniczy transporter metali śladowych, białko HMA4, ATPaza zlokalizowana w plazmolemie (Krämer, 2010; Meyer i Verbruggen, 2012; Gieroń et al., 2021a). U *A. halleri*, *HMA4* występuje w trzech kopiach i wykazuje wyższą ekspresję (cztero- do dziesięciokrotnie) w porównaniu z *HMA4* u *A. thaliana*. U *A. halleri* ta wyższa ekspresja *HMA4* jest kluczowa dla procesu hyperakumulacji i hypertolerancji (Talke et al., 2006; Hanikenne et al., 2008; Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a; Merlot et al., 2021). Wszystkie trzy kopie *HMA4* zlokalizowane są w plazmolemie komórek miękiszowych walca osiowego i umożliwiają ładowanie metali do ksylemu i ich dystrybucję do liści. Pompa ta zapewnia również wykluczenie metalu z wrażliwych tkanek, takich jak wierzchołek korzenia (Hanikenne et al., 2008; Gieroń et al., 2021a; Merlot et al., 2021). Zwiększoną ekspresję *HMA4* wykazano nie tylko u *A. halleri*, ale także u innych hyperakumulatorów, w tym *N. caerulea*, *S. alfredii* i *S. plumbizincola* (Craciun et al., 2012; Z. Zhang et al., 2016; Peng et al., 2017; Gieroń et al., 2021a). W procesie ładowania ksylemu biorą udział również inne transportery, takie jak YSL (yellow stripe-like protein), które odpowiadają głównie za transport Zn, Cu, manganu (Mn), Ni, Cd i Fe. Ponadto, białka YSL wraz z białkiem FRD3 (ferric reductase defective 3) biorą udział w długodystansowym transporcie metali w ksylemie. Jednakże transporter FRD3 jest odpowiedzialny jedynie za translokację Fe/Zn w ksylemie (Curie et al., 2009; Hassan i Aarts, 2011; Balafrej et al., 2020; Huang et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Po dotarciu metali do organów nadziemnych rośliny dostają się one do komórek liści dzięki transporterom ZIP4 i ZIP6 (Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Oba białka były zlokalizowane w plazmolemie pędów *A. halleri* oraz pędów i korzeni *S. alfredii* (Becher et al., 2004; Gupta et al., 2016; Balafrej et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). W liściach metale śladowe

są sekwestrowane i detoksyfikowane w wakuolach, gdzie ich toksyczne działanie jest ograniczone. Do wakuoli transportowane są przez białka MTP1 (metal tolerance protein 1). U hyperakumulatora *A. halleri* stwierdzono obecność pięciu kopii genu *MTP1*, który ulega silnej ekspresji zarówno w pędach jak i korzeniach (Talke et al., 2006; Shahzad et al., 2010; Fasani et al., 2017; Gieroń et al., 2021a; Merlot et al., 2021). Wysoką ekspresję tego genu wykryto również u innych hyperakumulatorów, takich jak *N. caerulea* i *S. alfredii* (Milner i Kochian, 2008; Zhang et al., 2011; Gieroń et al., 2021a). Innym ważnym transporterem odpowiedzialnym za wnikanie metali do wakuoli jest HMA3. U *A. halleri* wyższy poziom ekspresji *HMA3* wykryto w mezofilu, natomiast u *N. caerulea* wyższa ekspresja występowała w pochwie wiązkowej (Mishra et al., 2017; Balafrej et al., 2020; Huang et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). Transportery z rodziny HMA wykazują również funkcję detoksykacyjną u innych hyperakumulatorów, takich jak *S. alfredii* i *S. plumbizincola* (Zhang et al., 2016; Liu et al., 2017; Zhao et al., 2019; Balafrej et al., 2020). Inną rodziną genów zaangażowanych w sekwestrację wakuoli jest rodzina genów NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein). Wysoka ekspresja *NRAMP1*, *NRAMP3*, *NRAMP4* i *NRAMP5* została wykryta u *A. halleri* i *N. caerulea* (Weber et al., 2004; Lanquar et al., 2005; Krämer et al., 2007; Assunção et al., 2010; Halimaa et al., 2014; Nadgórska-Socha et al., 2015; Gupta et al., 2016; Balafrej et al., 2020; Huang et al., 2020; Gieroń et al., 2021a). U *A. halleri* wyższa ekspresja transportera CAX1 (cation-exchanger 1) również wydaje się być odpowiedzialna za hypertolerancję Cd (Baliardini et al., 2015; Ahmadi et al., 2018; Gieroń et al., 2021a).

Tabela 1 pokazuje, że u *A. halleri* i *N. caerulea* zidentyfikowano funkcję dużej liczby genów odpowiedzialnych za pobieranie metali, załadunek ksylemu, transport na duże odległości lub sekwestrację w wakuoli. Natomiast u *A. arenosa* poziom ekspresji genów związanych z pobieraniem metali lub hypertolerancją jest wciąż nieznan (tab. 1). Te luki w wiedzy powinny zostać uzupełnione, zwłaszcza że ostatnio znaleziono kilka populacji *A. arenosa* hyperakumulujących Zn i Cd (Gieroń et al., 2021b, 2021a). Pierwszą pracę, w której porównano tolerancję na metale ciężkie u *A. arenosa* i *A. halleri* na poziomie genomowym, opublikowali Preite et al. (2019). Badali oni u obu gatunków populacje zasiedlające te same stanowiska M i NM. Pomimo stosunkowo bliskiego pokrewieństwa pomiędzy *A. arenosa* i *A. halleri*, wykazano umiarkowany stopień zbieżności w funkcjonowaniu genów. Porównanie metalonośnych i niemetalonośnych populacji *A. arenosa* pozwoliło na zidentyfikowanie pięciu genów kandydujących, wykazujących zbieżność między oboma typami populacji. Te geny to: PHT5;1 (vacuolar Pi sequestration), AT1G71210 (pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily

protein), AXY8 (altered xyloglucan 8; 1,2-a-L-fucosidase), NRPC2 (nuclear RNA polymerase C2) i AT4G19050 (NB-ARC domain-containing disease resistance protein). Co zaskakujące, żaden z tych genów nie jest odpowiedzialny za pobór lub tolerancję metali. Widać więc, że dalsze badania powinny być prowadzone nad genami wykazującymi oznaki selektywnego wymiatania, jak również związanymi z pobieraniem i tolerancją metali (tab. 1).

#### **1.4 Tolerancja metali śladowych i interakcja z mikroorganizmami glebowym**

Grzyby współdziałające z wieloma gatunkami roślin mają korzystny wpływ w adaptacji roślin do różnego rodzaju stresów środowiskowych, co zostało wielokrotnie opisane (Li et al., 2011; Brotman et al., 2013; Rozpądek et al., 2014; Hiruma et al., 2016; Rozpądek et al., 2018). *Arabidopsis arenosa* we wcześniejszych badaniach została uznana za gatunek niemykoryzowy. Podobnie wiele innych gatunków z rodziny *Brassicaceae* nie wykazywało zdolności do symbiozy z grzybami mikoryzowymi (Pawłowska et al., 1997; Rozpądek et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). Niemniej jednak stwierdzono, że zarówno *A. arenosa* jak i *A. halleri* rosnące na glebie serpentynitowej okazjonalnie wykazywały penetrację arbuskularnych grzybów mikoryzowych do kory pierwotnej korzenia, ale pęcherzyki i arbuskule nie były tworzone (Regvar et al., 2003; Gieroń et al., 2021a).

Przeprowadzono także badania nad oddziaływaniem grzybów endofitycznych (*Mucor* sp.) wyizolowanych z *A. arenosa* z terenów nieużytków górniczych. Badania na roślinach traktowanych metalami wykazały kilka ważnych, korzystnych aspektów obecności grzyba, takich jak poprawa zawartości wody i fosforu. Grzyb zwiększył również prawie dwukrotnie świeżą masę w porównaniu z kontrolą. Rośliny inokulowane *Mucor* sp. i rosnące na podłożu ze zwału kopalnianego miały trzykrotnie większą zawartość N w pędach, niż rośliny nieinokulowane (Rozpądek et al., 2018; Domka et al., 2019; Gieroń et al., 2021a). Dodatkowo interakcja z grzybem prowadziła do nadekspresji wielu genów odpowiedzialnych za metabolizm etylenu, co skutkowało znacznym wydłużeniem włóśników korzeniowych. Ponadto w inokulowanych roślinach stwierdzono poprawę transportu Zn, Cd i Fe z korzenia do pędu. Wskazuje to, że interakcja z grzybem ma korzystny wpływ na zarządzanie i dystrybucję toksycznych metali w tkankach roślinnych w celu zminimalizowania szkodliwego działania w

korzeniach i detoksykacji w pędach (Rozpądek et al., 2018; Gieroń et al., 2021a). Przeprowadzono także pomiary różnorodności genetyczno-biochemicznej w glebie ryzosfery *A. arenosa* i *A. halleri* za pomocą elektroforezy w gradientowym żelu denaturującym (PCR-DGGE). Stwierdzono, że wskaźniki bioróżnorodności w glebie zanieczyszczonej metalami różniły się między gatunkami i były niższe w ryzosferze *A. halleri* (Borymski et al., 2018; Gieroń et al., 2021a).

## 2. Eksperyment I

### Ekofizjologia *Arabidopsis arenosa*, nowego hyperakumulatora Cd i Zn

#### 2.1 Cel

Celem badań było scharakteryzowanie ekofizjologii *Arabidopsis arenosa* rosnącej w naturalnym środowisku. W tym celu przeprowadzono pomiary fluorescencji chlorofilu *a* i zawartości barwników *in situ* dla 14 populacji z różnych stanowisk w Europie Środkowej. Dodatkowo pobrano próby glebowe oraz roślinne. W pobranych próbach glebowych oznaczono całkowitą zawartość metali oraz zawartość biodostępnych form metali (ekstrakcja CaCl<sub>2</sub>). Z kolei w materiale roślinnym zbadano poziom ploidalności, jak również zawartość wybranych metali w pędach i korzeniach. Wykazano po raz pierwszy, według naszej wiedzy, zależności pomiędzy parametrami fizjologicznymi, poziomem ploidalności, czynnikami środowiskowymi i typem edaficznym wybranych populacji *Arabidopsis arenosa* w ich naturalnym środowisku, siedmiu z terenów metalonośnych i siedmiu z terenów niemetalonośnych.

#### 2.2 Materiały i metody

##### 2.2.1 Opis stanowisk badawczych

Badania prowadzono na *Arabidopsis arenosa* z różnych stanowisk w Europie Środkowej. Stanowiska te zostały wybrane ze względu na różne warunki środowiskowe (Tab. 1, Gieroń et al., 2021) w celu określenia zmienności wewnątrzgatunkowej cech fizjologicznych tego gatunku. Ponadto stanowiska zostały wybrane na podstawie dostępnej literatury zarówno dla *A. arenosa*, jak i dla *A. halleri*, z którym *A. arenosa* często rośnie na terenach metalonośnych. Badania terenowe, jak również zbiór materiału roślinnego zostały przeprowadzone w maju 2018 roku. Przy wyborze populacji *A. arenosa* wzięto pod uwagę następujące parametry: różne wysokości nad poziomem morza oraz stopień zanieczyszczenia gleby Cd, Pb i Zn. Zgodnie z tym populacje podzielono na 3 grupy: populacje z terenów niemetalonośnych (NM), z terenów niemetalonośnych, ale znajdujące się na terenie zanieczyszczonym (NMP) oraz populacje z terenów metalonośnych (M). Podział ten oparty był

na całkowitej zawartości Cd, Zn i Pb w glebie (Bert et al., 2002; Kabata-Pendias, 2011). Dodatkowym parametrem był poziom ploidalności wskazany przez Yant et al. (2013).

Populacje z terenów niemetalonośnych (NM) znajdują się na Węgrzech i Słowacji i zostały wybrane na podstawie pracy Schmickl et al. (2012). Słowackie populacje: Velky Lipnik (VL-NM), Vernar (V-NM), Tematin (Te-NM) pochodzą z obszarów górskich. Natomiast populacje węgierskie obejmują Tatabanya (Ta-NM), Csesznek (C-NM), Szigliget (S-NM) i Sümeg (Su-NM).

Wszystkie siedem analizowanych stanowisk w Polsce, znajduje się na południu kraju. Dwa stanowiska, Klucze (K-NMP) i Bukowno (B-M), położone są w województwie małopolskim, z czego K-NMP było jedynym niemetalonośnym, ale położonym na terenie zanieczyszczonym metalami (NMP) (Meyer et al., 2010). Pozostałe badane populacje z Polski zlokalizowane są na terenach metalonośnych: Bukowno (B-M), Szopienice (Sz-M), Dołki (D-M), Wełnowiec (W-M), Miasteczko Śląskie (MS-M) i Piekary Śląskie (PS-M).

### **2.2.2 Fluorescencja chlorofilu *a* i pomiar zawartości barwników**

Pomiary przeprowadzono na 15 wybranych osobnikach *A. arenosa* z każdej populacji. Indeks zawartości chlorofilu, antocyjanów i flawonoli mierzono za pomocą czujnika Dualex (Dualex Scientific+, Force-A, Francja). Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* wykonano na tych samych roślinach przy użyciu analizatora wydajności roślin (fluorymetr PocketPEA; Hansatech Instruments Ltd., Anglia). Pomiary wykonano według (Sitko et al., 2017).

Wzrost fluorescencji chlorofilu przejawia się w kilku fazach, które zostały szczegółowo opisane we wcześniejszych pracach (Kalaji et al., 2014; Paunov et al., 2018; Sitko et al., 2019). Pierwsza z nich, O-J odpowiada wygaszaniu fluorescencji chlorofilu, co charakteryzuje aktywność kompleksu wydzielającego tlen (OEC) po stronie donorowej PSII. Druga faza nazwana J-I wskazuje na postępującą redukcję pierwotnego akceptora elektronów  $Q_A$ . Ostatnia faza I-P związana jest z postępującą redukcją końcowego fragmentu łańcucha transportu elektronów (Schansker et al., 2006; Kalaji i Łoboda, 2009). Ponadto, zmiany w kinetyce wzrostu fluorescencji OJIP określono obliczając różnice w krzywych fluorescencji zmiennej  $\Delta V_t$  (rys. 1B, Gieroń et al., 2021), gdzie  $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$  (rys. 1B, Gieroń et al., 2021).

### 2.2.3 Pobór i analiza prób roślinnych i glebowych

W każdym miejscu pobrano 10 pojedynczych roślin z bryłką ziemi w celu ochrony systemów korzeniowych z 15 roślin, które zostały użyte do pomiarów zawartości barwników i fluorescencji. Dodatkowo z każdego stanowiska pobrano trzy próbki gleby, które zostały wymieszane i uśrednione do dalszych analiz. W laboratorium próbki gleby wysuszono na powietrzu i przesiano przez sito o średnicy 2 mm, a następnie wykorzystano do analiz fizykochemicznych. Całkowitą zawartość metali oznaczono po trawieniu kwasem gleby, która została zmielona do grubości mniejszej niż 0,25 mm. Stężenie biodostępnych form metali w próbkach gleby oznaczono poprzez ekstrakcję 3 g suchej gleby, którą następnie przesiano przez sito 2 mm z 30 ml 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  przez 2 godziny w temperaturze pokojowej (Sitko et al., 2017). Zawartość wybranych metali analizowano przy użyciu płomieniowej atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (iCE 3500 FAAS; Thermo Scientific, USA). Przygotowanie zebranego materiału do badania zawartości wybranych pierwiastków zostało wcześniej opisane przez (Sitko et al., 2017; Szopiński et al., 2020).

### 2.2.4 Cytometria przepływowa

Cytometrię przepływową zastosowano do analizy poziomu ploidalności w liściach *Arabidopsis arenosa* pochodzących z różnych stanowisk. W celu określenia zawartości DNA pobrano młode liście od 10 osobników dla każdej z wybranych populacji. Próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego CyFlow Space (Sysmex, Kobe, Japonia) jak w pracy Szopiński et al., 2020.



## 2.3 Wyniki

### 2.3.1 Akumulacja metali w pędach roślin

Wyniki przeprowadzonej analizy fizykochemicznej gleby pobranej z badanych stanowisk jasno różnicują stanowiska pod względem zawartości śladowych metali toksycznych. Najniższe całkowite zawartości Zn, Cd i Pb w glebie odnotowano dla wszystkich stanowisk NM, jak i K-MNP, gdzie całkowite zawartości metali nie różniły się statystycznie pomiędzy populacjami (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Natomiast najwyższą całkowitą zawartość Zn w glebie odnotowano dla D-M. W przypadku całkowitej zawartości Pb i Cd, najwyższe wartości stwierdzono na PS-M (MS-M najwyższa wartość tylko dla Cd) (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Analizie poddano również zawartość biodostępnych form metali w glebie, gdzie stwierdzono najwyższą zawartość Zn, Cd i Pb dla stanowiska PS-M. Drugim stanowiskiem z najwyższą wartością tego parametru było MS-M. Pozostałe metalonośne stanowiska również zawierały biodostępne formy metali, jednak istotnie mniej w porównaniu do PS-M (tab. 3, Gieroń et al., 2021).

Największą zawartość Cd, Pb i Zn w pędach oznaczono dla populacji MS-M i PS-M (tab. 2, Gieroń et al., 2021). Wiązało się to z najwyższym całkowitym stężeniem oraz bardzo wysoką zawartością biodostępnych form tych metali śladowych w glebie na obu stanowiskach (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Ponadto wszystkie 10 analizowanych roślin ze stanowisk PS-M i MS-M wykazywało pobieranie Cd i Zn na poziomie hyperakumulacji. Rośliny hyperakumulujące Cd i Zn obserwowano również na innych badanych stanowiskach metalonośnych. Hyperakumulację Zn stwierdzono jednak w 5 z 6 populacji z terenów metalonośnych (B-M, Sz-M, D-M, MS-M i PS-M), natomiast hyperakumulację Cd zaobserwowano u roślin tylko z trzech populacji metalonośnych (W-M, MS-M i PS-M). Interesujące wyniki uzyskano dla akumulacji Cd i Zn w roślinach z Wełnowca. Na tym stanowisku zawartość Cd w pędach była bardzo zróżnicowana wśród poszczególnych roślin i wynosiła od 13 do 119  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Cd, natomiast w glebie od 13 do 208  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Cd. Ponadto na stanowisku Wełnowiec tylko u 2 z 10 pobranych roślin stwierdzono hyperakumulację Cd. Na tym stanowisku zaobserwowano również duże zróżnicowanie zawartości Zn, która w pędach wahała się od 432 do 2401  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , natomiast w glebie od 5306 do 30537  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Stosunkowo wysoką zawartość Pb wynoszącą od 47 do 612  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  odnotowano również w pędach roślin z

populacji metalonośnych. Ponadto w populacji MS-M była jedna roślina wykazująca zawartość Pb w pędach typową dla hyperakumulatora tego metalu.

Populacje NM nie wykazywały hyperakumulacji Cd i Zn w porównaniu z populacjami M (tab. 2, Gieroń et al., 2021). Generalnie zawartość Ca w pędach była wyższa w populacjach NM w porównaniu z populacjami M. Największą zawartość tego pierwiastka ( $49300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) stwierdzono w populacji Klucze z obszaru niemetalonośnego, ale zanieczyszczonego (NMP). Natomiast w trzech populacjach metalonośnych (Sz-M, MS-M i PS-M) zawartość Ca w pędach nie przekraczała  $21000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Ponadto V-NM i VL-NM charakteryzowały się zwiększoną zawartością Mg w pędach, co było dodatnio skorelowane z całkowitą zawartością tych pierwiastków w glebie z terenów górskich (tab. 2 i 3, Gieroń et al., 2021). Ponadto odnotowano istotnie wyższą zawartość Fe w pędach populacji M (z wyjątkiem populacji MS-M i PS-M, w których obserwowano najniższą zawartość tego pierwiastka), w porównaniu do populacji NM, co było bezpośrednio związane z zawartością Fe w glebie (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku Mn, dla którego zawartość w glebie była dodatnio skorelowana z zawartością w pędach, z wyjątkiem populacji NMP z miejscowości Klucze. W próbach gleby z tego stanowiska stwierdzono najniższą zawartość Mn, natomiast w pędach roślin z Kluczy zawartość Mn była najwyższa w porównaniu z populacjami NM.

### 2.3.2 Zawartość barwników

W liściach *A. arenosa* zbadano zawartość trzech barwników: chlorofilu, antocyjanów i flawonoli. Z jednej strony najwyższą zawartość chlorofilu zaobserwowano dla populacji NM z Vernar (V-NM) (tab. 4, Gieroń et al., 2021). Stanowisko to charakteryzowało się największą wysokością (772 m n.p.m., tab. 1, Gieroń et al., 2021). Natomiast porównywalną wartość indeksu zawartości chlorofilu odnotowano dla roślin z populacji PS-M, która rośnie na jednym z najbardziej zanieczyszczonych metalami wśród sześciu badanych stanowisk (tab. 4, Gieroń et al., 2021). Z drugiej strony, najniższy wskaźnik zawartości chlorofilu stwierdzono również u roślin z metalonośnego stanowiska Bukowno (B-M) (tab. 4, Gieroń et al., 2021). Warto zwrócić uwagę, że wskaźnik zawartości chlorofilu dla roślin B-M stanowił 75% najwyższej zmierzonej wartości dla roślin V-NM. Można zatem przyjąć, że indeks zawartości chlorofilu w połowie sezonu wegetacyjnego jest miarą warunków siedliskowych, a nie markerem stresu.

Najwyższy indeks zawartości antocyjanów zmierzono dla populacji PS-M i MS-M, które zakumulowały najwięcej Cd, Zn i Pb (tab. 4, Gieroń et al., 2021). Populacje te charakteryzowały się ponad dziesięciokrotnie wyższą zawartością antocyjanów, niż najniższe zmierzone indeksy dla populacji Ta-NM i Sz-M. Średni indeks zawartości antocyjanów dla populacji NM wynosił  $0,027 \pm 0,005$  r.u., natomiast dla populacji M  $0,056 \pm 0,013$  r.u. Co ciekawe, najniższą zawartość zmierzono dla populacji z Szopienic (Sz-M), czyli jednej z populacji metalonośnych, która charakteryzowała się hyperakumulacją Zn (tab. 2 i 4, Gieroń et al., 2021). W populacji Su-NM stwierdzono istotnie wyższą zawartość antocyjanów spośród populacji NM, jednak była to tylko połowa zawartości obserwowanej dla PS-M (tab. 4, Gieroń et al., 2021).

Podobnie jak w przypadku antocyjanów, najwyższą zawartość flawonoli zmierzono dla populacji PS-M i MS-M (tab. 4, Gieroń et al., 2021). Wysoką zawartość stwierdzono również w populacjach górskich NM (V-NM i VL-NM) oraz w populacji D-M z terenu o dużej zawartości metali śladowych. Podobnie jak w przypadku antocyjanów, najniższy wskaźnik zawartości zaobserwowano dla roślin Sz-M i był on o połowę niższy od najwyższej zmierzonej wartości dla PS-M (tab. 4, Gieroń et al., 2021).

### **2.3.3 Zawartość jądrowego DNA**

Dane literaturowe oraz analizy z cytometru przepływowego wykazały różnice w zawartości jądrowego DNA pomiędzy badanymi populacjami. Populacje z Polski charakteryzowały się zazwyczaj obecnością jądrowego DNA 4C, z wyjątkiem populacji W-M, gdzie analizy cytometrem przepływowym wykazały duże zróżnicowanie zawartości DNA: 2C, 4C i 6C (tab. 4, Gieroń et al., 2021). W przypadku populacji ze Słowacji i Węgier względna zawartość DNA została przedstawiona przez Schmickl et al., 2012, z wyjątkiem populacji Ta-NM. Niezależnie od przedstawionych wyników, w ramach tej dysertacji została określona względna zawartość DNA w populacjach ze Słowacji i Węgier za pomocą cytometrii przepływowej. Populacje C-NM, S-NM, Su-NM oraz Ta-NM z Węgier oraz populacja V-NM ze Słowacji wykazały zawartość DNA 2C. Natomiast u pozostałych populacji ze Słowacji VL-NM i Te-NM zawartość DNA wynosiła 4C (tab. 4, Gieroń et al., 2021).

### 2.3.4 Fluorescencja chlorofilu *a*

Analiza fluorescencji chlorofilu pozwala na uzyskanie szczegółowych informacji o stanie aparatu fotosyntetycznego. Test OJIP oparty jest na pomiarach fluorescencji chlorofilu *a* (Strasser et al., 2004). Zmiany fluorescencji chlorofilu *a* przedstawiono jako typowy test OJIP na rysunku 1A (Gieroń et al., 2021). Warto zauważyć, że większość populacji NM wykazywała istotnie wyższą maksymalną fluorescencję w porównaniu do populacji M (rys. 1A, tab. 4, Gieroń et al., 2021). Ponadto obserwowano spłaszczenie krzywych fluorescencji do fazy I-P w populacjach M w porównaniu z większością populacji NM (rys. 1A, Gieroń et al., 2021). Analiza  $\Delta V_t$  wykazała, że rośliny M charakteryzowały się obecnością znaczących pików w fazie O-J ( $\Delta K$  i  $\Delta I$ ), co może być spowodowane uszkodzeniem OEC i/lub akumulacją  $Q_A$  w stanie zredukowanym ( $Q_A^-$ ) (rys. 1B, Gieroń et al., 2021). Najwyższy grzbiet pomiędzy  $\Delta K$  i  $\Delta J$  obserwowano dla populacji D-M. U roślin z Szopienic Sz (M) również stwierdzono porównywalny pik  $\Delta J$ , choć nie obserwowano innych pików, co może być spowodowane głównie zaburzeniami  $Q_A$  (rys. 1B, Gieroń et al., 2021). Populacja MS miała najwyższą wartość  $\Delta I$ , co może być związane z pewnym uszkodzeniem puli plastochinonowej. Wśród populacji NM zaobserwowano znaczne uszkodzenia w końcowej części łańcucha transportu elektronów ( $\Delta I$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta G$ ), co może wskazywać na zaburzenia akceptorów elektronów PSI, w tym aktywności FNR, natomiast stan PSII wydaje się być porównywalny z populacją referencyjną (rys. 1B, Gieroń et al., 2021).

Najwyższe wartości  $\phi P_0$  zaobserwowano dla populacji niemetalonośnych Ta i Te, a co ciekawe również dla populacji PS-M (tab. 4 Gieroń et al., 2021). Populacje PS (M) i MS (M) charakteryzowały się stosunkowo niską wartością rozproszenia energii ( $\phi D_0$ ), w porównaniu do populacji NM. Wydajność kwantowa transportu elektronów przez PSII oraz jego prawdopodobieństwo (odpowiednio  $\phi E_0$  i  $\psi E_0$ ) były istotnie wyższe dla populacji NM, w porównaniu do populacji M (tab. 4 Gieroń et al., 2021), co jest potwierdzeniem analiz zmiennej fluorescencji ( $F_v$ ) (rys. 1B, Gieroń et al., 2021). Największe wartości prawdopodobieństwa ( $\delta R_0$ ) i wydajności ( $\phi R_0$ ) redukcji końcowych akceptorów elektronów w miejscach akceptorowych PSI zaobserwowano dla roślin ze stanowisk górskich oraz dla populacji B-M (tab. 4, Gieroń et al., 2021).

Modele fenomenologicznych strumieni energii przypadających na wzbudzone przekroje poprzeczne (CS) liści dla wszystkich badanych populacji *Arabidopsis arenosa* przedstawiono na rysunku 2 (Gieroń et al., 2021). Najwyższe wartości badanych parametrów

zmierzono dla roślin z populacji Ta (NM), natomiast najniższe wartości strumienia, z wyjątkiem procentu aktywnych centrów reakcji na CS (RC/CS), zaobserwowano dla populacji D-M ze stanowiska silnie zanieczyszczonego toksycznymi metalami śladowymi (rys. 2, Gieroń et al., 2021). Transport elektronów na CS (ET/CS) w populacji D (M) był tylko na poziomie 42% ET/CS w populacji Ta (NM). Najniższy procent aktywnych centrów reakcji na CS wśród badanych populacji zaobserwowano dla populacji Su (NM) (54%) (rys. 2, Gieroń et al., 2021). Generalnie populacje NM charakteryzowały się lepszym przepływem strumienia energii PSII (z wyjątkiem roślin Su-NM) niż populacje M (z wyjątkiem roślin PS-M).

### **2.3.5 Analiza głównych składowych**

Przedstawiona analiza składowych głównych wyjaśnia 65,82% zmienności pomiędzy badanymi populacjami (rys. 3, Gieroń et al., 2021). Zgodnie z zasadami analizy postanowiono nazwać czynniki opisujące zmienność jako: toksyczność środowiska (F1), cechy fizjologiczne (F2) i czynniki klimatyczne (F3). Analiza PCA uzyskanych w ramach tej rozprawy wyników wykazała, że toksyczność środowiska (F1) odpowiada za 27,40% zmienności, cechy fizjologiczne (F2) za 21,38% zmienności, natomiast czynniki klimatyczne (F3) - 17,04% zmienności. Z jednej strony czynniki klimatyczne wyraźnie oddzielają populacje górskie od pozostałych. Z drugiej strony, toksyczność środowiska, czyli metale śladowe w glebie i zakumulowane w liściach, wyraźnie oddzielały populacje metalonośne i niemetalonośne. Warto zauważyć, że fizjologiczna charakterystyka roślin pozwoliła na odróżnienie siedlisk skrajnych (silnie zanieczyszczonych metalami i górskich). Ponadto, analiza składowych głównych wykazała, że ploidalność ma marginalny wpływ na zróżnicowanie pomiędzy badanymi populacjami (rys. 3, Gieroń et al., 2021).

### **3. Eksperyment II**

## **Właściwości fizjologiczne *Arabidopsis arenosa* pod wpływem traktowania Zn lub Cd w warunkach kontrolowanych**

### **3.1 Cel**

Celem doświadczenia było porównanie zdolności do akumulacji i tolerancji metali u pięciu wybranych populacji *A. arenosa* (2 diploidalnych i 3 autotetraploidalnych), pochodzących ze stanowisk metalonośnych i niemetalonośnych. W tym celu zmierzono aktywność fotosyntetyczną, parametry wymiany gazowej oraz zawartości barwników w liściach roślin rosnących w warunkach kontrolowanych i traktowanych Cd lub Zn. Zbadano również stężenie wybranych pierwiastków zarówno w liściach, jak i korzeniach.

### **3.2 Materiały i metody**

#### **3.2.1 Materiał roślinny, metody uprawy i pomiar wzrostu roślin**

Nasiona *Arabidopsis arenosa* zebrano z pięciu wybranych stanowisk, które charakteryzowały się różnymi warunkami środowiskowymi. Nasiona dwóch diploidalnych populacji z terenów niemetalonośnych (NM) pochodziły ze stanowisk Czesznek (C) i Sümeg (Su) na Węgrzech. Stanowiska te ze względu na zawartość metali w glebach można uznać za kontrolne. Kolejne trzy populacje tetraploidalne pochodziły z Polski. Nasiona dwu z nich zebrano na stanowiskach metalonośnych (M) - Piekary Śląskie (PS) i Miasteczko Śląskie (MS), natomiast populacja Klucze (K) pochodziła ze stanowiska niemetalonośnego, ale zlokalizowanego na terenie o niewielkim zanieczyszczeniu metalami (NMP).

Nasiona *Arabidopsis arenosa* z pięciu wybranych populacji wysiano na wermikulit podlewany wodą dejonizowaną przez pierwsze dwa tygodnie kiełkowania, a przez kolejne dwa tygodnie zmodyfikowaną pożywką hydroponiczną MS o stężeniu 1/5 w szklarni (fotoperiod 16h światła/8h ciemności, temperatura dnia  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , a temperatura nocy  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ , wilgotność powietrza 30-40%, szklarnia oświetlona światłem słonecznym z dodatkowym oświetleniem wysokoprężnymi lampami sodowymi o natężeniu  $130 \mu\text{mol E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Następnie sadzonki przenoszono losowo do 21 pojemników hydroponicznych. Rośliny uprawiano przez cztery tygodnie w zmodyfikowanej pożywce MS ( $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.88 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.25 mM), NaCl (10

$\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (2mM),  $\text{MgNO}_4$  (1 mM),  $\text{FeEDDHA}$  (20  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MnSO}_4$  (0.6  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0.1  $\mu\text{M}$ ), oraz  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (0.01  $\mu\text{M}$ ) (Corso et al., 2018). Pożywkę wymieniało dwa razy w tygodniu. Po czterech tygodniach wzrostu w kulturze hydroponicznej rośliny z każdej populacji podzielono na trzy grupy: kontrolną, traktowaną 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  i traktowaną 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ . Stężenie obu metali ciężkich zostało dobrane na podstawie dostępnej literatury (Ahmadi et al., 2018; Corso et al., 2018; Schwartzman et al., 2018). Traktowanie prowadzono przez cztery tygodnie. Po tym czasie zebrano trzy powtórzenia biologiczne (pule wszystkich pojedynczych roślin na populację/warunek wzrostu). Pędy oddzielono od korzeni i osuszono bibułą, a każdy organ szybko zważono, aby określić świeżą masę. Ponadto zmierzono długość korzeni.

### 3.2.2 Pomiary zawartości metali w liściach i korzeniach

Zebrane rośliny rozdzielono na korzenie i liście, a następnie materiał roślinny z każdego wariantu suszono w temperaturze 70°C przez 72 h w suszarce (WGLL-65BE, ChemLand, Polska). Następnie wysuszony materiał roślinny rozdrobniono w młynku i poddano mineralizacji w mineralizatorze mikrofalowym (ETHOS1, Milestone, Włochy) przy użyciu stężonego  $\text{HNO}_3$  (suprapur) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v, 4:1). Stężenie wybranych pierwiastków (Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Zn) analizowano przy użyciu płomieniowej atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (iCE 3500 FAAS; Termo Scientific, USA). W celu zapewnienia jakości danych analitycznych wykorzystano referencyjny materiał roślinny (Oriental Basma Tobacco Leaves [INCT-OBTL-5]; Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Polska) (Sitko et al., 2017; Szopiński et al., 2019).

### 3.2.3 Pomiary zawartości barwników i fluorescencji chlorofilu *a*

Indeks zawartości chlorofilu, antocyjanów i flawonoli mierzono na w pełni rozwiniętych liściach za pomocą czujnika Dualex (Dualex Scientific+, Force-A, Francja). Dla każdej populacji *A. arenosa* wykonano piętnaście pomiarów. Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* wykonano na tych samych roślinach przy użyciu analizatora Plant Efficiency Analyzer (PocketPEA fluorimeter; Hansatech Instruments Ltd., Anglia). Pomiary zostały wykonane zgodnie z Sitko et al. (2017). Przed pomiarem każdy wybrany liść był adaptowany w ciemności przez 30 min za pomocą klipsów do liści. Po tym czasie stosowano nasycający impuls świetlny

o natężeniu  $3500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  przez 1 s, co powodowało zamknięcie wszystkich centrów reakcji i mierzono parametry fluorescencji.

### **3.2.4 Pomiary natężenia fotosyntezy i transpiracji**

Pomiary parametrów wymiany gazowej roślin przeprowadzono na w pełni rozwiniętych liściach. Wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), natężenie fotosyntezy ( $A$ ), przewodność szparkową ( $g_s$ ) i natężenie transpiracji ( $E$ ) mierzono pod koniec eksperymentu za pomocą analizatora gazów w podczerwieni ze specjalną komorą dla Arabidopsis (LCpro+, ADC Bioscientific, UK) w kontrolowanych warunkach klimatycznych ( $T = 24^\circ\text{C}$ , natężenie światła  $\text{PAR} = 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### **3.2.5 Analiza statystyczna**

Istotne statystycznie różnice między wartościami średnimi określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu post hoc Fishera (NIR) ( $P < 0,05$ ). Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SE. Do analiz statystycznych wykorzystano oprogramowanie Statistica v.13 (Dell Inc.). Modele przepływu energii na wzbudzone przekroje poprzeczne (CS) liści zostały stworzone przy użyciu programu CorelDRAW X6 (Corel).



## 3.3 Wyniki

### 3.3.1 Wzrost roślin

Porównanie biomasy pędów i korzeni oraz długości korzeni przedstawiono w tabeli 1. Najwyższą biomasę pędów (8,06 g), jak również najwyższą biomasę korzeni (3,23 g) w warunkach kontrolnych stwierdzono u roślin diploidalnych z Sümeg. Jednak różnice nie były istotne statystycznie. Natomiast najmniejszą biomasę pędów w kontroli odnotowano dla Kluczy, a najniższą biomasę korzeni u roślin z Miasteczka Śląskiego.

Największą biomasę pędów spośród wszystkich badanych populacji odnotowano u roślin tetraploidalnych z Miasteczka Śląskiego (MS) traktowanych Cd. Podobną wartość stwierdzono również u tetraploidów z Piekar Śląskich (PS) traktowanych Zn. Najwyższa biomasa korzeni charakteryzowała również tę grupę roślin. Biomasa pędów roślin z PS traktowanych Zn, jak również roślin z MS traktowanych Cd, była prawie ośmiokrotnie wyższa w porównaniu z najniższą biomasą, która wystąpiła u roślin z Csesznek (C) traktowanych Zn. Traktowanie Zn populacji diploidalnych (C i Su) istotnie zmniejszyło biomasę pędów i korzeni.

Spośród roślin grupy kontrolnej najdłuższe korzenie zaobserwowano dla roślin diploidalnych z Csesznek (31,9 cm), natomiast najkrótsze stwierdzono u roślin z Miasteczka Śląskiego (23,6 cm). Długości korzeni pomiędzy grupą roślin o najwyższej wartości tego parametru spośród wszystkich badanych wariantów (rośliny kontrolne z Csesznek) jest o około 30% większa niż roślin traktowanych Zn z Piekar Śląskich (22,5 cm).

**Tabela 1.** Przyrost biomasy pędów i korzeni oraz długość korzeni badanych populacji *Arabidopsis arenosa*.

Nazwa populacji	Wariant	Biomasa pędów (g ś.m.)	Biomasa korzeni (g ś.m.)	Długość korzeni (cm)
Csesznek (NM)	kontrola	6,61 ± 1,87 ab	2,25 ± 0,69 abc	31,9 ± 4,1 a
	Zn	1,07 ± 0,38 c	0,59 ± 0,34 c	29,5 ± 6,6 ab
	Cd	7,37 ± 1,46 ab	2,53 ± 0,55 abc	28,7 ± 1,0 ab
Sümeg (NM)	kontrola	8,06 ± 2,95 ab	3,23 ± 1,20 ab	25,8 ± 3,6 ab
	Zn	3,58 ± 0,95 bc	1,18 ± 0,46 c	25,3 ± 3,3 ab
	Cd	5,44 ± 1,98 abc	1,77 ± 0,61 bc	25,5 ± 3,3 ab
Klucze (NMP)	kontrola	6,02 ± 0,5 ab	2,46 ± 0,2 ab	27,6 ± 1,5 ab
	Zn	4,9 ± 0,7 abc	1,5 ± 0,23 bc	27,1 ± 2,3 ab
	Cd	5,13 ± 0,97 abc	2,06 ± 0,50 bc	25,7 ± 2,0 ab

Piekary Śląskie (M)	kontrola	7,14 ± 0,94 ab	2,31 ± 0,45 bc	26,7 ± 2,5 ab
	Zn	8,27 ± 1,04 a	3,83 ± 0,91 a	22,5 ± 1,9 b
	Cd	6,73 ± 1,54 ab	1,88 ± 0,41 bc	23,5 ± 2,1 b
Miasteczko Śląskie (M)	kontrola	6,81 ± 0,89 ab	2,01 ± 0,22 bc	23,6 ± 0,8 b
	Zn	6,89 ± 0,79 ab	1,98 ± 0,26 bc	23,7 ± 2,2 ab
	Cd	8,39 ± 1,06 a	2,19 ± 0,17 bc	29,9 ± 2,6 ab

NM – populacja niemetalonośna; NMP – populacja niemetalonośna, ale zlokalizowana na terenie zanieczyszczonym; M – populacja metalonośna; populacje diploidalne - Czesznek i Sümeg; populacje tetraploidalne – Klucze; Piekary Śląskie i Miasteczko Śląskie; Cd – grupa roślin traktowana 10 µM CdSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; Zn - grupa roślin traktowana 200 µM ZnSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; g ś.m. – g świeżej masy. Zamieszczone wyniki są średnimi ± błąd standardowy. Litery przy danych określają istotne statystycznie różnice (ANOVA, test NIR,  $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Akumulacja pierwiastków

Częścią eksperymentu było określenie poziomu akumulacji pierwiastków w pędach roślin traktowanych metalami śladowymi. W grupie roślin traktowanych kadmem nie wykryto tego metalu w pędach roślin kontrolnych, z wyjątkiem populacji Czesznek (NM). Największą zawartość Cd odnotowano w pędach populacji z terenów niemetalonośnych (NM) Su i C traktowanych Cd (tab. 2). Zawartość Cd w częściach nadziemnych diploidalnych populacji NM była około dwukrotnie wyższa w porównaniu z populacjami tetraploidalnymi również traktowanymi Cd. Wszystkie populacje traktowane Cd wykazywały akumulację tego metalu w pędach powyżej wartości świadczącej o hyperakumulacji.

W przypadku roślin traktowanych Zn, w pędach roślin grupy kontrolnej nie odnotowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy badanymi populacjami. Natomiast największą zawartość tego pierwiastka w pędach stwierdzono dla K oraz MS. Najmniejszą zawartość Zn zaobserwowano dla Su, która była ponad 5 razy niższa w porównaniu do zawartości odnotowanej dla MS (tab. 2). Akumulacja Zn w pędach pozostałych traktowanych tym metalem populacji była nie różniła się istotnie statystycznie.

Ciekawe wyniki uzyskano dla akumulacji Mg, ponieważ zawartość tego pierwiastka w pędach roślin kontrolnych jest na tym samym poziomie we wszystkich badanych populacjach. Natomiast można zauważyć, w populacjach NM (C i Su) traktowanych Cd istotnie wyższy poziom tego pierwiastka w porównaniu do wszystkich pozostałych badanych wariantów.

Odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku akumulacji Fe, ponieważ Csesznek i Sümeg traktowane Cd wykazywały najniższą zawartość Fe w pędach (tab. 2). Ponadto odnotowano, że w przypadku roślin nietraktowanych metalami, obie diploidalne populacje (C i Su) wykazywały niższą zawartość Fe w pędach, w porównaniu do populacji z terenów zanieczyszczonych. Jednak istotna statystycznie różnica wystąpiła tylko między populacją PS oraz C i Su.

Zawartość Mn w pędach roślin kontrolnych różniła się pomiędzy badanymi populacjami. Najwyższą akumulację tego pierwiastka odnotowano dla roślin kontrolnych populacji C, natomiast najniższą dla K. Traktowanie Cd wpłynęło na wzrost zawartości Mn w pędach badanych wszystkich populacji. Również rośliny traktowane Zn z populacji Su, K oraz MS wykazywały wyższą zawartość Mn w pędach, w odróżnieniu do populacji C i PS, gdzie odnotowano niższą zawartość Mn w pędach roślin traktowanych Zn.

Zbadano również poziom akumulacji pierwiastków w korzeniach roślin traktowanych toksycznymi metalami śladowymi. Populacje z terenów zanieczyszczonych (MS, PS oraz K) wykazywały wyższą zawartość Cd w korzeniach w porównaniu do populacji z terenów kontrolnych. Spośród badanych roślin, najwyższą akumulację Cd odnotowano w korzeniach dla obu tetraploidalnych populacji z terenów metalonośnych (M) oraz diploidalnej populacji Csesznek (NM) z terenu kontrolnego. Istotnie niższe zawartości odnotowano dla roślin Su i K (tab. 3).

W przypadku zawartości Zn zaobserwowano różnice w grupie roślin kontrolnych. Akumulacja Zn w korzeniach roślin diploidalnych (C i Su) była istotnie wyższa w porównaniu do roślin tetraploidalnych (MS, PS oraz K). Ponadto najniższą wartość spośród wszystkich wariantów odnotowano dla korzeni kontrolnych roślin z PS. Podobną tendencję stwierdzono również w grupie roślin traktowanych Zn, ponieważ zawartość cynku w korzeniach populacji C i Su była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do roślin MS i PS (tab. 3).

Zawartość Mg w korzeniach badanych populacji nie różni się istotnie pomiędzy kontrolną grupą i wariantami traktowanymi Zn i Cd, z wyjątkiem kontrolnych roślin Su, w których korzeniach odnotowano około czterokrotnie wyższą zawartość Mg (tab. 3).

Akumulacja Mn w korzeniach nietraktowanych metalami roślin układu się na zbliżonym poziomie, z wyjątkiem populacji MS, której korzenie cechowały się najwyższą zawartością tego pierwiastka spośród wszystkich badanych wariantów. Można też zauważyć istotny spadek zawartości Mn w korzeniach tej populacji pod wpływem traktowania zarówno Zn i Cd (tab. 3).

**Tabela 2.** Akumulacja pierwiastków w pędach pięciu populacji *Arabidopsis arenosa*.

		Akumulacja pierwiastków w pędach ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )							
Nazwa pop.	Wariant trakt.	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Zn
Czesznek (C)	kontrola	33921 ± 4102 bcd	0,93 ± 0,36 d	4,672 ± 0,694 ab	35,93 ± 4,57 bcde	16702 ± 2295 abcde	2577 ± 240 cd	22,11 ± 2,16 ab	219,937 ± 31,05 c
	Zn	26764 ± 3553 bcd	6,11 ± 1,95 cd	3,590 ± 0,073 abc	35,35 ± 3,96 bcdef	22758 ± 2139 ab	2375 ± 203 cd	15,82 ± 0,82 bcd	811,751 ± 214,01 b
	Cd	75915 ± 21220 a	619,84 ± 137,46 a	4,874 ± 0,990 ab	18,33 ± 10,97 f	24123 ± 2349 a	5637 ± 1174 a	25,27 ± 5,10 a	319,826 ± 52,76 c
Sümeğ (Su)	kontrola	24887 ± 4120 cd	BDL	5,874 ± 1,055 a	34,4 ± 2,13 bcdef	16390 ± 2760 abcde	2378 ± 363 cd	12,89 ± 1,95 cde	203,739 ± 41,85 c
	Zn	18043 ± 3769 d	BDL	4,746 ± 0,784 ab	32,51 ± 2,62 bcdef	13128 ± 919 cde	1634 ± 171 d	13,54 ± 1,61 cde	292,075 ± 16,25 c
	Cd	47799 ± 11298 b	492,00 ± 195,10 ab	4,901 ± 1,397 ab	24,04 ± 6,23 ef	20773 ± 3386 abc	4532 ± 1121 ab	17,79 ± 2,03 bc	262,497 ± 59,61 c
Klucze (K)	kontrola	36323 ± 4321 bcd	BDL	0,876 ± 0,243 d	38,78 ± 1,81 bcde	10888 ± 4321 e	2815 ± 240 cd	9,52 ± 0,91 e	201,22 ± 27,84 c
	Zn	41926 ± 4111 bc	BDL	0,993 ± 0,248 d	28,68 ± 1,8 def	17407 ± 1426 abcd	3299 ± 289 bc	12,15 ± 0,86 cde	1655,87 ± 160,77 a
	Cd	37826 ± 1533 bc	268,68 ± 51,52 bc	1,996 ± 0,363 cd	28,62 ± 2,36 def	16468 ± 1695 abcde	2932 ± 89 c	15,52 ± 1,03 c	192,13 ± 14,16 c
Piekary Śląskie (PS)	kontrola	31884 ± 6195 bcd	BDL	2,158 ± 0,432 cd	51,1 ± 5,11 a	22314 ± 2103 ab	2342 ± 308 cd	15,51 ± 2,61 c	232,782 ± 39,64 c
	Zn	25417 ± 4137 d	BDL	3,006 ± 0,591 bc	39,65 ± 5,82 bcd	16243 ± 2207 bcde	2309 ± 266 cd	9,61 ± 1,21 e	1177,687 ± 124,90 b
	Cd	30013 ± 4542 bcd	254,09 ± 20,77 bc	3,218 ± 0,278 bc	45,91 ± 2,84 ab	22189 ± 1928 ab	2446 ± 236 cd	15,64 ± 1,73 c	231,340 ± 25,04 c
Miasteczko Śląskie (MS)	kontrola	25841 ± 3195 d	BDL	4,366 ± 0,389 ab	43,8 ± 4,3 abc	11454 ± 1905 de	1839 ± 215 d	10,49 ± 1,27 de	168,948 ± 26,79 c
	Zn	26570 ± 1806 cd	BDL	5,068 ± 0,778 a	45,31 ± 4,18 ab	19301 ± 2766 abc	2451 ± 233 cd	12,07 ± 1,14 cde	1795,168 ± 237,85 a
	Cd	28898 ± 2744 bcd	294,99 ± 126,23 b	4,605 ± 1,074 ab	32,32 ± 3,38 cdef	22565 ± 3028 ab	2762 ± 350 cd	15,73 ± 1,41 c	248,401 ± 29,59 c

Populacje diploidalne - Czesznek i Sümeğ; populacje tetraploidalne – Klucze; Piekary Śląskie i Miasteczko Śląskie; Cd – grupa roślin traktowana 10  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; Zn - grupa roślin traktowana 200  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie. Zamieszczone wyniki są średnimi ± błąd standardowy. Litery przy danych określają istotne statystycznie różnice (ANOVA, test NIR,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Akumulacja pierwiastków w korzeniach pięciu populacji *Arabidopsis arenosa*.

		Akumulacja pierwiastków w korzeniach ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )							
Nazwa pop.	Wariant trakt.	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Zn
Czesznek (C)	kontrola	4664 ± 221 d	1,09 ± 0,61 c	21,24 ± 3,34 ab	2017,04 ± 181,94 cde	22302 ± 2387 bcd	1804 ± 84 b	18,51 ± 1,80 d	3998,18 ± 520,23 c
	Zn	6256 ± 1694 bcd	58,41 ± 22,89 c	24,92 ± 8,60 ab	6303,76 ± 688,39 a	4091 ± 2547 f	870 ± 203 b	35,72 ± 5,96 bcd	5199,02 ± 941,46 ab
	Cd	5245 ± 158 cd	2415,77 ± 164,75 a	27,02 ± 3,32 ab	2571,06 ± 99,33 bc	33036 ± 601 a	1687 ± 51 b	30,34 ± 6,03 bcd	1342,53 ± 80,76 de
Sümeğ (Su)	kontrola	10320 ± 4352 abc	BDL	20,43 ± 4,80 ab	1585,18 ± 61,26 def	29270 ± 974 ab	4201 ± 1890 a	25,21 ± 9,99 bcd	3601,39 ± 621,53 c
	Zn	10005 ± 1619 abc	BDL	27,43 ± 7,47 ab	7086,58 ± 571,73 a	914 ± 378 f	1437 ± 133 b	19,38 ± 2,13 cd	5390,42 ± 709,72 a
	Cd	5750 ± 555 bcd	1860,97 ± 287,77 b	28,13 ± 10,11 ab	2311,04 ± 402,08 bcd	20627 ± 3735 cde	1327 ± 197 b	54,46 ± 18,50 ab	1202,80 ± 211,66 de
Klucze (K)	kontrola	8278 ± 1083 abcd	4,74 ± 0,50 c	24,14 ± 0,99 ab	1010,77 ± 102,62 fg	20791 ± 1121 cde	1299 ± 84 b	26,78 ± 1,53 cd	1477,41 ± 172,34 de
	Zn	7319 ± 232 bcd	3,26 ± 0,31 c	19,84 ± 3,44 ab	2937,58 ± 387,92 b	21632 ± 1660 cd	1236 ± 95 b	13,7 ± 2,18 d	4119,33 ± 391,46 bc
	Cd	11367 ± 2125 a	1920,16 ± 170,79 b	32,79 ± 9,17 a	1466,73 ± 224,60 ef	23409 ± 1571 bc	1507 ± 124 b	45,69 ± 18,82 bc	1475,52 ± 76,63 de
Piekary Śląskie (PS)	kontrola	7616 ± 1332 bcd	5,72 ± 0,76 c	15,93 ± 2,25 b	706,16 ± 22,95 g	23601 ± 981 bc	1213 ± 99 b	34,80 ± 5,83 cd	1026,48 ± 50,97 e
	Zn	8978 ± 344 abc	8,98 ± 1,44 c	17,04 ± 3,14 b	1515,94 ± 125,55 def	18738 ± 3356 cde	1088 ± 45 b	26,08 ± 1,72 cd	4042,91 ± 230,61 c
	Cd	5605 ± 253 bcd	2520,21 ± 122,33 a	17,24 ± 2,44 b	1534,15 ± 173,06 def	19970 ± 1416 cde	1426 ± 168 b	20,67 ± 1,83 d	1897,57 ± 170,76 de
Miasteczko Śląskie (MS)	kontrola	5854 ± 260 cd	10,66 ± 1,30 c	20,24 ± 2,36 ab	1096,27 ± 44,61 efg	19382 ± 2627 cde	1107 ± 47 b	70,22 ± 6,00 a	2055,16 ± 188,50 d
	Zn	5853 ± 402 cd	5,02 ± 0,44 c	18,52 ± 2,12 b	1774,56 ± 184,06 cde	17265 ± 1419 de	885 ± 54 b	18,79 ± 0,92 d	3873,28 ± 199,52 c
	Cd	5941 ± 576 bcd	2390,35 ± 135,49 a	13,21 ± 3,98 b	1474,18 ± 70,30 def	15201 ± 1405 e	918 ± 112 b	22,55 ± 2,97 d	1836,29 ± 165,06 de

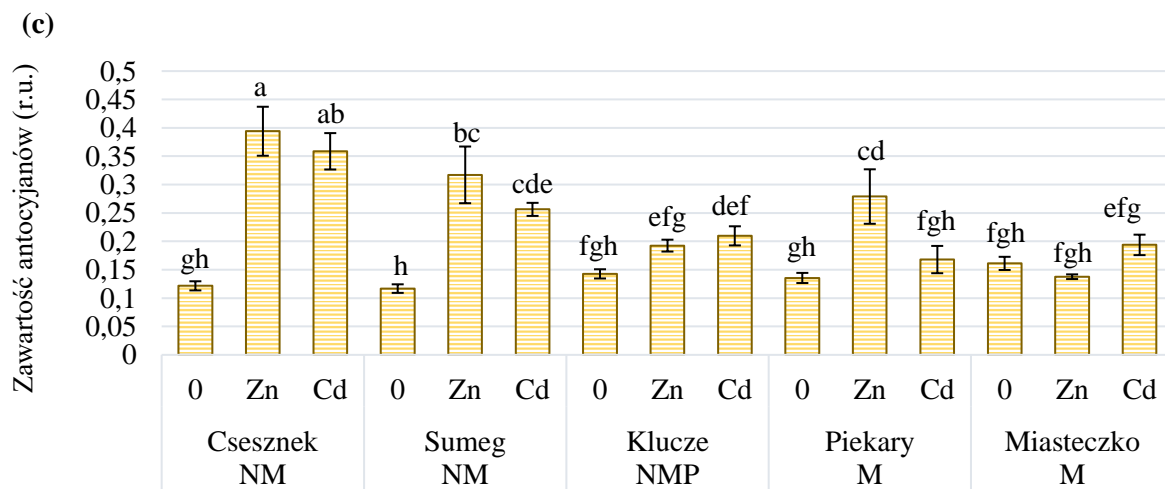
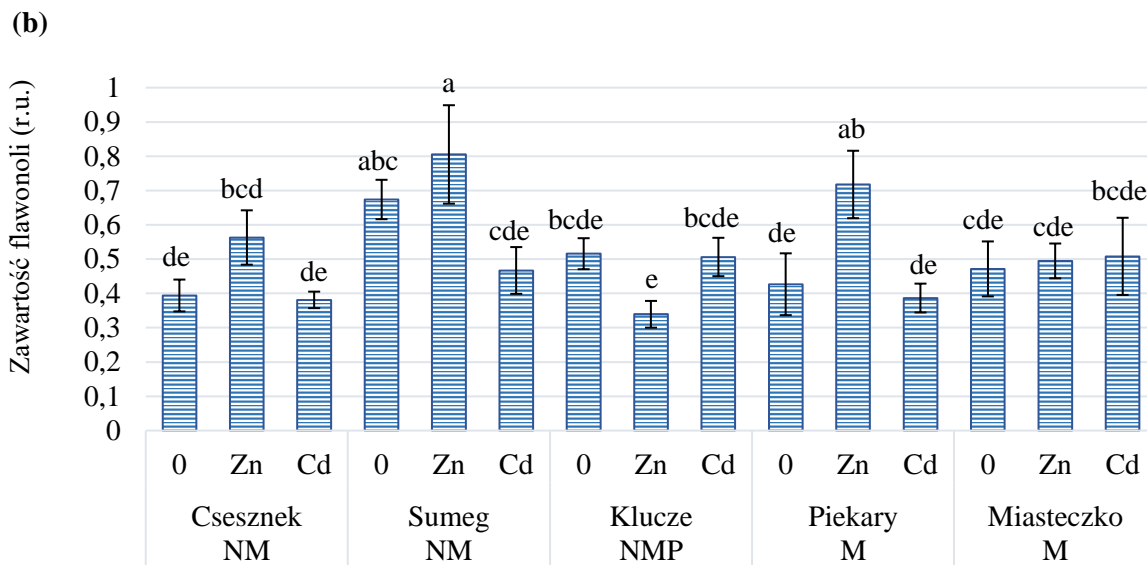
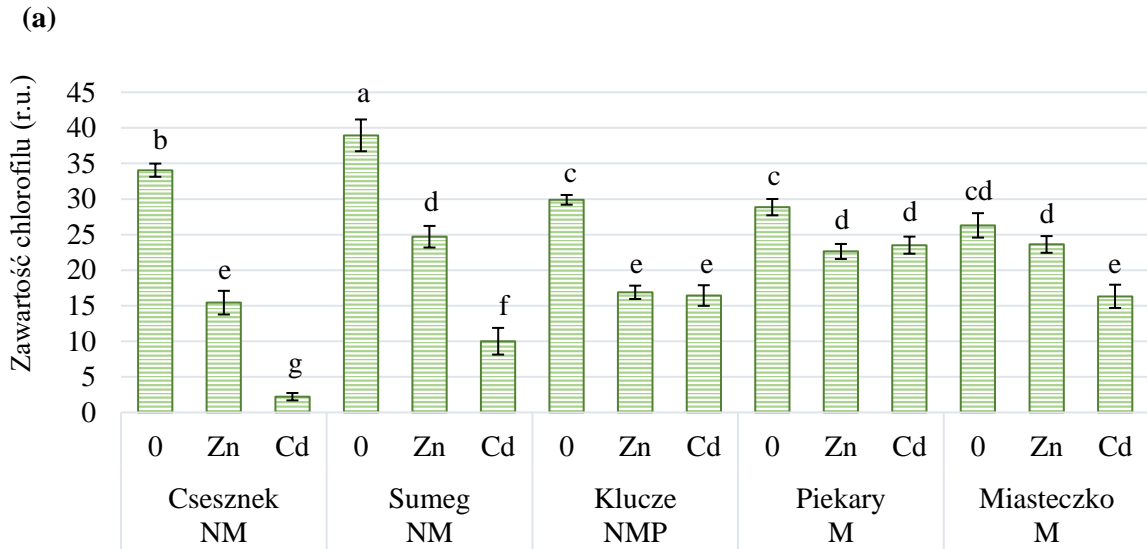
Populacje diploidalne - Czesznek i Sümeğ; populacje tetraploidalne – Klucze; Piekary Śląskie i Miasteczko Śląskie; Cd – grupa roślin traktowana 10  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; Zn - grupa roślin traktowana 200  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie. Zamieszczone wyniki są średnimi ± błąd standardowy. Litery przy danych określają istotne statystycznie różnice (ANOVA, test NIR, p < 0,05).

### 3.3.3 Zawartość barwników

Zawartość chlorofilu, antocyjanów i flawonoli mierzono w liściach *Arabidopsis arenosa* po 28 dniach traktowania metalami. Największe różnice w indeksie zawartości chlorofilu pod wpływem traktowania metalem zaobserwowano u diploidalnych populacji z Csesznek i Sümeg (rys. 4a). Najwyższe zawartości tego barwnika obserwowano u kontrolnych roślin diploidalnych. Z kolei rośliny populacji C i Su traktowane Cd wykazywały najniższy poziom indeksu zawartości chlorofilu. Podobna tendencja wystąpiła u roślin traktowanych Zn populacji C i Su, ale spadek zawartości chlorofilu był o połowę mniejszy w porównaniu do roślin traktowanych Cd. W przypadku populacji metalonośnych również zaobserwowano obniżenie zawartości chlorofilu, ale istotnie mniejsze w porównaniu do populacji diploidalnych. Stosunkowo niskie zmiany tego parametru sugerują, że *A. arenosa* z PS i MS jest tolerancyjna na Zn, a w mniejszym stopniu na Cd. Z drugiej strony, toksyczne działanie metali w postaci spadku wskaźnika zawartości chlorofilu było znacznie bardziej widoczne w niemetalonośnych populacjach diploidalnych, niż w pozostałych badanych populacjach (rys. 4a).

Różnice w indeksie zawartości flawonoli przedstawiono na rysunku 4b. Traktowanie Zn zwiększyło zawartość flawonoli zarówno w populacjach z terenów niemetalonośnych, jak i w populacjach z terenów metalonośnych. Jednak różnice z zawartości tego barwnika nie były istotne statystycznie, z wyjątkiem populacji z Piekar Śląskich, u której wzrost flawonoli był istotnie wyższy w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Natomiast traktowanie Cd nie spowodowało istotnych zmian w badanym parametrze.

W roślinach populacji diploidalnych (C i Su) traktowanych metalami zaobserwowano istotny statystycznie wzrost zawartości antocyjanów w stosunku do roślin kontrolnych, co wskazuje na podwyższony poziom stresu w tych populacjach wywołany przez metale (rys. 4c). Ponadto w populacjach K i PS również zaobserwowano wzrost zawartości tego barwnika, jednak nie był on tak znaczący jak w przypadku populacji diploidalnych. Natomiast populacja MS nie wykazywała różnic zawartości antocyjanów pod wpływem traktowania metalami.



**Rys 4.** Indeks zawartości chlorofilu (a), flawonoli (b) i antocyjanów (c) w liściach pięciu populacji *Arabidopsis arenosa*. Rośliny przez 28 dni rosły w pożywce z 200  $\mu\text{M}$  Zn (Zn) lub 10  $\mu\text{M}$  Cd (Cd), podczas gdy rośliny kontrolne rosły w czystej pożywce (0). Wartości są średnimi  $\pm$  SD (n=15). Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie przy zastosowaniu testu post-hoc Fishera NIR.

### 3.3.4 Wymiana gazowa

Zmierzono cztery parametry wymiany gazowej: natężenie transpiracji (E), przewodność szparkową ( $g_s$ ), natężenie fotosyntezy (A) oraz stężenie międzykomórkowego  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (tab. 4). W przypadku populacji diploidalnych traktowanych metalami przewodność szparkowa ( $g_s$ ) uległa zmniejszeniu, natomiast w przypadku roślin z PS i MS zaobserwowano istotny wzrost tego parametru u roślin traktowanych Cd. Najwyższą wartość przewodności szparkowej stwierdzono u roślin z PS traktowanych Cd i była ona wyższa od wartości obserwowanych w populacjach z terenów kontrolnych.

Wyższe natężenie fotosyntezy (A) w warunkach kontrolnych stwierdzono dla populacji z terenów niezanieczyszczonych (Su i C), ale tylko dla populacji C wartości tego parametru były istotnie wyższe od natężenia fotosyntezy u trzech populacji z terenów zanieczyszczonych metalami. Natomiast pod wpływem działania Zn natężenie fotosyntezy (A) uległo obniżeniu w populacjach niemetalonośnych (Su i C) oraz w Kluczach. Z kolei w przypadku stanowisk skrajnie zanieczyszczonych wartość tego parametru wzrasta dla PS i była na stałym poziomie dla MS (tab. 4). Należy również zauważyć, że Cd znacząco obniżał wartości natężenia fotosyntezy populacji NM w porównaniu do wariantu kontrolnego, natomiast w przypadku populacji PS odnotowano jedną z najwyższych wartości tego parametru pod wpływem działania Cd (tab. 4).

Populacje diploidalne traktowane metalami wykazywały obniżenie wartości badanych parametrów (E,  $g_s$ , A), w przeciwieństwie do populacji tetraploidalnych metalonośnych, które wykazywały zwiększenie przewodności szparkowej i natężenia fotosyntezy.

Odnutowano również istotne zmniejszenie natężenia transpiracji (E) w grupie NM traktowanej Cd w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 4). Natomiast rośliny z terenów metalonośnych wykazywały znaczny wzrost tego parametru. Ponadto rośliny z Piekar Śląskich wykazały najwyższy poziom natężenia transpiracji pod wpływem traktowania Cd.



W przypadku stężenia międzykomórkowego CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) najniższą wartość tego parametru odnotowano dla populacji Czesznek w warunkach kontrolnych. Jednakże wartość C<sub>i</sub> pozostałych badanych populacji nietraktowanych metalami wykazywały zbliżony do siebie niski poziom. Ponadto, diploidalne rośliny populacji NM rosnące w podłożu wzbogaconym w Cd wykazywały najwyższe wartości tego parametru (tab. 4).

**Tabela 4.** Parametry wymiany gazowej w pięciu populacjach *Arabidopsis arenosa* po 28 dniach traktowania Zn i Cd.

Nazwa populacji	Wariant traktowania	Parametry wymiany gazowej			
		E	g <sub>s</sub>	A	C <sub>i</sub>
Sümeg (Su)	kontrola	1,62 ± 0,09 b	162,73 ± 13,88 b	10,00 ± 1,30 ab	356,53 ± 10,31 f
	Zn	0,59 ± 0,05 g	42,13 ± 4,40 g	3,26 ± 0,43 ef	371,4 ± 8,52 def
	Cd	1,04 ± 0,02 f	77,53 ± 1,70 f	1,67 ± 0,22 f	480,2 ± 5,12 a
Czesznek (C)	kontrola	1,60 ± 0,07 bc	159,47 ± 11,28 b	11,334 ± 0,24 a	328,8 ± 4,80 g
	Zn	1,60 ± 0,04 b	151,47 ± 5,38 bc	5,58 ± 1,24 d	396,86 ± 16,82 bc
	Cd	1,02 ± 0,01 f	77,07 ± 1,22 f	3,930,5 de	417,2 ± 12,48 b
Klucze (K)	kontrola	1,61 ± 0,03 b	156,62 ± 5,06 b	8,81 ± 0,37 bc	353,92 ± 2,82 f
	Zn	1,06 ± 0,08 f	91,6 ± 7,86 ef	3,60 ± 0,23 e	389,67 ± 1,16 cd
	Cd	1,5 ± 0,04 bc	146,8 ± 6,52 bc	7,26 ± 0,42 c	366,13 ± 5,8 ef
Piekary Śląskie (PS)	kontrola	1,43 ± 0,06 cd	132,33 ± 7,31 cd	8,35 ± 0,43 bc	382,2 ± 3,62 cde
	Zn	1,64 ± 0,03 b	156,53 ± 4,57 b	9,27 ± 0,28 b	392,73 ± 4,41 cd
	Cd	1,93 ± 0,05 a	200,66 ± 8,35 a	11,26 ± 0,18 a	391,47 ± 3,29 cd
Miasteczko Śląskie (MS)	kontrola	1,32 ± 0,06 de	114 ± 6,92 de	9,32 ± 0,49 b	364,93 ± 3,88 ef
	Zn	1,18 ± 0,06 ef	113,07 ± 8,78 e	8,74 ± 0,42 bc	357,87 ± 8,04 f
	Cd	1,55 ± 0,10 bc	154,53 ± 12,78 bc	8,81 ± 0,30 bc	349 ± 9,43 fg

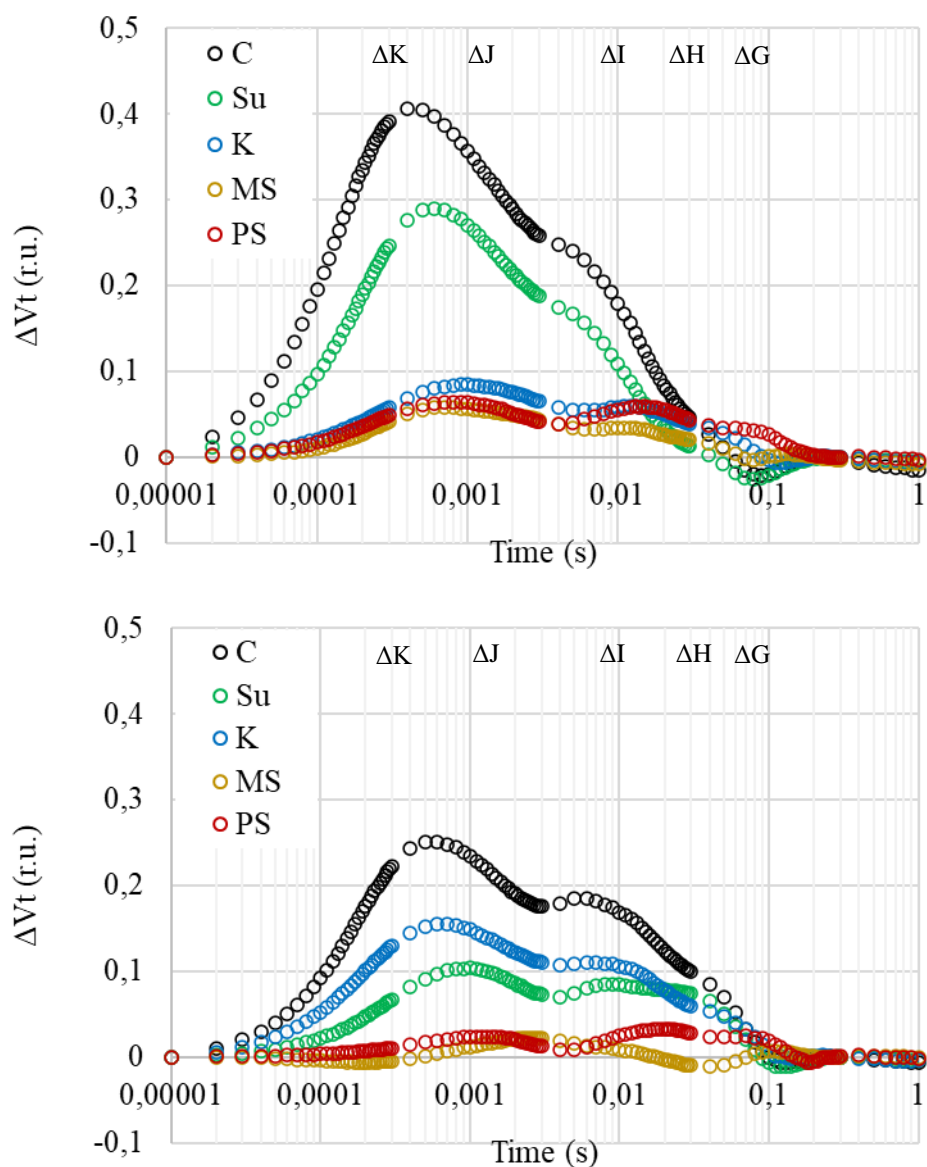
E - natężenie transpiracji; g<sub>s</sub> - przewodność szparkowa; A - natężenie fotosyntezy; C<sub>i</sub> - stężenie międzykomórkowego CO<sub>2</sub>. Populacje diploidalne - Czesznek i Sümeg; populacje tetraploidalne - Klucze; Piekary Śląskie i Miasteczko Śląskie; Cd - grupa roślin traktowana 10 μM CdSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; Zn - grupa roślin traktowana 200 μM ZnSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie. Zamieszczone wyniki są średnimi ± błąd standardowy. Litery przy danych określają istotne statystycznie różnice (ANOVA, test NIR, p < 0,05).

### 3.3.5 Stan i wydajność fotosystemów

Wykresy zmiennej względnej fluorescencji chlorofilu ( $\Delta Vt$ ) pokazują zmiany w przepływie elektronów przez fotosystemy we wzbudzonych sekcjach liści badanych roślin traktowanych kadmem (Rys. 5A) lub cynkiem (Rys. 5B) w stosunku do prób kontrolnych.

W przypadku populacji diploidalnych traktowanych kadmem (C i Su) zaobserwowano wyraźne przesunięci piku  $\Delta I$  w kierunku  $\Delta K$ , co może wskazywać na toksyczny wpływ tego metalu na kompleks uwalniający tlen i/lub nośniki chinonowe  $Q_A$  i  $Q_B$  (Rys. 5A). Populacja tetraploidalna K pochodząca ze stanowiska niemetalonośnego, ale zlokalizowanego na terenie o niewielkim zanieczyszczeniu metalami charakteryzowała się przebiegiem krzywej porównywalnym do populacji metalonośnych MS i PS po traktowaniu kadmem. Warto zwrócić uwagę, że najwyższy pik  $\Delta G$  wystąpił u roślin z populacji PS traktowanych kadmem, co mogło być spowodowane częściowym uszkodzeniem enzymu reduktazy ferredoksyny-NADP<sup>+</sup> (FNR) (Rys. 5A).

Podczas traktowania cynkiem populacje podzieliły się na dwie grupy, tj. populacje z terenów metalonośnych PS i MS tolerancyjne na działanie cynku oraz populacje niemetalonośne C, Su i K, u których cynk wykazywał silne toksycznym działanie na fazę jasną fotosyntezy (Rys. 5B).



**Rys. 5.** Wpływ traktowania 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  (A) lub 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  (B) przez 4 tygodnie na względną zmienną fluorescencję ( $\Delta V_t$ ) pięciu populacji *Arabidopsis arenosa*; populacje diploidalne – Czesznek (C) i Sümeg (Su); populacje tetraploidalne – Klucze (K); Piekary Śląskie (PS) i Miasteczko Śląskie (MS). Do analizy  $\Delta V_t$  jako referencję przyjęto wariant kontrolny, który uzyskał najlepszy wynik i na wykresie wynosi 0. W związku z tym wartości ujemne (poniżej osi X) wskazują na wyższą wydajność fazy jasnej fotosyntezy, natomiast wartości dodatnie (powyżej osi X) wskazują na jej niższą wydajność.  $\Delta K$  – kompleks uwalniający tlen,  $\Delta J$  i  $\Delta I$  – nośniki plastochinonowe,  $\Delta H$  i  $\Delta G$  - aktywność końcowych akceptorów elektronów, takich jak FNR (Sitko et al., 2017; Szopiński et al., 2019).

Jakościowe porównanie wpływu Cd lub Zn na wybrane parametry charakteryzujące efektywność jasnej fazy fotosyntezy pozwoliło wyróżnić charakterystyczne elementy fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, dla których toksyczne działanie badanych metali było najbardziej widoczne w poszczególnych populacjach *A. arenosa* (tab. 5).

Wyniki wyraźnie pokazały, że pod wpływem kadmu populacje niemetalonośne (C i Su) charakteryzowały się bardzo wysokimi wartościami energii rozproszonej ( $\phi Do$ ) i wygaszania niefotochemicznego ( $\phi_{NPQ}$ ), a także wysokimi wartościami tych parametrów po traktowaniu cynkiem, zarówno w porównaniu z tymi populacjami (C i Su) nietraktowanymi metalami, jak i populacjami z terenów metalonośnych traktowanymi metalami (tab. 5). Jednocześnie w populacjach C i Su, po traktowaniu kadmem, wartość minimalnej fluorescencji ( $F_o$ ) zawsze wzrastała w porównaniu z kontrolą. Parametry określające wydajność kwantową transportu elektronów przez poszczególne jednostki łańcucha (takie jak:  $\phi Po$ ,  $\phi Eo$ , czy  $\phi Ro$ ) ulegały znacznemu obniżeniu pod wpływem obu badanych metali w obu populacjach NM w porównaniu z kontrolą, często poniżej 50% jej wartości (tab. 5). W przypadku populacji z terenów metalonośnych obserwowane zmiany wartości poszczególnych parametrów pod wpływem traktowania metalami były zdecydowanie łagodniejsze. Różnice bardzo rzadko przekraczały 20% wartości kontrolnych (tab. 5).

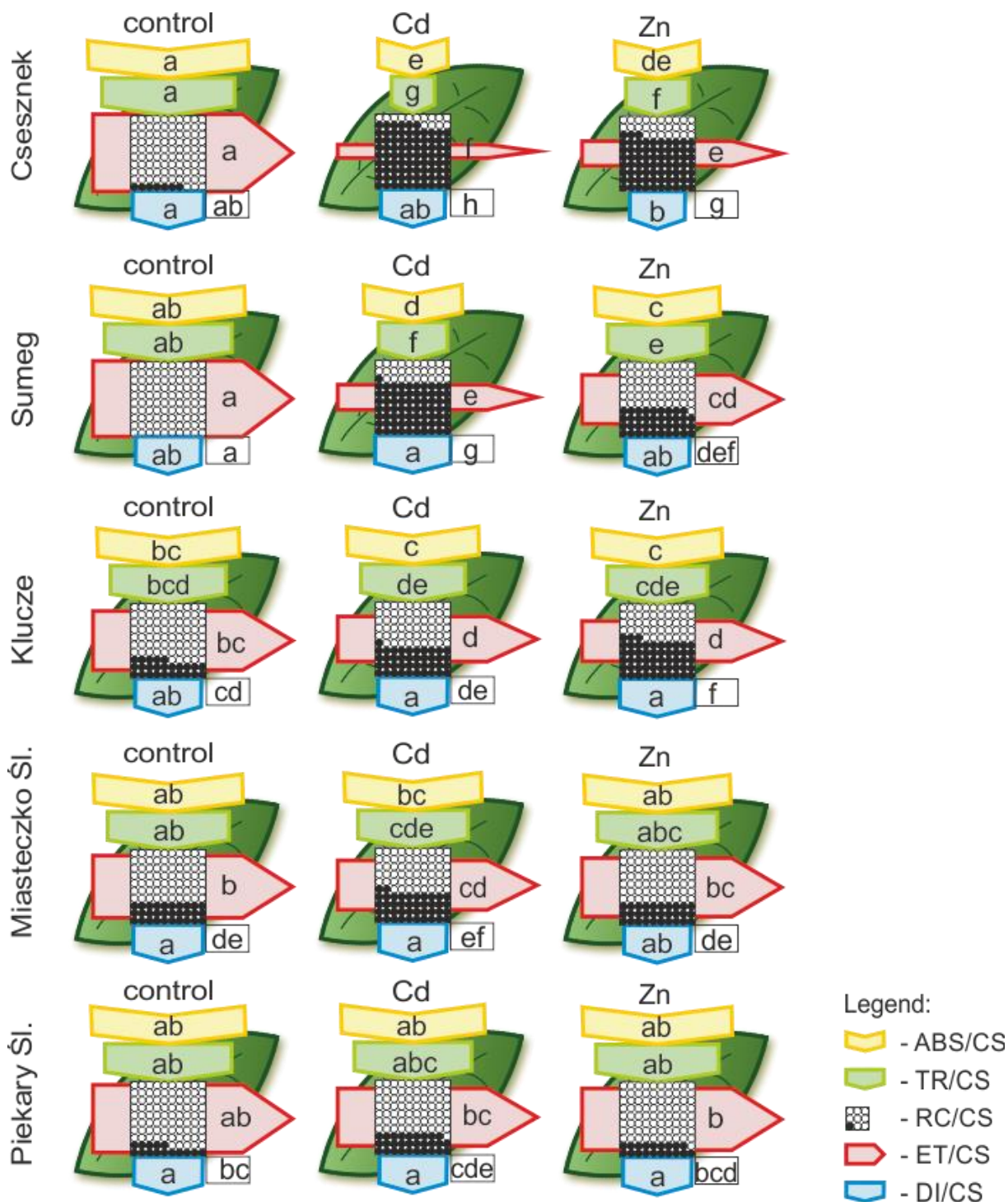
**Tabela 5.** Porównanie jakościowe wpływu Cd lub Zn na wybrane parametry charakteryzujące efektywność fazy jasnej fotosyntezy u pięciu populacji *A. arenosa*.

	$F_o$	$F_m$	$F_v$	$\phi Po$	$\phi Do$	$\psi Eo$	$\phi Eo$	$\delta Ro$	$\phi Ro$	$gH^+$	$\phi_{II}$	$\phi_{NO}$	$\phi_{NPQ}$
C	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C Cd	1,43	0,61	0,43	0,68	2,50	0,39	0,30	1,56	0,52	0,89	0,68	0,63	7,98
C Zn	0,90	0,59	0,53	0,85	1,68	0,59	0,52	0,92	0,41	0,42	0,81	0,78	5,16
Su	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Su Cd	1,49	0,79	0,64	0,82	1,88	0,53	0,46	2,14	0,73	0,76	0,39	0,54	11,27
Su Zn	1,06	0,86	0,81	0,95	1,26	0,81	0,77	0,77	0,56	0,38	0,73	0,95	4,80
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
K Cd	1,09	0,96	0,93	0,97	1,14	0,83	0,81	0,93	0,75	1,23	0,89	1,01	1,69
K Zn	1,23	0,97	0,91	0,94	1,25	0,78	0,74	0,87	0,66	0,65	0,71	1,07	2,69
MS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MS Cd	0,98	0,93	0,92	0,98	1,07	0,85	0,84	1,06	0,86	1,23	1,04	0,84	1,14
MS Zn	0,95	0,98	0,98	1,00	0,98	0,94	0,95	1,14	1,08	0,89	0,97	0,97	1,24
PS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PS Cd	1,00	0,95	0,93	0,99	1,07	0,91	0,90	0,84	0,77	1,30	0,91	1,15	1,24
PS Zn	1,01	0,98	0,97	0,99	1,03	0,94	0,93	0,87	0,81	1,16	1,01	1,00	0,96

Skróty: C – rośliny z Czesnek; Su – rośliny z Sümeg; K – rośliny z Klucze; MS – rośliny z Miasteczka Śl.; PS – rośliny z Piekary Śl. rośliny; Cd – grupa roślin traktowana 10  $\mu M$  CdSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie; Zn – grupa roślin traktowana 200  $\mu M$  ZnSO<sub>4</sub> przez 4 tygodnie;  $F_o$  – minimalna fluorescencja;  $F_m$  – maksymalna fluorescencja;  $F_v$  – maksymalna zmienna fluorescencja;  $\phi Po$  – maksymalna wydajność kwantowa PSII;  $\phi Do$  – wydajność kwantowa rozpraszania energii;  $\psi Eo$  – prawdopodobieństwo, że uwięziony ekscyton przenosi elektron do łańcucha transportu elektronów poza  $Q_A^-$ ;  $\phi Eo$  – wydajność kwantowa dla transportu elektronów z  $Q_A^-$  do plastochinonu;  $\delta Ro$  – prawdopodobieństwo, z jakim elektron z międzysystemowych nośników elektronów przejdzie do redukcji końcowych akceptorów po stronie akceptora PSI;  $\phi Ro$  – wydajność kwantowa dla redukcji końcowych akceptorów elektronów po stronie akceptora PSI;  $\phi_{II}$  – zrealizowana wydajność stanu ustalonego PSII;  $\phi_{NPQ}$  – wydajność kwantowa niefotochemicznego wygaszania ekscytonów.

Przedstawione na rysunku 6 modele przepływu energii przez wzbudzone przekroje liści badanych populacji *A. arenosa* pozwoliły na ilościowe i jakościowe porównanie wpływu Cd lub Zn na PSII badanych roślin w porównaniu z kontrolą.

Wykazano, że w warunkach kontrolnych aparat fotosyntetyczny roślin z populacji Su był najbardziej wydajny (rys. 6). Jednocześnie toksyczne działanie Cd lub Zn było najbardziej widoczne jako najsilniejszy istotny spadek wartości wszystkich parametrów w populacji C. W przypadku obu populacji z terenów metalonośnych traktowanie cynkiem nie powodowało istotnych zmian strumieni energii w porównaniu z kontrolą, natomiast kadm powodował niewielkie, ale istotne spadki tylko niektórych badanych parametrów (w przypadku populacji MS - TR/CS, RC/CS, ET/CS). Populacja tetraploidalna K wykazywała wartości pośrednie pomiędzy diploidami a tetraploidami metalonośnymi, wykazując istotne spadki parametrów ET/ i RC/CS pod wpływem obu metali w porównaniu z kontrolą (rys. 6).



**Rys 6.** Modele liści przedstawiające fenomenologiczne strumienie energii na wzbudzone przekroje poprzeczne liści (CS, ang. cross section) wybranych pięciu populacji *Arabidopsis arenosa* w warunkach kontrolnych w porównaniu z traktowanymi Cd lub Zn. Każda wartość względna mierzonych parametrów jest średnią ( $n = 10$ ), a szerokość każdej strzałki odpowiada intensywności strumienia. ABS/CS - strumień fotonów zaabsorbowanych przez wzbudzony przekrój liścia; TR/CS - strumień uwięzionej energii na CS; ET/CS - transport elektronów przez PSII na CS; DI/CS - strumień rozpraszanej energii na CS; RC/CS - procent centrów reakcji aktywnych na CS. Białe kółka wpisane w kwadraty reprezentują zredukowane centra reakcji  $Q_A$  (aktywne), czarne kółka reprezentują niezredukowane centra reakcji  $Q_A$  (nieaktywne). Średnie z tą samą literą dla każdego parametru nie

różnią się istotnie od siebie przy użyciu testu NIR Fishera ( $P \leq 0,05$ ). Litery są wpisane w strzałki, z wyjątkiem RC/CS, gdzie są umieszczone w prostokącie w prawym dolnym rogu kwadratu z czarnymi i białymi kółkami.

## 4. Dyskusja

### 4.1 Wpływ Cd lub Zn na biomasę roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych

*Arabidopsis arenosa* to gatunek rośliny, który jest coraz częściej badany pod kątem tolerancji na działanie toksycznych metali śladowych. Gatunek ten jest powszechnie znany jako fakultatywny pseudometalofit (Bothe and Słomka, 2017; Wójcik et al., 2017). W ramach tej dysertacji przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych badania wzrostu na pięciu populacjach *Arabidopsis arenosa* poddanych działaniu Zn lub Cd. Należy podkreślić, że w eksperymencie uwzględniono zarówno formy diploidalne ze stanowisk niemetalonośnych, jak i tetraploidalne ze stanowisk metalonośnych. Dwie diploidalne populacje z terenów niemetalonośnych (NM) pochodziły ze stanowisk Czesznek (C) i Sümeg (Su), natomiast dwie populacje tetraploidalne pochodziły ze stanowisk metalonośnych (M) - Piekary Śląskie (PS) i Miasteczko Śląskie (MS), oraz ostatnia tetraploidalna badana populacja Klucze (K) pochodziła ze stanowiska niemetalonośnego, ale zlokalizowanego na terenie o niewielkim zanieczyszczeniu metalami (NMP).

Zaobserwowano, że tetraploidy z PS traktowane 10  $\mu\text{M}$  Cd wykazywały niewielki spadek biomasy pędów w porównaniu do kontroli (Tab. 1). Wyniki przedstawione przez Szopiński et al., (2020) wskazują na spadek biomasy liści populacji metalonośnej pod wpływem Cd, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w tej dysertacji, dotyczącymi populacji PS. Jednak w przypadku innej tetraploidalnej populacji metalonośnej z Miasteczka Śląskiego (MS) stwierdzono, że rośliny traktowane Cd wykazywały najwyższą biomasę pędów. Co ciekawe, podobnie niewielki wzrost tego parametru zaobserwowano w niemetalonośnej populacji diploidalnej z Czesznek (Tab. 1). Można pokusić się o stwierdzenie, że niższa zawartość Cd może powodować hormezę (Małkowski et al., 2020). Ponadto najwyższą biomasę pędów odnotowano dla populacji PS pod wpływem 200  $\mu\text{M}$  Zn. Badania na *A. arenosa* z Piekar Śląskich wykazały niewielki wpływ na obniżenie biomasy liści pod wpływem Zn, ale zawartość tego metalu była wielokrotnie wyższa (Szopiński et al., 2019).



## 4.2 Akumulacja pierwiastków w pędach roślin z naturalnych stanowisk oraz roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych

Jednym z głównych celów dysertacji było zbadanie ekofizjologii i zdolności do hyperakumulacji toksycznych metali śladowych przez czternaście populacji *Arabidopsis arenosa* z naturalnych stanowisk oraz zanieczyszczonych metalami śladowymi. W tym celu zbadano zawartości wybranych pierwiastków w pędach i korzeniach roślin. Analizie poddano siedem metalonośnych populacji (M), jedną niemetalonośną, ale pochodzącą z zanieczyszczonego obszaru (NMP) oraz sześć niemetalonośnych (NM) populacji *Arabidopsis arenosa* z Europy Środkowej. Przedstawione wyniki dotyczące zawartości Cd i Zn w pędach *A. arenosa* sugerują, że populacje z terenów zanieczyszczonych metalami są zdolne do akumulacji ponad  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m. Cd i ponad  $3000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m. Zn w pędach, co wskazuje na hyperakumulację. Wysoką tolerancję i akumulację metali u *A. arenosa* z południowej Polski wykazali wcześniej Nadgórska-Socha et al. (2013) oraz Przedpeńska i Wierzbicka (2007), jednak autorzy Ci nie powiązali tych wyników ze zdolnością tego gatunku do hyperakumulacji Cd i/lub Zn. *A. arenosa* została uznana przez różnych autorów za gatunek wykluczający (ang. excluder), który utrzymuje normalne stężenie Zn i niskie Cd w częściach nadziemnych (Szarek-Łukaszewska and Niklińska, 2002; Peer et al., 2006). Szopiński et al., 2020 po raz pierwszy opisali rośliny *A. arenosa* z Piekar Śląskich jako hyperakumulatory Cd i Zn. Uzyskane w ramach tej dysertacji wyniki akumulacji metali w pędach wykazały po raz pierwszy, zgodnie z naszą wiedzą, że istnieje więcej niż jedna hyperakumulująca populacja *in situ*, zgodnie z definicją hyperakumulacji zaproponowaną przez van der Ent et al. (2013). Przedstawione wyniki wskazują, że zawartość Zn w pędach roślin M mieściła się w zakresie  $1400\text{-}13700 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tab. 2, Gieroń et al., 2021), a całkowita zawartość Zn w glebie wahała się od  $6500$  do  $71000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Ponadto stwierdziliśmy, że zawartość Cd w pędach roślin z populacji M mieściła się w zakresie  $20\text{-}880 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a całkowita zawartość Cd w glebie M wahała się od  $65$  do  $717 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tab. 2 i 3, Gieroń et al., 2021). Jednakże, w przeciwieństwie do *A. halleri*, której populacje ze stanowisk kontrolnych wykazują cechy hyperakumulatora, u *A. arenosa* nie stwierdziliśmy żadnych hyperakumulatorów Cd lub Zn na stanowiskach kontrolnych, ponieważ zawartość Cd w pędach roślin NM mieściła się w zakresie  $0,2\text{-}0,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tab. 2, Gieroń et al., 2021). Trzeba jednak podkreślić, że całkowite stężenie Cd w glebach ze stanowisk kontrolnych wahało się od  $0,3$  do  $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tab. 3, Gieroń et al., 2021). Nasze wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia (Przedpeńska and Wierzbicka, 2007; Nadgórska-

Socha et al., 2013; Szopiński et al., 2020), które również wykazały wysoką tolerancję i akumulację Zn, Cd i Pb w populacjach z południowej Polski. Jednak większość autorów, z wyjątkiem Szopiński et al., (2020), nie zwróciła uwagi na zjawisko hyperakumulacji Cd i Zn u tego gatunku. Dodatkowo należy zaznaczyć, że u wszystkich analizowanych 10 osobników z populacji PS i MS zawartość Zn i Cd w pędach mieściła się w zakresie typowym dla hyperakumulatorów. W pozostałych populacjach M było więcej roślin akumulujących Zn niż Cd.

Akumulację pierwiastków w pędach i korzeniach pięciu wybranych populacjach *Arabidopsis arenosa* zbadano również w kontrolowanych warunkach uprawy hydroponicznej. Różnice w zawartości Cd w pędach roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych pomiędzy populacjami diploidalnymi ze stanowisk niemetalonośnych (NM) w porównaniu do populacji tetraploidalnych ze stanowisk metalonośnych (M) wyraźnie wskazują na ponad dwukrotnie wyższą zawartość Cd w pędach populacji NM (Tabela 2). Sugeruje to lokalną adaptację roślin M do zanieczyszczonego siedliska, przejawiającą się ograniczonym transportem Cd do części nadziemnych, co zostało potwierdzone w badaniach Szopiński et al. (2020). Szopiński et al. (2019) wykazali, że *A. arenosa* jest odporna na szkodliwe działanie Cd w warunkach kontrolowanych i ekstremalnego stresu metalicznego. Należy również wspomnieć, że populacje tetraploidalne nie były znacząco uszkodzone w porównaniu z populacjami diploidalnymi, które wraz z wysokimi poziomami nagromadzonego metalu wykazywały oznaki destrukcyjnego działania metalu. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami Preite et al. (2019), gdzie wykazano, że wszystkie badane rośliny metalonośnych populacji *A. arenosa* rosnące na glebie metalonośnej w kontrolowanych warunkach przeżyły w 100%, podczas gdy wszystkie niemetalonośne populacje *A. arenosa* na glebie metalicznej obumarły (przeżywalność 0%).

Zaobserwowaliśmy, że rośliny NM traktowane Cd zawierają najwyższą zawartość Mg w pędach (Tabela 2). Wzrost zawartości Mg w pędach PL22 *A. halleri* został odnotowany przez Corso et al., (2018) pod wpływem traktowania Cd. Natomiast w przypadku populacji M, traktowanie Cd istotnie obniżyło zawartość Mn w korzeniach (Tabela 3), co potwierdzili Szopiński et al., (2020).

Istotnie wyższy poziom zakumulowanego Zn stwierdzono dla populacji tetraploidalnych, a zawartość tego metalu w pędach roślin wynosiła około 1100-1800  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , w porównaniu do 300-800  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u diploidalnych osobników (Tabela 2). Wyniki badań *in situ*, wykazują że, te same populacje tetraploidalne w siedliskach naturalnych akumulowały

znacznie więcej Zn w zakresie 1400-13700  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Gieroń et al., 2021b). Z drugiej strony, Szopiński et al., (2019) również wykazali znacznie wyższą zawartość Zn w pędach *A. arenosa*, jednak przy wykorzystaniu 25-krotnie wyższego stężenia Zn w podłożu wzrostowym.

### **4.3 Zróżnicowana zawartość jądrowego DNA pomiędzy populacjami *Arabidopsis arenosa* z Europy Środkowej**

Wyniki przeprowadzonych badań dotyczących zawartości jądrowego DNA wykazały, że polskie populacje, z wyjątkiem populacji z Wełnowca, były tetraploidami (4C) (tab. 4, Gieroń et al., 2021b). Dane te są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Kolář et al. (2016) i Monnahan et al. (2019), którzy stwierdzili, że w południowej części Polski występowały populacje tetraploidalne (4C). Także Szopiński et al. (2020) także wykazali tetraploidalność populacji K (NMP) i PS (M). Schmickl et al., (2012) stwierdzili, że siedliska diploidalne występują m.in. na Węgrzech i Półwyspie Bałkańskim. W związku z tym w ramach tej dysertacji przeanalizowano także zawartość DNA węgierskiej populacji Ta (NM), która okazała się populacją diploidalną (2C) (tab. 4, Gieroń et al., 2021b).

Analiza głównych składowych PCA (fig. 3, Gieroń et al., 2021b) wykazała, że czynniki klimatyczne wyraźnie oddzielają populacje górskie od pozostałych populacji. Kolář et al., (2016) również stwierdzili, że różne cytotypy *A. arenosa* zajmowały różne nisze klimatyczne. Co więcej, udokumentowali oni znacznie częstsze występowanie tetraploidów na antropogenicznych stanowiskach oddalonych od naturalnych siedlisk. Potwierdziła to analiza PCA wykonana w ramach tej dysertacji, dzieląc rośliny na populacje metalonośne i niemetalonośne (Rys. 3, Gieroń et al., 2021b). Ponadto Monnahan et al. (2019) wykazali, że tetraploidalne formy *A. arenosa* są bardziej plastyczne niż diploidy i łatwiej dostosowują się do trudnych siedlisk.

#### **4.4 Wpływ warunków środowiskowych lub traktowania metalami na zawartość barwników w roślinach badanych *in situ* oraz uprawianych w warunkach kontrolowanych**

Przedstawione wyniki zawartości chlorofilu zbadane *in situ* wykazały istotne różnice pomiędzy populacjami z terenów metalonośnych i niemetalonośnych (tab. 4, Gieroń et al., 2021b). Najwyższy indeks zawartości chlorofilu zaobserwowano w populacji V (NM), która znajdowała się na stanowisku o największej wysokości nad poziomem morza (tab. 1 i 4, Gieroń et al., 2021b). Podwyższona zawartości chlorofilu jest typową cechą populacji górskich, co odnotowano dla *A. halleri* (Sitko et al., 2017), *Clinopodium vulgare* (Kofidis et al., 2007) i *Plantago lanceolata* (Pellissier et al., 2014). Interesujące jest jednak to, że podobnie wysoką zawartość chlorofilu odnotowano dla populacji PS (M) ze skrajnie zanieczyszczonego terenu. Najniższą zawartość chlorofilu *in situ* odnotowano dla metalonośnego stanowiska B, podobnie jak w przypadku *A. halleri* badanego *in situ* przez Sitko et al. (2017). Należy jednak podkreślić, że najniższy indeks zawartości chlorofilu stwierdzony dla metalonośnej populacji B stanowił aż 75% indeksu zawartości chlorofilu odnotowanego dla populacji V (NM). Wyniki te sugerują, że mimo dużej zawartości metali toksycznych w glebie metabolizm chlorofilu w populacjach *A. arenosa* z terenów metalonośnych nie jest istotnie zaburzony. Szopiński et al. (2020) wykazali, że zawartość chlorofilu zarówno w liściach K (NMP), jak i PS (M) była na tym samym poziomie, podczas gdy nasze wyniki wskazywały istotnie wyższą zawartość barwnika w liściach PS (M) w porównaniu do K (NMP) (tab. 4, Gieroń et al., 2021b). Należy podkreślić, że wyniki zawarte w tej dysertacji, po raz pierwszy porównują indeks zawartości chlorofilu w 14 populacjach *Arabidopsis arenosa* badanych *in situ*.

W przypadku roślin uprawianych w kulturach hydroponicznych wykazano, że w wariancie nietraktowanym metalami najwyższą zawartość chlorofilu zmierzono dla roślin Su (rys. 4a), które charakteryzowały się jedną z najniższych zawartości chlorofilu *in situ* (tab. 4, Gieroń et al., 2021b). Wyniki te sugerują, że trudne warunki siedliskowe, nawet przy bardzo niskich zawartościach metali toksycznych w glebie, mogą powodować zaburzenia w metabolizmie chlorofilu. Należy również zauważyć znaczące różnice w poziomach chlorofilu między diploidami i tetraploidami nietraktowanymi metalami. Rośliny z Csesznek i Sumeg (populacje diploidalne) wykazywały istotnie wyższe stężenia tego barwnika w porównaniu do tetraploidów, co może wskazywać, że ta grupa jest w lepszym stanie fizjologicznym.

Indeks zawartości chlorofilu drastycznie spadł w przypadku populacji diploidalnych pod wpływem traktowania metalami (rys. 4a). Największy spadek odnotowano w przypadku roślin traktowanych Cd, ale Zn również obniżył zawartość badanego barwnika o połowę. Szopiński et al. (2020) również wykazali istotny spadek wskaźnika zawartości chlorofilu w *A. arenosa* traktowanym Cd. Również *Noccaea caerulea* poddana działaniu wzrastającym stężeniom Cd (od 10 do 50 M) wykazała znaczny spadek zawartości chlorofilu, jednak spadek ten nie był tak wyraźny, jak u nietolerancyjnego *Thlaspi fendleri* narażonego na te same stężenia Cd (Küpper et al., 2007). Według Paunov et al. (2018), siewki pszenicy durum traktowane 50  $\mu$ M Cd i 600  $\mu$ M Zn miały wyraźne objawy toksyczności, takie jak zmniejszenie zawartości chlorofilu o ponad 50% w stosunku do kontroli.

Traktowanie Zn znacząco wpłynęło na wzrost poziomu indeksu zawartości flawonoli w populacjach diploidalnych. Podobny trend po traktowaniu Zn wystąpił również u roślin tetraploidalnych roślin PS (rys. 4b). Natomiast w przypadku drugiej badanej populacji tetraploidalnej ze stanowiska metalonośnego (MS) nie zaobserwowano istotnych zmian pod wpływem traktowania metalami (rys. 4b). Wyniki przedstawione w tej rozprawie wskazują, że populacje diploidalne zwiększają biosyntezę flawonoli w celu obrony przed stresem Zn, natomiast populacje tetraploidalne. Wyniki badań wskazują na istotny spadek zawartości tego barwnika zarówno u *A. halleri*, jak i *A. arenosa* z terenów metalonośnych traktowanych Zn i Cd (Szopiński et al., 2019). Inne badania wykazują wzrost zawartości flawonoli tylko przy bardzo wysokiej zawartości Cd w podłożu wzrostowym (200  $\mu$ M Cd) zarówno dla populacji M *A. arenosa*, jak i NM (Szopiński et al., 2020).

Traktowanie metalami populacji w kulturach hydroponicznych znacząco zwiększyło zawartość antocyjanów we wszystkich badanych populacjach z wyjątkiem MS. Rośliny diploidalne wykazywały największe różnice (nawet 4-krotnie wyższe zawartości antocyjanów) w porównaniu do grupy kontrolnej nie traktowanej metalami. Trend ten został również potwierdzony we wcześniejszych badaniach (Szopiński et al., 2020) wykazujących, że obecność metali powoduje większy wzrost tych barwników w populacjach niemetalonośnych w porównaniu do metalonośnych. Corso et al. (2018) dostarczyli dowody na to, że *A. halleri* ma konstytutywnie wyższą ekspresję wielu genów zaangażowanych w biosyntezę flawonoidów i wyższą akumulację związanych z nimi metabolitów (Corso et al., 2018). Ponadto stwierdzono, że nie było znaczących różnic między badanymi populacjami w warunkach kontrolnych (rys. 4c). Przedstawione wyniki potwierdzają istotną rolę antocyjanów w odpowiedzi na stres i brak

ich zwiększonej syntezy w warunkach kontrolnych, bez stresu, niezależnie od pochodzenia geograficznego roślin.

Indeks zawartości antocyjanów zbadany *in situ* w populacjach ze stanowisk M był wyższy w porównaniu z populacjami NM, z wyjątkiem stanowiska Sz (M), dla którego odnotowano najniższą wartość. Wyniki tego parametru w przypadku pozostałych stanowisk M wahały się od 0,040 do 0,116 r.u. Z kolei populacje NM *in situ* wykazywały istotnie niższy wskaźnik zawartości antocyjanów (0,012-0,043 r.u.), z wyjątkiem populacji Su (0,060 r.u.). Podobną zależność odnotowano dla indeksu zawartości flawonoli zbadanego *in situ*, ponieważ najwyższe i najniższe zawartości odnotowano odpowiednio dla populacji PS (M) i Sz (M). Potwierdzają to Szopiński et al. (2019, 2020), którzy wykazali wzrost wskaźnika zawartości antocyjanów u *A. arenosa* i *A. halleri* w wyniku traktowania metalami toksycznymi oraz na silnie zanieczyszczonym terenie. Wyniki uzyskane w ramach tej dysertacji potwierdziły również, że wyższe stężenia obu grup barwników były charakterystyczne dla populacji górskich i metalonośnych (tab. 4, Gieron et al., 2021b). Także wyniki innych badań wskazują, że rośliny poddane stresowi środowiskowemu, np. suszy, wykazują silną indukcję genów biosyntezy flawonoidów (Nakabayashi et al., 2014; Corso et al., 2015). Ponadto Corso et al., (2018) wykazali, że flawonole i antocyjany odgrywają ważną rolę w odpowiedzi na toksyczne działanie metali śladowych w populacjach hyperakumulujących i wykluczających (ang. excluders) *A. halleri*, co zw zwiększoną zdolnością antyoksydacyjną i chelatującą metale.

#### **4.5 Wpływ metali toksycznych w środowisku oraz w warunkach kontrolowanych na wydajność aparatu fotosyntetycznego**

Fizjologodzy roślin definiują  $\phi P_0$  jako maksymalną wydajność kwantową PSII, która odzwierciedla ogólny stan fizjologiczny roślin (Kalaji et al., 2014; Sitko et al., 2017, 2019). Dotychczas jednak nie prowadzono badań nad wydajnością aparatu fotosyntetycznego u *A. arenosa* w naturalnych siedliskach, które potrafią się diametralnie od siebie różnić. Maksymalna wydajność kwantowa aparatu fotosyntetycznego ( $\phi P_0$ ) zbadana w ramach tej pracy w populacjach *in situ* miała najwyższą wartość dla niemetalonośnych diploidalnych populacji: Ta, oraz górskiej Te. Także pozostałe populacje NM charakteryzowały się nieco

wyższą wartością  $\phi P_0$  w porównaniu z populacjami M. Warto zauważyć, że jedna z populacji metalicznych, PS (M), o najwyższej akumulacji Zn i Cd w liściach, wykazała stosunkowo wysoki  $\phi P_0$  (tab. 4, Gieroń et al., 2021b). W przeciwieństwie do moich wyników, badania *in situ* przeprowadzone przez Sitko et al. (2017) na hyperakumulatorze *A. halleri* wykazały zupełnie odwrotną zależność, a mianowicie populacja z tego samego stanowiska co *A. arenosa* (PS) akumulująca najwięcej metali toksycznych miała najniższą wydajność i aktywność PSII (Sitko et al., 2017). Można zatem postawić hipotezę, że mechanizmy adaptacji i tolerancji u *A. arenosa* różnią się od tych u blisko spokrewnionego gatunku *A. halleri*.

Ponadto negatywny wpływ metali był również widoczny w modelach fenomenologicznych strumieni energii na PSII (fig. 2, Gieroń et al., 2021b). Najniższe wartości strumieni przepływu (z wyjątkiem RC/CS) zaobserwowano w roślinach D (M) z terenu o wysokiej zawartości metali. Najniższy odsetek aktywnych centrów reakcji na CS wśród badanych populacji zmierzono w roślinach Su (NM) (fig. 2, Gieroń et al., 2021b). Pomimo tego, populacje NM wykazały wyższy poziom przepływu energii na CS w porównaniu z populacjami M.

Zmiany kształtu krzywych OJIP wskazują również na negatywny wpływ toksycznych metali śladowych na fluorescencję chlorofilu *a*. Widoczne spłaszczenie fazy I-P w populacjach M (fig. 1A, Gieroń et al., 2021b) może wskazywać na zmniejszoną liczbę PSI w porównaniu do PSII (Kalaji et al., 2018). Również spłaszczenie krzywych fluorescencji dla populacji M zostało wykazane przez Sitko et al. (2017) i Szopiński et al. (2020). Ponadto wyniki tej dysertacji przedstawione jako  $\Delta Vt$  wskazują na uszkodzenie OEC i / lub akumulację  $Q_A$  w stanie zredukowanym ( $Q_A^-$ ) (piki  $\Delta K$  i  $\Delta I$ ) (fig. 1B, Gieroń et al., 2021b). Negatywny wpływ wysokiej zawartości metali na *A. arenosa* został przedstawiony przez Szopiński et al. (2019), (2020), którzy wykazali, że OEC, pula  $Q_A$  i składniki PSI były bardziej narażone u *A. arenosa* w porównaniu do *A. halleri*. Jednak to uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego u *A. arenosa* wynikało z wysokiej zawartości metali toksycznych w pędach, ale było zdecydowanie mniejsze niż u *T. durum* traktowanej niższymi stężeniami metali, co zostało przedstawione przez Paunov et al., (2018).

Wpływ śladowych metali toksycznych na aparat fotosyntetyczny nie był szeroko badany w przypadku hyperakumulatorów i roślin hypertolerancyjnych w warunkach kontrolowanych (Küpper et al., 2007; Bayçu et al., 2017, 2018; Szopiński et al., 2019, 2020). W związku z tym poddano analizie krzywe fluorescencji chlorofilu *a* roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych, które wyraźnie różnicowały populacje niemetalonośne (C i Su) od

metalonośnych (PS i MS) pod wpływem traktowania Cd (rys. 5A). Tetraploidalne populacje metalonośne wykazywały wyższą tolerancję aparatu fotosyntetycznego pod wpływem działania kadmu w porównaniu z populacjami z terenów niemetalonośnych. Pojawienie się najwyższego pików  $\Delta K$  o wartościach dodatnich w populacjach C i Su mogło mieć związek z zaburzoną aktywnością kompleksu uwalniającego tlen OEC (Kalaji et al., 2014). Podobny przebieg krzywych ze znacznie wyższym pikiem  $\Delta K$  pod wpływem traktowania Cd stwierdził Szopiński et al. (2020) dla populacji z terenów niemetalonośnych *A. arenosa*, jak i *A. halleri* - jednak z zauważaniem niższym  $\Delta K$ . Co więcej, należy zauważyć, że końcowe elementy łańcucha transportu elektronów ( $\Delta H$  i  $\Delta G$ ) wydają się być w lepszej kondycji w przypadku populacji niemetalonośnych (wartości pików poniżej osi X) w porównaniu do populacji metalonośnych (rys. 5A).

Rośliny traktowane Zn wykazywały znacznie mniejsze zaburzenia aparatu fotosyntetycznego (rys. 5B). W przypadku traktowania Zn pomiędzy krzywymi zmiennej fluorescencji populacji C i Su odnotowano krzywą populacji K z terenów niemetalonośnych, ale zanieczyszczonych (NMP). Największą tolerancję odnotowano dla populacji ze skrajnie zanieczyszczonych terenów, czyli MS i PS. Szopiński et al. (2019) wykazał, że nawet przy ekstremalnie wysokich zawartościach Zn i Cd, tolerancja aparatu fotosyntetycznego metalonośnych populacji *A. arenosa* była zbliżona do poziomu tolerancji hyperakumulatora *A. halleri* z tych samych metalonośnych stanowisk.



## 5. Podsumowanie i wnioski

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazują właściwości ekofizjologiczne 14 populacji *Arabidopsis arenosa* zlokalizowanych w Europie Środkowej. Zaprezentowane wyniki z części pierwszej wyraźnie wskazują, że populacje ze stanowisk metalonośnych posiadają cechy hyperakumulacji Zn oraz rzadziej hyperakumulacji Cd. Najwyższe zawartości Cd, Pb i Zn odnotowano dla populacji tetraploidalnych z terenów skrajnie skarżonych metalami - MS i PS. Co więcej, hyperakumulacja Cd i/lub Zn była zaobserwowana tylko dla populacji autotetraploidalnych. Nie została znaleziona żadna populacja diploidalna zdolna do hyperakumulacji kadmu lub cynku, co jednak nie wyklucza jej istnienia.

Wykazano również, że indeks zawartości barwników może być markerem stresu wywołanego przez warunki środowiskowe, czy zanieczyszczenie metalami. Zawartość antocyjanów w populacjach NM była generalnie niższa w porównaniu do populacji M, ponadto zawartość tego barwnika w populacjach ekstremalnie zanieczyszczonych MS i PS była najwyższa.

Populacje z terenów niemetalonośnych wykazywały również wyższą maksymalną wydajność kwantową PSII, odzwierciedlającą ogólny stan fizjologiczny roślin. Jednak również w tym przypadku populacje PS i MS charakteryzowały się wysoką wydajnością aparatu fotosyntetycznego. Świadczy to o dużej odporności obu populacji na toksyczne działanie metali.

Druga część niniejszej pracy skupiająca się nad zbadaniem właściwości fizjologicznych różnych populacji *A. arenosa* w warunkach kontrolowanej uprawy hydroponicznej, dostarczyła równie interesujące wyniki. Zaobserwowano, że populacje diploidalne wykazywały silne zahamowanie wzrostu pod wpływem działania metali, podczas gdy populacje tetraploidalne z terenów skrajnie zanieczyszczonych PS i MS wykazywały najwyższe wartości parametrów wzrostowych w obecności metali.

Populacje diploidalne z terenów niemetalonośnych również wykazywały najwyższe zawartości Cd w pędach, co jasno wskazuje na brak mechanizmów adaptacyjnych, wykształconych u populacji tetraploidalnych z terenów metalonośnych. Potwierdza to również znaczny wzrost zawartości antocyjanów i spadek zawartości chlorofilu w populacjach diploidalnych traktowanych Zn lub Cd w porównaniu do kontroli. Należy zauważyć, że pod

względem zawartości tych barwników u populacji M nie wystąpiły istotne statystycznie różnice pomiędzy kontrolą, a grupą traktowaną metalami.

Traktowanie Cd również mocno zaburzyło działanie aparatu fotosyntetycznego populacji niemetalonośnych, ponieważ najniższą wartość dla maksymalnej wydajności kwantowej PSII odnotowano właśnie w populacjach C oraz Su.

Wyniki badań przedstawione w tej dysertacji jasno wskazują, że istnieją znaczne różnice pomiędzy populacjami *Arabidopsis arenosa*. Różnice te wynikają prawdopodobnie z odmiennych wykształconych mechanizmów adaptacyjnych. Mimo to, szczegółowe mechanizmy odpowiedzialne za zdolność *A. arenosa* do tolerancji i hyperakumulacji toksycznych metali śladowych są nadal nieznanne, co wydaje się być bardzo interesującym zagadnieniem dalszych badań.

## 6. Streszczenie

Coraz częściej w badaniach naukowych na całym świecie podejmowane jest zagadnienie hyperakumulacji metali śladowych przez rośliny. Przyczyną tego jest narastające zanieczyszczenie środowiska toksycznymi metalami śladowymi, których jednym z głównych źródeł jest szeroko pojęty przemysł. Niektóre metale śladowe, takie jak kadm i ołów, nie mają żadnych funkcji fizjologicznych i są toksyczne nawet w niewielkich ilościach, stwarzając poważne zagrożenie dla organizmów żywych. Do metali należy również cynk, który będąc mikroelementem jest konieczny w śladowych ilościach do optymalnego wzrostu i rozwoju roślin, natomiast w wysokich stężeniach wykazuje działanie toksyczne. Większość gatunków roślin gromadzi toksyczne metale śladowe przede wszystkim w korzeniach. Niemniej jednak istnieje grupa roślin, które akumulują od 50 do nawet 500 razy więcej danego metalu w ich częściach nadziemnych w porównaniu do zawartości w podłożu, a mimo to te rośliny są w stanie rosnąć i rozwijać się, pomimo wysokich zawartości metalu w pędach. Takie rośliny są określane jako hyperakumulatory. Często hyperakumulatory spotykane są na terenach zanieczyszczonych metalami i dlatego mogą być one wykorzystywane w procesie fitoremediacji. Pomimo coraz większej liczby znanych gatunków zdolnych do hyperakumulacji, wciąż wiedza na temat mechanizmów tego zjawiska jest niewielka.

Celem niniejszej rozprawy było sprawdzenie i porównanie cech fizjologicznych kilkunastu populacji *Arabidopsis arenosa* w naturalnych siedliskach kontrolnych oraz zanieczyszczonych metalami, jak również kilku wybranych populacji w warunkach kontrolowanych pod wpływem działania Zn lub Cd. Aby sprawdzić zdolność roślin do akumulacji metali śladowych oraz ich wpływ na parametry fizjologiczne przeanalizowano zawartość wybranych pierwiastków w liściach i korzeniach, jak również zmierzono aktywność fotosyntetyczną i zawartości barwników w liściach.

*Arabidopsis arenosa* to gatunek blisko spokrewniony z *A. halleri*, który jest gatunkiem uznanym za modelowy w badaniach mechanizmów związanych z tolerancją i akumulacją wysokich stężeń Cd i Zn. Jednak *Arabidopsis arenosa* również wykazuje wysoką odporność na te metale. Wcześniejsze badania wykazały, że *A. arenosa* akumuluje metale głównie w korzeniach, transportując jedynie niewielką część Cd i Zn z korzeni do pędów. Oba wyżej wymienione gatunki można zaobserwować na tych samych stanowiskach silnie zanieczyszczonych metalami na południu Polski.

Rozdział pt. Eksperyment I obejmuje badania terenowe oraz laboratoryjne, których celem było scharakteryzowanie ekofizjologii *Arabidopsis arenosa* rosnącej w naturalnym środowisku. Na 14 stanowiskach rozrzuconych w Europie Środkowej przeprowadzono pomiary fluorescencji chlorofilu *a* i zawartości barwników. Następnie w laboratorium oznaczono całkowitą zawartość metali oraz zawartość biodostępnych form metali w pobranych próbach glebowych, a w materiale roślinnym zbadano zawartość wybranych metali w pędach i korzeniach, jak również oznaczono poziom ploidalności. Zaprezentowane wyniki jasno wskazują, że populacje z terenów metalonośnych wykazują cechy hyperakumulacji Zn (stwierdzono dla 5 z 6 populacji M) oraz rzadziej hyperakumulacji Cd (3 populacje M). Ponadto, hyperakumulacja Zn i/lub Cd była obserwowana tylko u populacji tetraploidalnych.

Rozdział pt. Eksperyment II dotyczy porównania zdolności do akumulacji i tolerancji metali u 5 wybranych populacji *A. arenosa* uprawianych w warunkach kontrolowanych. Dwie badane diploidalne populacje pochodziły z terenów niemetalonośnych, a kolejne 3 autotetraploidalne populacje ze stanowisk metalonośnych. W roślinach traktowanych Cd lub Zn zmierzono aktywność fotosyntetyczną, parametry wymiany gazowej oraz zawartości barwników w liściach. Zbadano również stężenie wybranych pierwiastków zarówno w liściach, jak i korzeniach. Wykazano, że uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego wywołane działaniem metali u populacji z terenów metalonośnych były zdecydowanie mniejsze w porównaniu z populacjami z terenów niemetalonośnych.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy rzucają nowe światło na zagadnienie hyperakumulacji u *A. arenosa*. Należy podkreślić, że dużym osiągnięciem było po raz pierwszy przedstawienie kilku populacji tetraploidalnych wykazujących cechy hyperakumulacji Cd i Zn. Z jednej strony, odnotowano różnice w parametrach fizjologicznych pomiędzy badanymi populacjami, z drugiej strony, trudne warunki środowiskowe powodowały podobną odpowiedź fizjologiczną, taką jak wysokie zanieczyszczenie metalami. Wszystkie te cechy sugerują, że *A. arenosa*, zwłaszcza jako nowy hyperakumulator Cd i Zn oraz model autopoliploidyzacji, może być uważana za bardzo interesujący obiekt badań, szczególnie w przypadku badania mechanizmów akumulacji i tolerancji toksycznych metali śladowych u roślin.

## 7. Summary

Hyperaccumulation of heavy metals in plants is increasingly being addressed in scientific research worldwide. The reason for this is the increasing pollution of the environment with toxic trace metals, one of the primary sources of which is industry at large. Some trace metals, such as cadmium and lead, have no physiological function and are toxic even in small amounts, posing a severe threat to living organisms. Metals also include zinc, which, being a trace element, is necessary for trace amounts for optimal plant growth and development, while in high concentrations, it exhibits toxic effects. Most plant species accumulate toxic trace metals primarily in their roots. Nevertheless, there is a group of plants that accumulate from 50 to as much as 500 times more of a given metal in their aboveground parts compared to the content in the substrate, and yet these plants are able to grow and thrive despite the high metal content in their shoots. Such plants are referred to as hyperaccumulators. Often, hyperaccumulators are found in metal-contaminated areas and can be used in phytoremediation. Despite the increasing number of known species capable of hyperaccumulation, there is still little knowledge about the mechanisms of this phenomenon.

This dissertation aimed to detect and compare the physiological characteristics of several different populations of *Arabidopsis arenosa* in natural sites and metal-contaminated habitats, as well as under controlled conditions under Zn or Cd treatment. In order to investigate the ability to accumulate trace metals and the effect on physiological parameters, the content of selected elements in leaves and roots was analyzed, and photosynthetic activity and pigment content in leaves were measured.

*Arabidopsis arenosa* is a species closely related to *A. halleri*, considered a model species in the study of mechanisms related to tolerance and accumulation of high Cd and Zn concentrations. However, *Arabidopsis arenosa* also shows high resistance to these metals. Previous studies have shown that *A. arenosa* accumulates metals mainly in the roots, transporting only a small portion of Cd and Zn from the roots to the shoots. Both of the species mentioned above can be observed on the same sites heavily contaminated with metals in southern Poland.

The chapter titled Eksperyment I covers field and laboratory research to characterise the ecophysiology of *Arabidopsis arenosa* growing in its natural environment. Chlorophyll *a* fluorescence and pigment content were measured at 14 sites scattered across Central Europe.

Then, in the laboratory, the total metal content and the content of bioavailable forms of metals were determined in collected soil samples. Moreover, in the collected plant material, the content of selected metals in shoots and roots and the level of ploidy were examined. The presented results clearly indicate that populations from metalliferous areas show features of Zn hyperaccumulation (found for 5 out of 6 populations M) and, less frequently, Cd hyperaccumulation (3 populations M). Moreover, hyperaccumulation of Zn and/or Cd was observed only for tetraploid populations.

The chapter titled Eksperyment II compares metal accumulation and tolerance abilities in 5 selected populations of *A. arenosa* grown under controlled conditions. Two diploid populations tested were from nonmetalliferous sites, and another 3 autotetraploid populations were from metalliferous sites. Photosynthetic activity, gas exchange parameters and leaf pigment contents were measured in plants treated with Cd or Zn. The content of selected elements in both leaves and roots was also investigated. It was shown that metal-induced damage to the photosynthetic apparatus in populations from metalliferous areas was significantly less compared to populations from nonmetalliferous sites.

The results obtained in the present dissertation shed new light on hyperaccumulation in *A. arenosa*. It should be noted that it was a significant achievement to present, for the first time, several tetraploid populations exhibiting Cd and Zn hyperaccumulation characteristics. On the one hand, differences in physiological parameters between the populations studied were noted; on the other hand, harsh environmental conditions caused a similar physiological response, such as high metal pollution. All these features suggest that *A. arenosa*, especially as a new hyperaccumulator of Cd and Zn and a model of autoployploidization, can be considered a fascinating object of research, especially when studying the mechanisms of accumulation and tolerance of toxic trace metals in plants.

## 8. Bibliografia

- Ahmadi, H., Corso, M., Weber, M., Verbruggen, N., Clemens, S., 2018. CAX1 suppresses Cd-induced generation of reactive oxygen species in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 41, 2435–2448. <https://doi.org/10.1111/pce.13362>
- Al-Shehbaz, I.A., O’Kane, S.L., 2002. Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae), in: Somerville, C.R., Meyerowitz, E.M. (Eds.), *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Assunção, A.G.L., Herrero, E., Lin, Y.-F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Eldik, M. van, Fiers, M., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2010. *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *PNAS* 107, 10296–10301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004788107>
- Bączek-Kwinta, R., Juzoń, K., Borek, M., Antonkiewicz, J., 2019. Photosynthetic response of cabbage in cadmium-spiked soil. *Photosynthetica* 57, 731–739. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.070>
- Baduel, P., Arnold, B., Weisman, C.M., Hunter, B., Bomblies, K., 2016. Habitat-Associated Life History and Stress-Tolerance Variation in *Arabidopsis arenosa*. *Plant Physiol.* 171, 437–451. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01875>
- Baek, S.A., Han, T.J., Ahn, S.K., Kang, H.R., Cho, M.R., Lee, S.C., Im, K.H., 2012. Effects of Heavy Metals on Plant Growths and Pigment Contents in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Pathol. J.*
- Baker, A.J.M., 2000. Metal hyperaccumulator plants : A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* 85–107.
- Balafrej, H., Bogusz, D., Triqui, Z.-E.A., Guedira, A., Bendaou, N., Smouni, A., Fahr, M., 2020. Zinc Hyperaccumulation in Plants: A Review. *Plants* 9, 562. <https://doi.org/10.3390/plants9050562>
- Baliardini, C., Meyer, C.-L., Salis, P., Saumitou-Laprade, P., Verbruggen, N., 2015. CATION EXCHANGER1 Cosegregates with Cadmium Tolerance in the Metal Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and Plays a Role in Limiting Oxidative Stress in *Arabidopsis* Spp. *Plant Physiol.* 169, 549–559. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01037>

- Banásová, V., Ďurišová, E., Nadubinská, M., Gurinová, E., Čiamporová, M., 2012. Natural Vegetation, Metal Accumulation and Tolerance in Plants Growing on Heavy Metal Rich Soils, in: Kothe, E., Varma, A. (Eds.), *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*, Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 233–250. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23327-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23327-2_12)
- Bayçu, G., Gevrek-Kürüm, N., Moustaka, J., Csatári, I., Rognes, S.E., Moustakas, M., 2017. Cadmium-zinc accumulation and photosystem II responses of *Noccaea caerulescens* to Cd and Zn exposure. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 2840–2850. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8048-4>
- Bayçu, G., Moustaka, J., Gevrek, N., Moustakas, M., 2018. Chlorophyll Fluorescence Imaging Analysis for Elucidating the Mechanism of Photosystem II Acclimation to Cadmium Exposure in the Hyperaccumulating Plant *Noccaea caerulescens*. *Materials* 11, 2580. <https://doi.org/10.3390/ma11122580>
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., Krämer, U., 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* 37, 251–268. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01959.x>
- Bento, M., Tomás, D., Viegas, W., Silva, M., 2015. Unravelling genome dynamics in *Arabidopsis* synthetic auto and allopolyploid species. *Biol Plant* 59, 661–670. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0536-8>
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., Laguérie, P.D., Petit, D., 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* 155, 47–57. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00432.x>
- Borymski, S., Cycoń, M., Beckmann, M., Mur, L.A.J., Piotrowska-Seget, Z., 2018. Plant Species and Heavy Metals Affect Biodiversity of Microbial Communities Associated With Metal-Tolerant Plants in Metalliferous Soils. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01425>
- Bothe, H., Słomka, A., 2017. Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology* 219, 45–61. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.014>
- Brooks, R.R., 1998. *Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*. Wallingford (United Kingdom) CAB International.



- 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.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Viterbo, A., Willmitzer, L., 2013. Trichoderma-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLOS Pathogens* 9, e1003221. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003221>
- Bury, M., Rusinowski, S., Sitko, K., Krzyżak, J., Kitzak, T., Możdżer, E., Siwek, H., Włodarczyk, M., Zieleźnik-Rusinowska, P., Szada-Borzyszkowska, A., Pogrzeba, M., 2021. Physiological status and biomass yield of *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby cultivated on two distinct marginal lands in Southern and Northern Poland. *Ind Crops Prod* 167, 113502. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113502>
- Clauss, M.J., Koch, M.A., 2006. Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 11, 449–459.
- Corso, M., Schwartzman, M.S., Guzzo, F., Souard, F., Małkowski, E., Hanikenne, M., Verbruggen, N., 2018. Contrasting cadmium resistance strategies in two metalcolous populations of *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.* 218, 283–297. <https://doi.org/10.1111/nph.14948>
- Corso, M., Vannozzi, A., Maza, E., Vitulo, N., Meggio, F., Pitacco, A., Telatin, A., D'Angelo, M., Feltrin, E., Negri, A.S., Prinsi, B., Valle, G., Ramina, A., Bouzayen, M., Bonghi, C., Lucchin, M., 2015. Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 5739–5752. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv274>
- Craciun, A.R., Meyer, C.-L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P., Verbruggen, N., 2012. Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *Journal of Experimental Botany* 63, 4179–4189. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers104>
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., Mari, S., 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* 103, 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>
- del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., 2015. Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 66, 6991–7003. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv432>

- Domka, A., Rozpądek, P., Ważny, R., Turnau, K., 2019. *Mucor* sp.—An endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites. *J. Basic Microbiol.* 59, 24–37. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800406>
- Fasani, E., DalCorso, G., Varotto, C., Li, M., Visioli, G., Mattarozzi, M., Furini, A., 2017. The MTP1 promoters from *Arabidopsis halleri* reveal cis-regulating elements for the evolution of metal tolerance. *New Phytol.* 214, 1614–1630. <https://doi.org/10.1111/nph.14529>
- 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, 34–40.
- Gieroń, Ż., Sitko, K., Małkowski, E., 2021a. The Different Faces of *Arabidopsis arenosa*—A Plant Species for a Special Purpose. *Plants* 10, 1342. <https://doi.org/10.3390/plants10071342>
- Gieroń, Ż., Sitko, K., Zieleźnik-Rusinowska, P., Szopiński, M., Rojek-Jelonek, M., Rostański, A., Rudnicka, M., Małkowski, E., 2021b. Ecophysiology of *Arabidopsis arenosa*, a new hyperaccumulator of Cd and Zn. *J. Hazard. Mater.* 412, 125052. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125052>
- Gupta, N., Ram, H., Kumar, B., 2016. Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Rev. Environ. Sci. Bio Technol.* 15, 89–109.
- Halimaa, P., Lin, Y.-F., Ahonen, V.H., Blande, D., Clemens, S., Gyenesei, A., Häikiö, E., Kärenlampi, S.O., Laiho, A., Aarts, M.G.M., Pursiheimo, J.-P., Schat, H., Schmidt, H., Tuomainen, M.H., Tervahauta, A.I., 2014. Gene Expression Differences between *Noccaea caerulescens* Ecotypes Help to Identify Candidate Genes for Metal Phytoremediation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3344–3353. <https://doi.org/10.1021/es4042995>
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., Krämer, U., 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453, 391–395. <https://doi.org/10.1038/nature06877>
- Hassan, Z., Aarts, M.G.M., 2011. Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany, Metal(loid) tolerance in plants and lichens* 72, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.003>

- Higgins, J.D., Wright, K.M., Bomblies, K., Franklin, C., 2014. Cytological techniques to analyze meiosis in *Arabidopsis arenosa* for investigating adaptation to polyploidy. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00546>
- Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R.T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R.J., Schulze-Lefert, P., 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165, 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>
- Hollister, J.D., 2015. Polyploidy: adaptation to the genomic environment. *New Phytol.* 205, 1034–1039. <https://doi.org/10.1111/nph.12939>
- Hollister, J.D., Arnold, B.J., Svedin, E., Xue, K.S., Dilkes, B.P., Bomblies, K., 2012. Genetic Adaptation Associated with Genome-Doubling in Autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genet* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003093>
- Huang, X., Duan, S., Wu, Q., Yu, M., Shabala, S., 2020. Reducing Cadmium Accumulation in Plants: Structure–Function Relations and Tissue-Specific Operation of Transporters in the Spotlight. *Plants* 9, 223. <https://doi.org/10.3390/plants9020223>
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*, 4th ed. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Kalaji, H.M., Rastogi, A., Živčák, M., Brestic, M., Daszkowska-Golec, A., Sitko, K., Alsharafa, K.Y., Lotfi, R., Stypiński, P., Samborska, I.A., Cetner, M.D., 2018. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. *Photosynthetica* 56, 953–961. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0766-z>
- Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N.I., Ferroni, L., Guidi, L., Hogewoning, S.W., Jajoo, A., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Poli, D., Pollastrini, M., Romanowska-Duda, Z.B., Rutkowska, B., Serôdio, J., Suresh, K., Szulc, W., Tambussi, E., Yannicari, M., Zivcak, M., 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res* 122, 121–158. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>
- Kalaji, M.H., Łoboda, T., 2009. *Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin*. Wydawnictwo SGGW.

- Kofidis, G., Bosabalidis, A.M., Moustakas, M., 2007. Combined effects of altitude and season on leaf characteristics of *Clinopodium vulgare* L. (Labiatae). *Environmental and Experimental Botany* 60, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.007>
- Kolář, F., Lučanová, M., Závěská, E., Fuxová, G., Mandáková, T., Španiel, S., Senko, D., Svitok, M., Kolník, M., Gudžinskas, Z., Marhold, K., 2016. Ecological segregation does not drive the intricate parapatric distribution of diploid and tetraploid cytotypes of the *Arabidopsis arenosa* group (Brassicaceae). *Biol J Linn Soc* 119, 673–688. <https://doi.org/10.1111/bij.12479>
- Krämer, U., 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Krämer, U., Talke, I.N., Hanikenne, M., 2007. Transition metal transport. *FEBS Lett, Plant Transporters and Channels* 581, 2263–2272. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.010>
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A., Trtílek, M., 2019. Analysis of OJIP Chlorophyll Fluorescence Kinetics and QA Reoxidation Kinetics by Direct Fast Imaging. *Plant Physiol.* 179, 369–381. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00953>
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M., Šetlík, I., 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 175, 655–674. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x>
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., Thomine, S., 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal* 24, 4041–4051. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600864>
- Li, T., Liu, M.J., Zhang, X.T., Zhang, H.B., Sha, T., Zhao, Z.W., 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of The Total Environment* 409, 1069–1074. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.012>
- Li, T., Yang, X., Lu, L., Islam, E., He, Z., 2009. Effects of zinc and cadmium interactions on root morphology and metal translocation in a hyperaccumulating species under hydroponic conditions. *J. Hazard. Mater.* 169, 734–741. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.004>

- Liu, H., Zhao, H., Wu, L., Liu, A., Zhao, F.-J., Xu, W., 2017. Heavy metal ATPase 3 (HMA3) confers cadmium hypertolerance on the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *New Phytol.* 215, 687–698. <https://doi.org/10.1111/nph.14622>
- Lloyd, A., Bomblies, K., 2016. Meiosis in autopolyploid and allopolyploid *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology, SI: 30: Genome studies and molecular genetics* 30, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.02.004>
- Macnair, M.R., 2003. The hyperaccumulation of metals by plants, in: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp. 63–105. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)40002-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40002-6)
- Małkowski, E., Sitko, K., Szopiński, M., Gieroń, Ż., Pogrzeba, M., Kalaji, H.M., Zieleźnik-Rusinowska, P., 2020. Hormesis in Plants: The Role of Oxidative Stress, Auxins and Photosynthesis in Corn Treated with Cd or Pb. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2099. <https://doi.org/10.3390/ijms21062099>
- Merlot, S., Garcia de la Torre, V.S., Hanikenne, M., 2021. Physiology and Molecular Biology of Trace Element Hyperaccumulation, in: van der Ent, A., Baker, A.J.M., Echevarria, G., Simonnot, M.-O., Morel, J.L. (Eds.), *Agromining: Farming for Metals: Extracting Unconventional Resources Using Plants*, Mineral Resource Reviews. Springer International Publishing, Cham, pp. 155–181. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-58904-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-58904-2_8)
- Meyer, C.-L., 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 Phytologist* 185, 130–142. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03062.x>
- Meyer, C.-L., Verbruggen, N., 2012. The use of the model species *Arabidopsis halleri* towards phytoextraction of cadmium polluted soils. *New Biotechnology, Frontiers and Challenges in the Bioremediation of Contaminated Sites* 30, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.07.009>
- Milner, M.J., Kochian, L.V., 2008. Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany* 102, 3–13. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn063>
- Mishra, S., Mishra, A., Küpper, H., 2017. Protein Biochemistry and Expression Regulation of Cadmium/Zinc Pumping ATPases in the Hyperaccumulator Plants *Arabidopsis halleri* and *Noccaea caerulescens*. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00835>

- Monnahan, P., Kolář, F., Baduel, P., Sailer, C., Koch, J., Horvath, R., Laenen, B., Schmickl, R., Paajanen, P., Šrámková, G., Bohutínská, M., Arnold, B., Weisman, C.M., Marhold, K., Slotte, T., Bomblies, K., Yant, L., 2019. Pervasive population genomic consequences of genome duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 457–468. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0807-4>
- Morina, F., Küpper, H., 2020. Direct inhibition of photosynthesis by Cd dominates over inhibition caused by micronutrient deficiency in the Cd/Zn hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology and Biochemistry* 155, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.018>
- Mortel, J.E. van de, Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Themaat, E.V.L. van, Koornneef, M., Aarts, M.G.M., 2006. Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 142, 1127–1147. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082073>
- Muszyńska, E., Labudda, M., Róžańska, E., Hanus-Fajerska, E., Znojek, E., 2018. Heavy metal tolerance in contrasting ecotypes of *Alyssum montanum*. *EES* 161, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.075>
- Muszyńska, E., Tokarz, K.M., Dziurka, M., Labudda, M., Dziurka, K., Tokarz, B., 2021. Photosynthetic apparatus efficiency, phenolic acid profiling and pattern of chosen phytohormones in pseudometallophyte *Alyssum montanum*. *Sci. Rep* 11, 4135. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83695-y>
- Nadgórska-Socha, A., Kandziora-Ciupa, M., Ciepał, R., 2015. Element accumulation, distribution, and phytoremediation potential in selected metallophytes growing in a contaminated area. *Environ Monit Assess* 187, 441. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4680-6>
- Nadgórska-Socha, A., Ptasíński, B., Kita, A., 2013. Heavy metal bioaccumulation and antioxidative responses in *Cardaminopsis arenosa* and *Plantago lanceolata* leaves from metalliferous and non-metalliferous sites: a field study. *Ecotoxicology* 22, 1422–1434. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1129-y>
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A.J., Tohge, T., Yamazaki, M., Saito, K., 2014. Enhancement of oxidative and drought tolerance in

- Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.* 77, 367–379.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12388>
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C., 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol.* 186, 5–17. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03142.x>
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., Goltsev, V., 2018. Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 787.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
- Pawłowska, T.E., Błaszczowski, J., Rühling, Å., 1997. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* 6, 499–505.  
<https://doi.org/10.1007/s005720050154>
- Peer, W.A., Mahmoudian, M., Freeman, J.L., Lahner, B., Richards, E.L., Reeves, R.D., Murphy, A.S., Salt, D.E., 2006. Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytol.* 172, 248–260. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01820.x>
- Pellissier, L., Roger, A., Bilat, J., Rasmann, S., 2014. High elevation *Plantago lanceolata* plants are less resistant to herbivory than their low elevation conspecifics: is it just temperature? *Ecography* 37, 950–959. <https://doi.org/10.1111/ecog.00833>
- Peng, J.-S., Wang, Y.-J., Ding, G., Ma, H.-L., Zhang, Y.-J., Gong, J.-M., 2017. A Pivotal Role of Cell Wall in Cadmium Accumulation in the Crassulaceae hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Mol Plant* 10, 771–774.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.007>
- Pogrzeba, M., Rusinowski, S., Sitko, K., Krzyżak, J., Skalska, A., Małkowski, E., Ciszek, D., Werle, S., McCalmont, J.P., Mos, M., Kalaji, H.M., 2017. Relationships between soil parameters and physiological status of *Miscanthus x giganteus* cultivated on soil contaminated with trace elements under NPK fertilisation vs. microbial inoculation. *Environ. Pollut.* 225, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.058>
- Pollard, A.J., Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2014. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* 217–218, 8–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.011>
- Preite, V., Sailer, C., Syllwasschy, L., Bray, S., Ahmadi, H., Krämer, U., Yant, L., 2019. Convergent evolution in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* on calamine

- metalliferous soils. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 374, 20180243.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0243>
- Przedpeńska, E., Wierzbicka, 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9359-5>
- Ramsey, J., Schemske, D.W., 2002. Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 33, 589–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437>
- Rascio, N., 1977. Metal Accumulation by Some Plants Growing on Zinc-Mine Deposits. *Oikos* 29, 250–253. <https://doi.org/10.2307/3543610>
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180, 169–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Jaffré, T., Erskine, P.D., Echevarria, G., Ent, A. van der, 2018. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytol.* 218, 407–411. <https://doi.org/10.1111/nph.14907>
- Regvar, M., Vogel, K., Irgel, N., Wraber, T., Hildebrandt, U., Wilde, P., Bothe, H., 2003. Colonization of pennycresses (*Thlaspi* spp.) of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* 160, 615–626.  
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00988>
- Rozpądek, P., Domka, A.M., Nosek, M., Ważny, R., Jędrzejczyk, R.J., Wiciarz, M., Turnau, K., 2018. The Role of Strigolactone in the Cross-Talk Between *Arabidopsis thaliana* and the Endophytic Fungus *Mucor* sp. *Front. Microbiol.* 9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00441>
- Rozpądek, P., Wężowicz, K., Stojakowska, A., Malarz, J., Surówka, E., Sobczyk, Ł., Anielska, T., Ważny, R., Miszański, Z., Turnau, K., 2014. Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) under metal toxicity. *Chemosphere* 112, 217–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.023>
- Rusinowski, S., Krzyżak, J., Clifton-Brown, J., Jensen, E., Mos, M., Webster, R., Sitko, K., Pogrzeba, M., 2019a. New *Miscanthus* hybrids cultivated at a Polish metal-contaminated site demonstrate high stomatal regulation and reduced shoot Pb and Cd concentrations. *Environ. Pollut.* 252, 1377–1387.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.062>



- Rusinowski, S., Szada-Borzyszkowska, A., Zieleźnik-Rusinowska, P., Małkowski, E., Krzyżak, J., Woźniak, G., Sitko, K., Szopiński, M., McCalmont, J.P., Kalaji, H.M., Pogrzeba, M., 2019b. How autochthonous microorganisms influence physiological status of *Zea mays* L. cultivated on heavy metal contaminated soils? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4746–4763. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3923-9>
- Šamec, D., Linić, I., Salopek-Sondi, B., 2021. Salinity Stress as an Elicitor for Phytochemicals and Minerals Accumulation in Selected Leafy Vegetables of Brassicaceae. *Agronomy* 11, 361. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020361>
- Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J., 2006. Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757, 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.019>
- Schmickl, R., Paule, J., Klein, J., Marhold, K., Koch, M.A., 2012. The Evolutionary History of the *Arabidopsis arenosa* Complex: Diverse Tetraploids Mask the Western Carpathian Center of Species and Genetic Diversity. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042691>
- Schvartzman, M.S., Corso, M., Fataftah, N., Scheepers, M., Nouet, C., Bosman, B., Carnol, M., Motte, P., Verbruggen, N., Hanikenne, M., 2018. Adaptation to high zinc depends on distinct mechanisms in metallicolous populations of *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.* 218, 269–282. <https://doi.org/10.1111/nph.14949>
- Sebastian, A., Prasad, M.N.V., 2015. Iron- and manganese-assisted cadmium tolerance in *Oryza sativa* L.: lowering of rhizotoxicity next to functional photosynthesis. *Planta* 241, 1519–1528. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2276-6>
- Shahzad, Z., Gosti, F., Frérot, H., Lacombe, E., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P., Berthomieu, P., 2010. The Five AhMTP1 Zinc Transporters Undergo Different Evolutionary Fates towards Adaptive Evolution to Zinc Tolerance in *Arabidopsis halleri*. *PLOS Genetics* 6, e1000911. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000911>
- Sitko, K., Gieroń, Ż., Szopiński, M., Zieleźnik-Rusinowska, P., Rusinowski, S., Pogrzeba, M., Daszkowska-Golec, A., Kalaji, H.M., Małkowski, E., 2019. Influence of short-term macronutrient deprivation in maize on photosynthetic characteristics, transpiration and pigment content. *Scientific Reports* 9, 14181. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50579-1>

- Sitko, K., Rusinowski, S., Kalaji, H.M., Szopiński, M., Małkowski, E., 2017. Photosynthetic Efficiency as Bioindicator of Environmental Pressure in *A. halleri*. *Plant Physiol.* 175, 290–302. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00212>
- Stein, R.J., Höreth, S., Melo, J.R.F. de, Syllwasschy, L., Lee, G., Garbin, M.L., Clemens, S., Krämer, U., 2017. Relationships between soil and leaf mineral composition are element-specific, environment-dependent and geographically structured in the emerging model *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.* 213, 1274–1286. <https://doi.org/10.1111/nph.14219>
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient, in: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 321–362. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12)
- Szarek-Łukaszewska, G., Grodzińska, K., 2011. Grasslands of a Zn-Pb post-mining area (Olkusz ore-bearing region, S. Poland). *Pol. Bot. J* 56, 245–260.
- Szarek-Łukaszewska, G., Grodzinska, K., 2007. Vegetation of a post-mining open pit (Zn/Pb ores): three-year study of colonization. *Pol J Ecol* 55, 261–282.
- Szarek-Łukaszewska, G., Niklińska, M., 2002. Concentration of alkaline and heavy metals in *Biscutella laevigata* L. and *Plantago lanceolata* L. growing on calamine spoils (S. Poland). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 44, 29–38.
- Szopiński, M., Sitko, K., Gieroń, Ż., Rusinowski, S., Corso, M., Hermans, C., Verbruggen, N., Małkowski, E., 2019. Toxic Effects of Cd and Zn on the Photosynthetic Apparatus of the *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* Pseudo-Metallophytes. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00748>
- Szopiński, M., Sitko, K., Rusinowski, S., Zieleźnik-Rusinowska, P., Corso, M., Rostański, A., Rojek-Jelonek, M., Verbruggen, N., Małkowski, E., 2020. Different strategies of Cd tolerance and accumulation in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa*. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.13883>
- Talke, I.N., Hanikenne, M., Krämer, U., 2006. Zinc-Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional Deregulation, and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* 142, 148–167. <https://doi.org/10.1104/pp.105.076232>

- Turisová, I., Štrba, T., Aschenbrenner, Š., Andráš, P., 2013. *Arabidopsis arenosa* (L.) Law. On Metalliferous and Non-metalliferous Sites in Central Slovakia. *Bull Environ Contam Toxicol* 91, 469–474. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1074-8>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181, 759–776. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x>
- Watanabe, K., Pacher, M., Dukowic, S., Schubert, V., Puchta, H., Schubert, I., 2009. The STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 Complex Promotes Sister Chromatid Alignment and Homologous Recombination after DNA Damage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 2688–2699. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060525>
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. v, Clemens, S., 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* 37, 269–281. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01960.x>
- Wierzbicka, M., Rostański, A., 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol. Cracov.* 44, 7–19.
- Wójcik, M., Gonnelli, C., Selvi, F., Dresler, S., Rostański, A., Vangronsveld, J., 2017. Chapter One - Metallophytes of Serpentine and Calamine Soils – Their Unique Ecophysiology and Potential for Phytoremediation, in: Cuypers, A., Vangronsveld, J. (Eds.), *Advances in Botanical Research, Phytoremediation*. Academic Press, pp. 1–42. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.002>
- Yant, L., Hollister, J.D., Wright, K.M., Arnold, B.J., Higgins, J.D., Franklin, F.C.H., Bomblies, K., 2013. Meiotic adaptation to genome duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Curr. Biol.* 23, 2151–2156. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.059>
- Zhang, J., Zhang, M., Shohag, M.J.I., Tian, S., Song, H., Feng, Y., Yang, X., 2016. Enhanced expression of SaHMA3 plays critical roles in Cd hyperaccumulation and hypertolerance in Cd hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Planta* 243, 577–589.
- Zhang, M., Senoura, T., Yang, X., Nishizawa, N.K., 2011. Functional analysis of metal tolerance proteins isolated from Zn/Cd hyperaccumulating ecotype and non-

- hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* Hance. *FEBS Letters* 585, 2604–2609.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.013>
- Zhang, Z., Yu, Q., Du, H., Ai, W., Yao, X., Mendoza-Cózatl, D.G., Qiu, B., 2016. Enhanced cadmium efflux and root-to-shoot translocation are conserved in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* (Crassulaceae family). *FEBS Lett* 590, 1757–1764.  
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12225>
- Zhao, F.J., Lombi, E., Brendon, T., M, S.P., 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ* 23, 507–514.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00569.x>
- Zhao, H., Wang, L., Zhao, F.-J., Wu, L., Liu, A., Xu, W., 2019. SpHMA1 is a chloroplast cadmium exporter protecting photochemical reactions in the Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Plant Cell Environ* 42, 1112–1124.  
<https://doi.org/10.1111/pce.13456>