

STRESZCZENIE

Zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi jest wciąż wysokie, jako efekt naturalnych procesów oraz działalności człowieka. Obecność metali toksycznych, takich jak Cd lub bardzo wysoka zawartość mikroelementów, takich jak Zn, stanowią poważne zagrożenie dla środowiska. Rośliny pobierają metale z gleby i akumulują je w swoich tkankach, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi spożywających rośliny, zawierające wysokie stężenia tych metali. Dlatego istnieje potrzeba opracowania nowych i skutecznych technik usuwania metali ciężkich ze środowiska lub ograniczania ich negatywnego wpływu na organizmy żywe.

Celem projektu było pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów związanych z pobieraniem i akumulacją metali przez rośliny oraz odpornością na ich toksyczne działanie. Hyperakumulatory metali ciężkich to rośliny, które mogą żyć na glebach silnie zanieczyszczonych przez metale i posiadają zdolność do akumulacji niezwykle wysokich stężeń tych metali w tkankach nadziemnych. *Arabidopsis halleri* wykorzystywane jest jako gatunek modelowy do badania mechanizmów związanych z tolerancją i akumulacją wysokich stężeń metali. Gatunek ten charakteryzuje się wysoką odpornością na duże stężenia Cd i Zn i jest zdolny do hyperakumulacji Zn w pędach, a także Cd w przypadku niektórych populacji. *Arabidopsis arenosa*, gatunek blisko spokrewniony z *A. halleri*, również wykazuje wysoką odporność na oba metale. Wcześniejsze badania wykazały, że *A. arenosa* akumuluje metale głównie w korzeniach, transportując jedynie niewielką część Cd i Zn z korzeni do pędów. W południowej Polsce oba gatunki można zaobserwować na tych samych stanowiskach silnie zanieczyszczonych metalami. Eksperymenty miały na celu zbadanie między- i wewnątrzgatunkowej zmienności pomiędzy populacjami *A. halleri* i *A. arenosa* z terenów czystych oraz zanieczyszczonych metalami, w celu zidentyfikowania parametrów fizjologicznych i genów odpowiedzialnych za różnice w ich adaptacji do toksycznych stężeń metali. Aby odpowiedzieć na postawione pytania badawcze, pracę podzielono na trzy etapy, stanowiące odrębne rozdziały.

Pierwszy rozdział obejmuje badania terenowe oraz eksperymenty laboratoryjne. W celu określenia różnic fizjologicznych w ich naturalnym środowisku oraz przy traktowaniu różnymi stężeniami Cd w hydroponice, przebadano po jednej populację z terenów czystych oraz po jednej z terenów zanieczyszczonych metalami, zarówno dla *A. halleri* jak i *A. arenosa*. Przeanalizowano całkowitą zawartość metali w glebie oraz biodostępne frakcje Cd, Pb i Zn. Zawartość tych pierwiastków oznaczono również w korzeniach i liściach wszystkich badanych populacji. Ponadto porównano aktywność aparatu fotosyntetycznego i zawartość barwników

we wszystkich czterech populacjach rosnących w ich naturalnym środowisku. Ploidalność każdej populacji została przeanalizowana w celu potwierdzenia, że badane populacje *A. halleri* są diploidalne, natomiast *A. arenosa* tetraploidalne. Dzięki temu możliwe było wykluczenie wymiany materiału genetycznego między dwoma gatunkami rosnącymi na tym samym stanowisku. W warunkach hydroponicznych rośliny poddano działaniu 50, 100 i 200 μM Cd przez 24 dni. Następnie przeprowadzono taką samą analizę jak *in situ*. Po raz pierwszy przeanalizowano skład mineralny *A. arenosa* w połączeniu z analizą aktywności aparatu fotosyntetycznego zarówno w warunkach terenowych, jak i laboratoryjnych. Moje wyniki pokazują, że populacja *A. arenosa* z terenu zanieczyszczonego metalami jest tak samo tolerancyjna na metale ciężkie, jak hyperakumulująca populacja *A. halleri* z tego samego stanowiska. Ponadto moje wyniki wykazały, że populacja *A. arenosa* z terenu zanieczyszczonego metalami hyperakumuluje Cd i Zn.

Drugi rozdział przedstawia analizę odpowiedzi fizjologicznej populacji *A. halleri* i *A. arenosa* ze stanowiska zanieczyszczonego metalami, traktowanych wysokim stężeniem Cd (1.0 mM) lub Zn (5.0 mM). Różnice w akumulacji Cd i Zn, tolerancji, aktywności aparatu fotosyntetycznego i zmiany zawartości barwników zostały przeanalizowane po 7 dniach traktowania. Populacja *A. arenosa* akumulowała więcej Cd w porównaniu z populacją *A. halleri*, która akumulowała więcej Zn. Traktowanie wysokim stężeniem Cd i Zn potwierdziło bardzo wysoki poziom tolerancji populacji *A. arenosa* i *A. halleri* z terenu zanieczyszczonego na oba metale. Oba gatunki różniły się zmianami w aktywności aparatu fotosyntetycznego w odpowiedzi na Cd i Zn w wysokich stężeniach, co sugeruje różnice w mechanizmach homeostazy metali pomiędzy gatunkami.

Trzeci rozdział skupia się na ocenie korelacji pomiędzy odpowiedzią fizjologiczną i ekspresją genów w populacjach *A. halleri* i *A. arenosa* z terenów czystych, jak i zanieczyszczonych metalami. Rośliny traktowano 5 μM Cd lub 150 μM Zn przez 10 dni w kulturach hydroponicznych. Do analizy ekspresji genów w warunkach umiarkowanego stresu zarówno w hypertolerancyjnych, jak i wrażliwych populacjach wybrano niższe stężenia metali, niż w pierwszym eksperymencie. W trakcie badań określono wzrost roślin, poziom tolerancji na Cd i Zn, skład mineralny korzeni i liści oraz zawartość barwników w liściach. Ponadto zmierzono poziom ekspresji genów zaangażowanych w pobieranie, translokację lub detoksykację Cd i Zn oraz biosyntezę flawonoidów (*HMA2*, *HMA3*, *HMA4*, *MTP1*, *IRT1*, *IRT3*, *FRD3*, *FRO2*, *ZIF1*, *NRAMP3*, *NRAMP4*, *OPT3*, *NAS2*, *LDOX* i *F3H*). Zaobserwowano wyraźną różnicę w akumulacji Cd i Zn pomiędzy populacją *A. halleri* i *A. arenosa* z terenów zanieczyszczonych. Analiza poziomu ekspresji genów wykazała różnice nie tylko między

gatunkami, ale także między populacjami. Traktowanie Cd lub Zn miało również różny wpływ na wszystkie populacje w odniesieniu do niektórych genów.

Wyniki uzyskane w ramach tego projektu wypełniają lukę w charakterystyce fizjologicznej gatunku *A. halleri* zarówno w warunkach terenowych, jak i w kulturach hydroponicznych. Co więcej, dogłębna charakterystyka fizjologiczna populacji *A. arenosa* z terenu zanieczyszczonego pozwoliła na zidentyfikowanie go, jako nowego hyperakumulatora Cd i Zn. Hyperakumulująca populacja *A. arenosa* z terenów metalonośnych może zostać wykorzystana, jako nowy model do przyszłych badań nad zjawiskiem hyperakumulacji. Co więcej, zaobserwowane różnice w ekspresji genów zaangażowanych w pobieranie, translokację i detoksykację metali między *A. halleri* i *A. arenosa* sugeruje, że mechanizmy homeostazy metali u *A. arenosa* są różne od *A. halleri*, i dalsze badania z wykorzystaniem obu gatunków przyczynią się do lepszego zrozumienia tych mechanizmów.