

STRESZCZENIE

Rozprawa doktorska dotyczy tolerancji komórek roślinnych na metale ciężkie – ważnej i aktualnej problematyki związanej z postępującym zanieczyszczeniem środowiska metalami ciężkimi, czego skutkiem jest niszczenie siedlisk i spadek bioróżnorodności roślin. Znaczenie roślin o wysokiej tolerancji na metale ciężkie oraz znajomość mechanizmów tolerancji są kluczowe w procesie ochrony środowiska zanieczyszczonego metalami ciężkimi. Rośliny tolerancyjne mogą być doskonałym materiałem nie tylko do rekultywacji obszarów zdegradowanych przez przemysł wydobywczy bądź hutniczy, ale też do oczyszczania gleb z metali ciężkich (fitoremediacja).

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było ustalenie czy tolerancja na metale ciężkie jest cechą konstytutywną (wrodzoną) w rodzaju *Viola* L. Poziom tolerancji i reakcje komórek roślinnych na działanie cynku i ołowiu ustalono na modelu zawiesin komórkowych czterech gatunków z rodzaju *Viola*. Stopień tolerancji komórek mierzono za pomocą ich przeżywalności, akumulacji metali oraz zdolności komórek do podziałów i różnicowania się w tkanki i organy po dodaniu cynku i ołowiu do zawiesiny komórkowej. Rodzaj *Viola* jest bardzo dobrym modelem do badania tolerancji i adaptacji roślin do podwyższonych stężeń metali ciężkich w glebie, ponieważ obejmuje wiele gatunków metalolubnych (metalofity), występują też gatunki, które nie kolonizują terenów zanieczyszczonych (niemetalofity).

Do badań wybrane zostały gatunki posiadające różny poziom adaptacji względem metali ciężkich (Zn i Pb) w glebie, oszacowanej na podstawie miejsc ich występowania (tereny metalonośne vs niemetalonośne): *V. lutea* ssp. *westfalica* (metalofit obligatoryjny, występujący wyłącznie na terenach zanieczyszczonych), *V. tricolor* (metalofit fakultatywny, występujący na glebach zanieczyszczonych – genotyp MET oraz niezanieczyszczonych – genotyp NMET), *V. arvensis* (metalofit przygodny, sporadycznie zasiedlający tereny

zanieczyszczone) oraz *V. uliginosa* (gatunek nie występujący na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi).

W rozprawie doktorskiej postawione zostały następujące hipotezy badawcze: 1) gatunki z rodzaju *Viola* wykazują podwyższoną tolerancję na cynk i ołów; 2) komórki wybranych gatunków akumulują cynk i ołów; 3) metale ciężkie są odkładane w komórce głównie w ścianie komórkowej i wakuoli jako mechanizm detoksykacji; 4) komórki przeżywające traktowanie wysokimi stężeniami metali ciężkich są zdolne do podziałów, różnicowania się i regeneracji roślin o wyższej tolerancji na metale ciężkie niż roślina wyjściowa; 5) obumieranie komórek w zawieszynie pod wpływem działania metali ciężkich jest wynikiem programowanej śmierci komórki (PCD); 6) specyficzne enzymy podobne do kaspaz biorą udział w inicjacji PCD wywołanej metalami ciężkimi.

Dla wszystkich badanych gatunków/genotypów ustalono stopień przeżywalności komórek i akumulację metali; zdolność komórek, po działaniu cynku lub ołowiu, do podziałów, różnicowania i regeneracji roślin na modelu *V. arvensis*; lokalizacja metali w komórce oraz mechanizm śmierci komórek na modelu *V. tricolor* NMET.

Zawiesina komórkowa wybranych gatunków została uzyskana z kalusa zaindukowanego z fragmentów liści na stałej pożywce MS z dodatkiem 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP. Zawiesiny komórkowe były traktowane oddzielnie solami cynku ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) i ołowiu ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) w stężeniach: $200 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$, $2000 \mu\text{M}$ oraz $0 \mu\text{M}$ jako kontrola. Żywotność komórek została ustalona z wykorzystaniem testu alamarBlue po 24, 48 i 72 godz. traktowania metalami. Wyniki testów żywotności potwierdziły wysoką tolerancję na Zn i Pb zarówno metalofitów jak i niemetalofita. Zawartość metali w biomacie żywych komórek została ustalona z wykorzystaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po traktowaniu zawiesiny komórkowej Zn lub Pb w stężeniu $2000 \mu\text{M}$ przez 72 godz. Wybrane gatunki/genotypy wykazywały zdolności hiperakumulacyjne w stosunku do metali,

akumulując oba pierwiastki w stężeniu wyższym niż dodawane do medium. Odkładanie metali w strukturach komórkowych zostało ustalone na modelu *V. tricolor* NMET za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) z mikroanalizą rentgenowską po 72 godz. traktowania Zn lub Pb w stężeniu 2000 μ M. Metale były odkładane głównie w wakuoli i ścianie komórkowej, strukturach niewrażliwych na działanie metali ciężkich. Komórki przeżywające najwyższe stężenia, po 72 godz. zostały wyłożone na pożywki stałe, ulegały podziałom i proliferacji. Z komórek *V. arvensis* zaindukowano powstawanie pędów przybyszowych, które następnie ukorzeniono. Zregenerowane rośliny zostały zaaklimatyzowane, doprowadzone do kwitnienia i owocowania. Komórki regenerantów *V. arvensis* wykazywały wyższą (o ~12%) tolerancję na Pb niż komórki rośliny wyjściowej, ustaloną na podstawie analizy żywotności komórek po traktowaniu metalami, co pośrednio pozwoliło stwierdzić, że regeneranty wyprowadzone z komórek traktowanych ołowiem mają podwyższoną, w stosunku do roślin wyjściowych, tolerancję na ten metal. Wysoka frekwencja (6.8–19.6%, 21.8–30.1%, Zn i Pb odpowiednio) komórek ulegających programowanej śmierci po działaniu metalami została oszacowana z wykorzystaniem testu TUNEL na modelu *V. tricolor* NMET. Mechanizm śmierci komórek został zidentyfikowany na podstawie analizy Western blot i Ligand blotting z wykorzystaniem inhibitorów enzymów podobnych do kaspaz. Analizy wykazały, że proteazy cysteinowe podobne do papainy (PLCPs) indukują programowaną śmierć komórki na skutek działania cynkiem i ołowiem.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej pozwoliły na zdefiniowanie roli pojedynczej komórki w mechanizmie tolerancji roślin, sprawdzenie zdolności komórek poddanych ekstremalnemu stresowi abiotycznemu do podjęcia podziałów i regeneracji roślin oraz na wykrycie mechanizmów biorących udział w śmierci komórek w odpowiedzi na stres wywołany metalami ciężkimi. Komórki badanych taksonów charakteryzowała tolerancja na wysokie stężenia metali w medium oraz zdolność do ich hiperakumulacji, co pozwala

wnioskować o konstytutywnej (wrodzonej) tolerancji na cynk i ołów wybranych do badań gatunków/genotypów. Kultury zawieszinowe komórek okazały się być doskonałym modelem do badania mechanizmów tolerancji roślin. Uzyskane wyniki są ważnym, nowym osiągnięciem i stanowią podstawę do dalszych badań w zakresie rekultywacji/fitoremediacji gleb z wykorzystaniem wyselekcjonowanych genotypów o podwyższonej tolerancji na metale ciężkie.

Sydzko Klemek

Akceptuję streszczenie
Ej
Kute

KRAKÓW, 16.04.2020r.

ABSTRACT

The doctoral dissertation concerns tolerance of plant cells to heavy metals – important and current problem related to the progressive pollution of the environment with heavy metals, leading to the destruction of plant habitats and to the reduction of the biodiversity. The importance of plants with high tolerance to heavy metals, knowledge of tolerance mechanisms are crucial for environmental protection of areas polluted with heavy metals. Tolerant plants can be an excellent material not only for the recultivation of areas degraded by the metallurgy and mining industry but also for the cleaning up of heavy metal polluted soils (phytoremediation).

The main objective of the doctoral dissertation was to determine whether tolerance to heavy metals is a constitutive (innate) character in *Viola* L. genus. The level of tolerance and respond of plant cells to zinc and lead were determined on the cell suspension model of five *Viola* species. The tolerance level was determined by the degree of cell survivability (frequency of viable cells), heavy metal accumulation and cells ability to divide and differentiation after heavy metal addition to the cell suspension cultures. *Viola* is a good model for study plant tolerance and adaptation mechanisms to heavy metal polluted soils, due to enclosing many species which are metallophytes (adapted to growth at polluted with heavy metal sites), but also plants not colonizing metalliferous soils (nonmetallophytes).

Species representing different metallophyte status (from metalliferous and nonmetalliferous soils), were chosen for the studies: *V. lutea* ssp. *westfalica* (obligate metallophyte, exclusively occurring on metalliferous soils); *V. tricolor* (facultative metallophyte with two genotypes: metallicolous – MET and nonmetallicolous – NMET); *V. arvensis* (accidental metallophyte, spontaneously inhabiting polluted areas) and *V. uliginosa* (nonmetallophyte).

In the PhD dissertation the following research hypotheses were established: 1) *Viola* species have enhanced tolerance to zinc and lead; 2) cells of all selected species/genotypes accumulate zinc and lead; 3) heavy metals in cells are deposited mainly in cell wall and vacuoles as detoxification mechanism; 4) heavy metal cell survivors are able to divide, differentiate and to regenerate into plants with enhanced tolerance level to Zn and Pb than the initial plant; 5) cell death after heavy metal treatments is a result of programmed cell death (PCD); 6) the specific caspase-like enzymes play a role in PCD induced by heavy metals.

Cell survival and metal accumulation were determined for all studied species/genotypes; the ability of cells, after treatment with zinc or lead, to divide, differentiate and regenerate plants was determined on the *V. arvensis* model; metal distribution in cell structures and the mechanism of cell death were determined on the *V. tricolor* NMET model.

Cell suspension cultures of selected species/genotypes were obtained from callus tissue induced from leaves fragments on MS medium supplemented with 2 mgL^{-1} 2,4-D + 2 mgL^{-1} BAP. Cell suspension cultures were treated with Zn ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) or Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) solely applied to the medium in concentrations: 200 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM and 0 μM as a control. Cell viability was determined using alamarBlue assay after 24, 48 and 72 h of treatments. Results showed the high tolerance levels to Zn and Pb of both metallophytes and nonmetallophyte. The accumulation of heavy metals in the viable cells was determined using atomic absorption spectrometry (AAS) after treatment with Zn or Pb with 2000 μM for 72 h. Cells of all studied *Viola* species/genotypes represented hyperaccumulation ability to Zn and Pb. Cells accumulated heavy metals in higher concentration than the concentration added to the medium. The deposition of heavy metals in cells was determined after treatment with 2000 μM of Zn or Pb for 72 h by transmission electron microscopy (TEM) with X-ray microanalysis using *V. tricolor* NMET as a model. Heavy metals were deposited mainly in cell wall and vacuoles – the insensitive to heavy metals cell structures. Heavy metal cell

survivors were able to divide and proliferate. Organogenesis and fully fertile regenerated plants, acclimatized to the outdoor conditions, were obtained from *V. arvensis* cells. The cells of *V. arvensis* regenerants represented higher (by ~12%) tolerance level to Pb than the cells of initial plant, what allows to extrapolate that regenerants have enhanced tolerance to Pb. The high frequency (6.8–19.6%, 21.8–30.1%, Zn and Pb, respectively) of cells undergoing programmed cell death was established using TUNEL assay on *V. tricolor* NMET model. The mechanism of cell death was determined using Western blot and Ligand blotting with the use of selected caspase-like enzyme inhibitors. Results showed that papain-like cysteine proteases (PLCPs) induce programmed cell death after heavy metal treatment.

The results obtained in the doctoral dissertation allowed to determine the role of a single cell in plant tolerance mechanism against heavy metals, ability of cells to divide and to regenerate into plants after heavy metal treatment and to reveal the mechanisms of plant cell death induced by heavy metal stress. The cells of the studied taxa were characterized by tolerance to high concentrations of heavy metals in the medium and the ability to hyperaccumulate them, which makes it possible to conclude on the constitutive (innate) tolerance to zinc and lead of species/genotypes selected for this study. Cell suspension culture is a good model for the study of the tolerance mechanisms to heavy metals. The results of doctoral dissertation are a new achievement for the current knowledge and are basis for further studies including recultivation/phytoremediation of pollutes soils with the use of selected genotypes with enhanced tolerance to heavy metals.

Syuzette Klenkiewicz

Akceptuję streszczenie

Prof. dr hab. s. n. Kutek

KRAKÓW, 16.04.2020r.