

Ewolucja przyłapaną „na gorąco” – czyli przemiany roślin na terenach przemysłowych (mikroewolucja)

Olga BEMOWSKA-KAŁABUN¹, Dorota PANUFNIK-MĘDRZYCKA²,
Małgorzata WIERZBICKA^{3*}

^{1,2,3} Zakład Ekotoksykologii, Instytut Biologii Środowiskowej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Na czym polega mikroewolucja?

Ewolucja może być rozpatrywana na trzech poziomach organizacji organizmów: populacji (mikroewolucja), ras i gatunków (specjacja) oraz wyższych jednostek systematycznych (makroewolucja) (Grant 1981, Levin 2000). Mikroewolucja dotyczy zmiany częstotliwości występowania (frekwencji) alleli¹ wewnątrz określonej populacji² w krótkim okresie czasu, kilku – kilkudziesięciu lat. Zmiany te pojawiają się na skutek: mutacji, selekcji naturalnej (doboru naturalnego), dryfu genetycznego³, przepływu genów pomiędzy populacjami, nielosowego krzyżowania i rekombinacji⁴, a także mechanizmów epigenetycznych⁵. Mikroewolucja prowadzi do powstania zmienności (wszelkich różnic pomiędzy osobnikami) wewnątrz

populacji określonego taksonu (Stace 1993, Hendry i Kinnison 2001, Krzanowska i in. 2002, Wierzbicka i Rostański 2002, Ashley i in. 2003, Ernst 2006, Freeland 2008, Vandegehuchte i Janssen 2011, Babst-Kostecka 2015). Powstałe na tej drodze nowe cechy (przystosowania do nowych warunków środowiska) mogą być dziedziczne i zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia osobników, a także ich reprodukcji. Przystosowania te, w wielu przypadkach, mogą tworzyć się w krótkich ramach czasowych, które są porównywalne z tymi, w których powstają w środowisku zmiany wywołane przez człowieka (Ashley i in. 2003, Mitchell i Whitney 2018, Gorné i Díaz 2019). Badanie procesów mikroewolucyjnych zachodzących w antropogenicznie zmienionych warunkach, jest obecnie jednym z podstawowych zagadnień ekotoksykologii (Bickham 2011, Coutellec i Barata 2011, Vandegehuchte i Janssen 2011, van Straalen i in. 2011). W dobie postępującego zanieczyszczenia środowiska szczególnie ważne stają się procesy mikroewolucji roślin na siedliskach zdegradowanych chemicznie, które z czasem mogą doprowadzić do powstawania nawet nowych podgatunków (Medina i in. 2007).

Do czynników, które mogą przyczynić się do wzmocnienia zachodzenia mikroewolucji u roślin można zaliczyć wspomniane już zanieczyszczenie środowiska (np. metalami ciężkimi, herbicydami)

¹ Allele – różne wersje tego samego genu.

² Populacja – grupa osobników jednego gatunku żyjąca na tym samym obszarze.

³ Dryf genetyczny – zmiana frekwencji genów wynikająca ze zjawisk losowych.

⁴ Rekombinacja – proces wymiany materiału genetycznego, w wyniku którego powstają nowe genotypy.

⁵ Mechanizmy epigenetyczne – zmiany ekspresji genów, które nie są związane ze zmianami w sekwencji nukleotydów w DNA.

* Autor korespondujący

a także patogeny, wpływ gatunków obcych, fragmentację siedlisk, czy też globalne zmiany na Ziemi (np. ocieplenie klimatu, wzrost zawartości CO₂ w atmosferze). Ich efektem mogą być u roślin np. zmiany cech morfologicznych, procesów fizjologicznych i biochemicznych, obniżenie płodności, wytworzenie tolerancji na czynnik stresowy. Szybka ewolucja tych cech może wystąpić zarówno u roślin jednorocznych, jak i wieloletnich, nawet tak długo żyjących jak drzewa (Bone i Farres 2001, Ashley i in. 2003). W Tabeli 1, przygotowanej na podstawie pracy Bone i Farres (2001), przedstawiono przykłady różnych cech roślin, które uległy zmianie (po określonym czasie) na skutek wystąpienia procesów mikroewolucyjnych w odpowiedzi na wybrane czynniki abiotyczne środowiska.

Powstanie podwyższonej tolerancji roślin na metale ciężkie jest modelowym procesem wykorzystywanym w badaniach nad ewolucją adaptacji do skrajnie niekorzystnych środowisk. Cecha ta wyewoluowała niezależnie u różnych gatunków roślin, w wyniku procesów mikroewolucyjnych, działających na osobniki populacji niemetalolubnych (z czystych terenów), które kolonizowały obszar zanieczyszczony. W procesie tym, na skutek działania toksycznych metali następuje selekcja osobników i przetrwanie tych, które wytworzyły mechanizmy obronne (np. zdolność do detoksykacji metali, system redukcji stresu oksydacyjnego) (Wierzbicka 1999, 2015, Ernst 2006, Wierzbicka i in. 2017). Na Rycinie 1 przedstawiono schematycznie jak wystąpienie deficytu lub nadmiaru pierwiastka chemicznego w środowisku może wpłynąć na kierunek ewolucji i zajście procesu selekcji.

Na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, takich jak hałdy cynkowo-ołowiove, występuje wiele roślin tolerujących wysokie stężenia metali, nazywamy je metalofitami (Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom). Wśród tych metalofitów ciekawymi są np.: *Biscutella laevigata* L., *Dianthus carthusianorum* L. *Armeria maritima* (Mill.) Willd., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Viola lutea* var. *westfalica* A. A. H. Schulz, *V. lutea* subsp. *calaminaria* (Ging.) Nauenb., czy *Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalréc. Gatunki te mają szereg przystosowań pozwalających im przetrwać niekorzystne warunki tych siedlisk, wśród których można wymienić m.in.: zdolność do detoksykacji

metali w komórce (np. w wakuoli lub ścianie komórkowej), jak również rozwinięcie strategii życiowej typu r polegającej na wytworzeniu form o skróconym cyklu życiowym i szybko wchodzących w fazę generatywną (Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom). Liczne badania pokazują, że u tych gatunków różnice w cechach osobników populacji występujących na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi a tymi na obszarach czystych są wyraźne, co sugeruje wyodrębnienie się nowych form, odmian, a nawet podgatunków (m.in.: Baker i Proctor 1990, Lefèbvre i Vernet 1990, Wierzbicka i Rostański 2002, Baumbach i Hellwig 2003, Ernst 2006, Hildbrandt i in. 2006, Słomka i in. 2011c, Abratowska i in. 2012, Godé i in. 2012, Migdalek i in. 2013, Wójcik i in. 2013, Kuta i in. 2014, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka 2015, Wierzbicka i in. 2017).

W przypadku tolerancji na nadmiar metali ciężkich tempo ewolucji zależy od siły presji selekcyjnej (np. ilości dostępnego w glebie pierwiastka) i przepływu genów między populacjami metalolubnymi i niemetalolubnymi. Gdy przepływ genów pomiędzy populacją metalolubną a populacjami niemetalolubnymi jest nieograniczony to przetrwanie zmian adaptacyjnych w nowo ewoluującej populacji metalolubnej jest możliwe tylko przy bardzo silnej presji selekcyjnej, przewyższającej tempo migracji (rozprzestrzenianie się np. za pomocą rozsiewania diaspor) pomiędzy populacjami. Jeżeli jednak pomiędzy populacją metalolubną a populacjami niemetalolubnymi występuje utrudniony przepływ genów i niskie tempo migracji to adaptacje do siedlisk metalonośnych mogą utrwalić się w nowej populacji już po kilku pokoleniach. Jeżeli dodatkowo występuje izolacja geograficzna (brak kontaktu między populacjami) to dystans genetyczny między odizolowanymi populacjami będzie stopniowo rósł, w wyniku czego z czasem (relatywnie krótkim, liczonym w kilku, kilkudziesięciu latach) może dojść do wyodrębnienia się nowych wewnątrzgatunkowych jednostek taksonomicznych na zanieczyszczonym metalami terenie (Baker 1987, Lefèbvre i Vernet 1990, Stace 1993, Zink i Barrowclough 2008, Babst-Kostecka 2015). Za formę uważa się grupę osobników sporadycznie występującą w populacjach danego gatunku, różniącą się jedną lub kilkoma cechami,

jej występowanie warunkowane jest z reguły niewielkimi modyfikacjami genetycznymi (niższą kategorią taksonomiczną jest podforma). Odmiana to grupa osobników tworząca mniej lub bardziej wyraźny lokalny wariant gatunku, ukształtowana zwykle pod specyficznym wpływem środowiska, np. występowaniem w danym miejscu charakterystycznego odczynu (pH), temperatury, wilgotności itp. odbiegających od warunków optymalnych dla danego gatunku, ale nie wykluczających jego występowania. Niższą kategorią taksonomiczną jest pododmiana. Odmiany danego gatunku mogą się swobodnie krzyżować między sobą. Podgatunek definiowany jest jako grupa osobników tworząca mniej lub bardziej wyraźny regionalny wariant gatunku. Jedną z przyczyn różnicowania się podgatunków jest zmienność geograficzna gatunku, która pozwala przystosować się do różnic klimatycznych i środowiskowych na rozległym obszarze występowania (Stace 1993, Judd i in. 2008, Stuessy 2009, Turland i in. 2018).

Isolacja przestrzenna populacji wraz z nowymi warunkami życia (wysoka zawartość metali ciężkich w podłożu), występujące przez dostatecznie długi okres czasu, mogą doprowadzić do endemizmu, czyli powstania w odizolowanej populacji form całkowicie odmiennych (endemitów) od form populacji nieizolowanych. Endemitami nazywamy taksony, które występują tylko na jednym, ograniczonym obszarze geograficznym. Termin endemizm stosowany jest zwykle jedynie do opisywania przypadków znacznego ograniczenia obszaru rozprzestrzenienia. Endemity dzielimy na: neodemity czyli taksony młode ewolucyjnie, jeszcze niezdolne do rozprzestrzenienia się na nowe tereny oraz plaeodemity – taksony o zasięgu obecnie bardzo ograniczonym, który był kiedyś znacznie szerszy. Przykładowo, endemity terenów metalonóśnych nazywane są metalofitami absolutnymi, czyli gatunkami, których zasięg ogranicza się wyłącznie do stanowisk zawierających wysokie stężenia metali ciężkich w glebie (Kruckeberg i Rabinowitz 1985, Stace 1993, Babst-Kostecka 2015).

Jak już wcześniej wspomniano, mikroewolucja prowadzi do powstania zmienności wewnątrz populacji określonego taksonu. Podstawowymi źródłami zmienności genetycznej, która podlega doborowi naturalnemu, są mutacje i rekombinacja genetyczna.

Mutacje to zmiany zapisu informacji genetycznej. Wyróżniamy mutacje genowe (w obrębie jednego genu), mutacje chromosomowe (aberracje strukturalne chromosomów) i mutacje genomowe (zmiany liczby chromosomów). Tam, gdzie organizmy są narażone na działanie toksycznych związków, mutacje mogą pojawiać się z większą częstotliwością. Na przykład, metale ciężkie zakłócają cykl komórkowy i powodują mutacje, które mogą wpływać na zmiany: liczby chromosomów (aneuploidia⁶, poliploidia⁷), struktury chromosomów i ontogenezy (endomitoza⁸, endoreduplikacja⁹). Zazwyczaj są one łatwe do wykrycia dzięki analizom cytologicznym i pomiarom zawartości DNA. Zmienność liczby chromosomów między- i wewnątrzpopulacyjna (między- i wewnątrzosobnicza) jest kluczowym krokiem w kierunku specjacji¹⁰. Potencjalnie ogromnym źródłem zmienności genetycznej są także rekombinacje. Rekombinacje genetyczne u organizmów eukariotycznych związane są z rozmnażaniem płciowym (losowe łączenie gamet), jak również wynikają z przegrupowania genów w czasie mejozy (ang. *crossing-over*) (Kwiatkowska i Kłowska – Rozdział 4, niniejszy tom). Dzięki nim geny lub ich fragmenty (organizmów rodzicielskich) spotykając się w nowych układach tworzą nowe genotypy (potomstwa) (Krzyszowska i in. 2002, Rogalska i in. 2005, Medina i in. 2007, Freeland 2008, Słomka i in. 2011b, Brown 2018).

W mikroewolucji ważną rolę może odgrywać dziedziczenie epigenetyczne. Epigenetyka to nauka zajmująca się badaniem zmian ekspresji genów, które nie obejmują zmiany w sekwencji DNA. Natomiast epigenomem nazywamy zestaw chemicznych

⁶ Aneuploidia – wystąpienie w komórkach organizmu nietypowej dla jego gatunku liczby chromosomów, nie będącej jednak wielokrotnością jednego zestawu chromosomowego.

⁷ Poliploidia – posiadanie przez dany organizm więcej niż dwóch kompletnych zestawów chromosomów.

⁸ Endomitoza – duplikacja materiału genetycznego w jądrze komórkowym, po której nie następuje podział komórkowy.

⁹ Endoreduplikacja – zjawisko polegające na wielokrotnieniu zawartości DNA z pominięciem mitozy, podczas endoreduplikacji liczba chromatyd ulega podwojeniu, ale nie podlegają one segregacji (tym samym liczba chromosomów pozostaje niezmieniona), nie obserwuje się także zaniku i odbudowy otoczki jądrowej oraz kondensacji i dekondensacji chromatyny.

¹⁰ Specjacja – proces w wyniku, którego powstają nowe gatunki.

modyfikacji DNA oraz białek histonów, który reguluje strukturę chromatyny¹¹ oraz funkcje genomu (Krzyszowska i in. 2002, Rapp i Wendel 2005, Perrone i Martinelli 2019, Singroha i Sharma 2019). Zmienność informacji epigenetycznej jest zjawiskiem powszechnym u roślin, wiele badań dokumentuje tę międzyosobniczą zmienność u różnych grup roślin (np. Ashikawa 2001, Knox i Ellis 2001, Cervera i in. 2002, Riddle i Richards 2002, Liu i Wendel 2003, Wang i in. 2004, Baulcombe i Dean 2014, Singroha i Sharma 2019, Thiebaut i in. 2019). Wykazano, że oddziaływanie niektórych metali (np. ołowiu, kadmu, rtęci, miedzi i niklu) oraz substancji organicznych (np. benzo[a]pirenu, metoksychloru) może indukować zachodzenie zmian epigenetycznych u osobników na nie narażonych (Vandegheuchte i Janssen 2011).

Dziedziczenie epigenetyczne polega na dziedziczeniu przez organizm potomny jakiejś cechy bez zmian w sekwencji DNA. Nośnikiem pamięci epigenetycznej jest struktura chromatyny i oddziałujące z nią białka (Jaenisch i Bird 2003, Wierzbicki 2004, Rapp i Wendel 2005, Chinnusamy i Zhu 2009, Grativol i in. 2012, Iwasaki i Paszkowski 2014, Puy i in. 2018). Ważną właściwością dziedziczenia epigenetycznego jest potencjalna możliwość jego regulacji w odpowiedzi na warunki środowiska. Oznacza to, że w niezmiennych warunkach preferowane jest utrzymywanie stałego, zoptymalizowanego zespołu cech osobnika (fenotypu). Jednakże, gdy warunki środowiskowe ulegają zmianie, pożądane może być zwiększenie zmienności fenotypowej, która staje się podstawą adaptacji do nowych warunków (Nicotra i in. 2010, Baulcombe i Dean 2014, Perrone i Martinelli 2019, Singroha i Sharma 2019, Thiebaut i in. 2019). Może zatem dochodzić

do sytuacji, w której w odpowiedzi na zmianę środowiska ustanawiany będzie konkretny wzór ekspresji genów (odkodowania zawartej w nich informacji) odpowiedzialny za określone przystosowania fizjologiczne lub rozwojowe organizmów. Taki wzór ekspresji genów może następnie zostać utrwalony epigenetycznie w kolejnych pokoleniach (Wierzbicki 2004, Rapp i Wendel 2005). Zatem cechy istotne z punktu widzenia doboru naturalnego mogą być dziedziczone epigenetycznie i istnieje możliwość utrwalenia cech nabytych w odpowiedzi na zmiany środowiska (Rapp i Wendel 2005). Liczne badania pokazują, że w warunkach stresowych może dochodzić do znacznego zwiększenia zmienności fenotypowej w populacji, co z kolei przyspiesza proces adaptacji (Finnegan 2002, Rapp i Wendel 2005, Chinnusamy i Zhu 2009, Nicotra i in. 2010, Grativol i in. 2012, Thiebaut i in. 2019). Ponieważ zmiany epigenetyczne mogą zachodzić znacznie szybciej niż zmiany oparte na sekwencjach DNA oraz dlatego, że mogą zachodzić na skutek wystąpienia różnych stresów środowiskowych, odgrywają one istotną rolę w szybkim dostosowaniu (adaptacji) roślin do zmieniającego się środowiska. Nowe kombinacje przestrzennych i czasowych wzorców ekspresji genów można osiągnąć za pomocą zestawu mechanizmów epigenetycznych, nawet przy całkowitym braku zmienności genetycznej. Zatem reakcje epigenetyczne przy kontakcie organizmów z czynnikiem stresowym mogą wyzwalać ogromne ilości ukrytej zmienności w ekspresji genów, która może być testowana przez dobór naturalny (Rapp i Wendel 2005, Nicotra i in. 2010, Baulcombe i Dean 2014, Perrone i Martinelli, Singroha i Sharma 2019, Thiebaut i in. 2019).

Mikroewolucja na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi – przykłady

W niniejszym podrozdziale zaprezentujemy kilka wybranych przykładów roślin, dla których stwierdzono zajście procesów mikroewolucyjnych i dostosowanie się do zwiększonej zawartości metali ciężkich w podłożu.

Jednym z gatunków zdolnych zasiedlać obszary o wysokiej zawartości metali ciężkich jest

¹¹ Chromosomy zbudowane są z chromatyny, czyli substancji zbudowanej z DNA, histonów, niehistonowych białek i małej ilości RNA. Mogą one przenosić z pokolenia na pokolenie nie tylko informację genetyczną zapisaną jako sekwencja zasad w DNA, lecz również pewne instrukcje zawarte w strukturze i konformacji (układzie przestrzennym) chromatyny. Ta właśnie część informacji, określana mianem epigenetycznej, odzwierciedla funkcjonalne zmiany, jakim podlegała chromatyna w rozwoju osobniczym oraz w czasie powstawania komórek rozrodczych, na przykład pod wpływem czynników środowiskowych. Informacja ta może oddziaływać na aktywność genów w następnych pokoleniach i grać ważną rolę w procesie specjacji (powstawania nowych gatunków).

A. maritima (zawciąg nadmorski) (Abratowska i in. 2012, 2015, Holeksa i in. 2015, Rostański i in. 2015). Prowadzone badania pokazały, że osobniki *A. maritima* rosnące na terenach cynkowo-ołowiowych różnią się cechami morfologicznymi (m.in. utrwaloną karłowatością roślin z populacji hałdowej), poziomem tolerancji i stopniem rozwoju mechanizmów odpornościowych na metale ciężkie (ołów, kadm i cynk), w porównaniu do osobników tego samego gatunku, rosnących na glebach nie zanieczyszczonych metalami. Cechy te były utrwalone w kolejnym pokoleniu (F1 – pierwsze pokolenie potomne). Wykazano, że procesy mikroewolucyjne w populacji *A. maritima* na terenach cynkowo-ołowiowych rejonu olkuskiego doprowadziły wręcz do wykształcenia odrębnego, unikatowego podgatunku o podwyższonej odporności na metale ciężkie – *A. maritima* subsp. *boleslaviensis* subsp. nov. (Abratowska i in. 2012, 2015). Dotychczasowe studia nad przystosowaniami *A. maritima* do życia na stanowiskach wzbogaconych w metale ciężkie wykazały, że u tego gatunku funkcjonuje złożona sieć mechanizmów obronnych. Najważniejszą strategią odporności *A. maritima* na poziomie organizmu jest wzbogacenie w metale najstarszych liści, które po uschnięciu są odrzucane przez rośliny. Badano również jego przystosowania na poziomie fizjologiczno-biochemicznym do wzrostu w warunkach nadmiaru toksycznych metali ciężkich. Zaobserwowano wzrost zawartości glutationu¹² oraz zmiany zawartości i proporcji kwasów organicznych, takich jak kwas jabłkowy (Olko i in. 2008, Abratowska i in. 2012, 2015). Wykazano także, że u roślin *A. maritima* porastających podłoża wzbogacone w cynk i miedź, jak również hodowanych w pożywkach wzbogaconych w ołów, kadm i cynk, następowało gromadzenie metali w komórkach tanninowych¹³. Innym fizjologiczno-biochemicznym przystosowaniem do nadmiaru metali ciężkich stwierdzonym u roślin *A. maritima* jest obecność w cytoplazmie komórek drobnocząsteczkowego

białka stresowego HSP17, które należy do białek szoku cieplnego¹⁴. Uważa się, że białka te biorą udział w naprawie uszkodzeń wewnątrzkomórkowych powstających pod wpływem działania metali. Mechanizmy obronne u roślin *A. maritima* w warunkach nadmiaru metali ciężkich są związane także z funkcjonowaniem wytworów epidermy (skórki) liści – włosków i gruczołów solnych. Mogą one gromadzić nadmiar metali, co przyczynia się do zmniejszenia ich stężenia w komórkach mięksizu liści, a przez to do ochrony wrażliwych procesów fizjologicznych. Wykazano, że takie metale ciężkie, jak ołów, kadm i cynk, gromadziły się we włoskach zwykłych oraz w gruczołach solnych epidermy liści *A. maritima* (Olko i in. 2008, Abratowska i in. 2012, 2015). Szczególnie interesującym zagadnieniem jest wydzielanie metali ciężkich przez gruczoły solne tego gatunku. Gruczoły solne to wyspecjalizowane wytwory wydzielnicze, odgrywające rolę w regulacji stężenia soli u halofitów, roślin porastających podłoża zasolone (np. nadmorskie). Na liściach *A. maritima* gruczoły solne występują w epidermie górnej i dolnej liści. Podczas hodowli roślin w podłożu z dodatkiem ołowiu, kadmu i cynku, ich liście pokrywały się charakterystycznymi grudkami, powstającymi przez krystalizację soli. W komórkach gruczołów solnych, jak i w składzie soli wydzielonej na powierzchnię liści, znajdowały się metale podane roślinom – ołów, kadm i cynk. Były one wydzielane na powierzchnię liścia przez gruczoły solne epidermy. W skład wydzielanego roztworu wchodziły również inne pierwiastki, będące składnikami mineralnymi podłoża hodowlanego: wapń, siarka, chlor, magnez i potas. Zatem, regulacja stężenia metali w mezofilu (mięksizu) liścia następowała przy udziale gruczołów solnych. Mechanizm ten występował zarówno u roślin z terenów metalonośnych (z hałd cynkowo ołowiowych), jak i z terenów niemetalonośnych (Wierzbicka i Słysz 2005, Abratowska i in. 2012, 2015). Również inni badacze (Neumann i in. 1995, Heumann 2002) obserwowali udział gruczołów solnych w detoksykacji roślin *A. maritima* narażonych na nadmiar metali ciężkich.

¹² Glutation – organiczny związek chemiczny o właściwościach przeciwutleniających, zbudowany z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny.

¹³ Komórki tanninowe – produkujące tanniny, czyli organiczne związki chemiczne, które są związkami obronnymi przed patogenami, roślinożercami i niekorzystnymi warunkami środowiska.

¹⁴ Białka szoku cieplnego – grupa białek, których ekspresja wzrasta, gdy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, np. wysokiej lub niskiej temperatury, metali ciężkich.

Innym gatunkiem spotykanym na pogórnicych hałdach w Bolesławiu jest *A. arenosa* (rzezusznik piaskowy). Badano osobniki rzezusznika piaskowego z tego metalonośnego obszaru w porównaniu do tych z obszaru niemetalnośnego. Wykazano, że różniły się one znacząco pod względem wszystkich analizowanych cech morfologicznych. Rośliny z populacji hałdowej były zdecydowanie mniejsze niż rośliny pochodzące z obszaru niezanieczyszczonego. Aby sprawdzić, czy obserwowane różnice są utrwalone genetycznie przeprowadzono badania biometryczne w kolejnych pokoleniach tego gatunku. Wykazały one ponownie znaczące różnice między tymi populacjami. Cechami najbardziej różniącymi obie populacje były: długość łuszczyń (owoców), liczba włosków na liściach, liczba pędów generatywnych, długość i szerokość liści. Widoczne różnice morfologiczne pomiędzy populacjami były trwałymi genetycznymi zmianami wywołanymi silną, selekcyjną presją środowiska na ten gatunek. Rośliny *A. arenosa* z populacji hałdowej charakteryzowały się także dużą różnicą w tolerancji na kadm i na cynk w stosunku do populacji odniesienia. Wzrost populacji hałdowej *A. arenosa* w środowisku bogatym w metale, a więc w środowisku silnie selekcyjnym, doprowadził do wykształcenia wysoce tolerancyjnej grupy roślin (ekotyp¹⁵) charakteryzujących się wysoką tolerancją indukowaną (nabytą) na cynk i kadm (Przedpeńska i Wierzbicka 2007).

Jednym z ważnych gatunków wchodzących w skład muraw na hałdach cynkowo-ołowiowych (galmanowych) w okolicach Olkusza jest *D. carthusianorum* (goździk kartuzek). Badania nad tym gatunkiem pokazały, że osobniki rosnące na hałdzie galmanowej różniły się znacząco pod względem morfologicznym od tych na stanowiskach niezanieczyszczonych – były drobniejsze, posiadały mniej liści w rozecie, a ich liście były krótsze i węższe, z większą liczbą aparatów szparkowych. Charakteryzowały się one także: dłuższymi korzeniami u siewek oraz wytwarzaniem długich i licznych włosników korzeniowych, szybszym tempem wchodzenia w fazę generatywną oraz

jej wydłużeniem, wytwarzaniem większej liczby kwiatów w przeliczeniu na jednego osobnika, wytwarzaniem większej liczby nasion o mniejszych rozmiarach (strategia życiowa typu r). Cechy te były utrwalone w pierwszym pokoleniu potomstwa (F1) (Załęcka i Wierzbicka 2002, Wójcik i in. 2013). Wykazano również odrębność genetyczną populacji hałdowej *D. carthusianorum*. Populacje z hałdy galmanowej i z terenu o niskiej zawartości metali ciężkich cechowały się zbliżonym poziomem zmienności wewnątrzpopulacyjnej, co oznacza, że w populacji zasiedlającej hałdę nie doszło do zawężenia puli genetycznej. Populację hałdową uznano za ekotyp galmanowy (Wójcik i in. 2013). *D. carthusianorum* z hałdy cynkowo-ołowiowej charakteryzował również podwyższony poziom tolerancji na ołów. Udowodniono, że wydajna detoksykacja ołowiu w korzeniach roślin jest jednym z kluczowych mechanizmów odporności, umożliwiających wzrost tego gatunku na podłożach o wysokiej zawartości tego pierwiastka (Baranowska-Morek i Wierzbicka 2004, Wójcik i Tukiendorf 2014).

Za nowy ekotyp galmanowy uznano także populacje innego gatunku porastającego hałdę pogórnicych odpadów w Bolesławiu – *S. vulgaris* (lepnica rozdęta). Ten pospolity gatunek charakteryzuje się dużą zmiennością wewnątrzgatunkową. Także i dla tego gatunku przebadano rośliny z populacji hałdowej i naturalnej (pokolenie F1). Stwierdzono, że w populacji hałdowej występują genetycznie utrwalone przystosowania do wzrostu w skrajnie niekorzystnych warunkach. Wykazano m.in., że rośliny z populacji hałdowej, w porównaniu do roślin z populacji naturalnej, były bardziej odporne na obniżenie osmotycznego potencjału wody (większa odporność na suszę), miały także wysoką tolerancję na ołów i cynk. Rośliny pochodzące z hałdy szczególnie obficie tworzyły włosniki korzeniowe w porównaniu z roślinami populacji naturalnej. Ponadto osiągały mniejszą biomasę, miały krótsze węższe i grubsze liście, skrócone i płójące się pędy. Rośliny z populacji hałdowej szybciej rozwijały się, wcześniej osiągały fazę generatywną i miały większą płodność – zawiązywały więcej nasion, które były jednak mniejsze niż u roślin z populacji naturalnej (strategia życiowa typu r) (Wierzbicka i Panufnik 1998, Wierzbicka i Zyska 1999).

¹⁵ Ekotyp – forma w obrębie gatunku, która tworzy populację lub grupę populacji posiadających zestaw cech charakterystycznych dla danego środowiska, wykształcony w wyniku ewolucji.

Wystąpienie różnic genetycznych pomiędzy populacjami z obszarów metalonośnych (m.in. hałd odpadów po wydobyciu i przetwarzania rud) i niemetalonośnych wykazano także dla populacji *V. tricolor* (fiołek trójbarwny). W Polsce gatunek ten jest pospolitym taksonem, wykazującym duże zróżnicowanie morfologiczne. Pokazano, że plastyczność fenotypowa i zróżnicowanie genetyczne umożliwia temu gatunkowi kolonizowanie obszarów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Genetyczne różnice pomiędzy populacjami z terenu metalonośnego i niezanieczyszczonego metalami świadczą o zachodzących procesach mikroewolucyjnych, prowadzących do powstania nowych, lepiej dostosowanych lokalnych ekotypów. Zaobserwowano także, że populacje z obszaru metalonośnego charakteryzuje wyższy polimorfizm genetyczny i zróżnicowanie genetyczne niż z obszaru niezanieczyszczonego metalami. Jednak w tym przypadku wykazano, że gatunek ten (osobniki z populacji metalicznych i niemetalicznych), podobnie jak inne gatunki z sekcji *Melanium* (bratki) rodzaju *Viola* L. wykazuje wysoką tolerancję na metale ciężkie, która wyewoluowała w tym rodzaju (Słomka i in. 2008, 2010, 2011a, b, c, 2012, Słomka i Kuta 2015).

Nie zawsze jednak powstałe różnice pomiędzy populacjami z terenów metalonośnych i czystych są aż tak wyraźne, jak w przytoczonych wyżej przykładach. W pracy Jiménez-Ambriz i in. (2007) przedstawiono dwa ekotypy *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) F. K. Mey. (syn. *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl) (tobolki alpejskie) z południowej Francji, które pomimo bliskości geograficznej, wykazywały pewne zróżnicowanie na skutek selekcji związanej z zanieczyszczeniem podłoża metalami ciężkimi. Największe różnice pomiędzy ekotypem z obszaru metalonośnego i niemetalonośnego dotyczyły wrażliwości na wysokie stężenia cynku. Większą tolerancję wykazywały osobniki z obszaru metalonośnego. Produkowały one także mniejsze nasiona oraz mniej owoców na łodygę kwiatową, w porównaniu do tych z obszaru niemetalonośnego. Różnice genetyczne pomiędzy populacjami na terenach zanieczyszczonych były większe niż pomiędzy populacjami na czystych terenach (Jiménez-Ambriz i in. 2007).

Z kolei, Antonovics (2006) wykazał, że występują różnice w czasie kwitnienia pomiędzy populacjami z obszaru kopalni cynku i ołowiu oraz

obszarami czystymi (pastwisko) u *Anthoxanthum odoratum* L. (tomka wonna) z północnej Walii. Wcześniej kwitły rośliny metalotolerancyjne. Mogło to być skutkiem zajścia izolacji genetycznej pomiędzy tymi dwoma typami populacji, co byłoby kolejnym przykładem procesów mikroewolucyjnych u populacji narażonych na oddziaływanie metali ciężkich (Antonovics 2006).

Podgatunek *B. laevigata* „woycickii” endemit na hałdach pogórnich – badania genetyczne

Bardzo dobrym przykładem wystąpienia wyraźnych różnic pomiędzy populacjami z obszarów metalonośnych i czystych na skutek zajścia procesów mikroewolucyjnych jest „główna bohaterka” niniejszego tomu, mianowicie gatunek *B. laevigata*. Dotychczasowe badania wykazały, że dwie populacje *B. laevigata*, z Tatr i Bolesławia (z hałd pogórnich) zdecydowanie różnią się od siebie wieloma utrwalonymi genetycznie cechami morfologicznymi (Pielichowska i Wierzbicka 2004, Wierzbicka i Pielichowska 2004, Pielichowska 2007, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2016, 2017, 2020, Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom). Pierwszym istotnym elementem różniącym obie populacje były cechy związane z przystosowaniem do deficytów wody – grubość blaszki liściowej i intensywność pokrycia liści włoskami epidermalnymi. W obu badanych populacjach przystosowania te rozwinęły się niezależnie w dwóch różnych kierunkach. Liście roślin z populacji hałdowej były cieńsze, ale za to pokryte liczniejszymi włoskami, chroniącymi tym samym rośliny przed nadmierną utratą wody (transpiracją). Włoski te były żywe, lecz ich zewnętrzna ściana komórkowa była na tyle gruba, że mogła ograniczać transpirację. Z kolei liście roślin z populacji tatrzańskiej miały nieliczne włoski, ale za to ich blaszka liściowa była grubsza dzięki zwiększeniu rozmiarów (wakuolizacji) mezofilowych komórek liści (Wierzbicka i Pielichowska 2004). Pozwalała to na zwiększone magazynowanie wody w liściach i jest zabezpieczeniem przed wystąpieniem jej deficytu (Podbielkowski i Podbielkowska 1992, Wierzbicka i Rostański 2002). Druga grupa cech różniująca populację z hałdy galmanowej

od tatrzańskiej to cechy związane z przystosowaniem roślin do nadmiaru metali ciężkich w podłożu. Rośliny populacji hałdowej wykazywały dużo wyższy poziom tolerancji na metale ciężkie (ołów, cynk, kadm) niż rośliny populacji tatrzańskiej. Wykazano, że tolerancja na cynk roślin populacji hałdowej była tak wysoka, że można je było zaliczyć do grupy roślin „cynkolubnych” (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom).

Przeprowadzono także badania genetyczne, które umożliwiły poznanie struktury genetycznej populacji pleszczotki górskiej z hałd z Bolesławia i Tatr. Badania miały na celu ustalenie, w jaki sposób doszło do kolonizacji obszarów galmanowych oraz określenie, czy proces ten odbył się stosunkowo niedawno, czy też w bardziej odległej przeszłości (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017). Ponieważ badane populacje hałdowe i tatrzańskie znajdowały się w znacznej odległości od siebie (około 100 km w linii prostej), zaś pierwsze wzmianki o populacji *B. laevigata* rozwijającej się na terenach metalonośnych okolic Olkusza pochodzą z roku 1876 (Uechtritz 1877), zakładano, że kolonizacja hałdy galmanowej przez pleszczotkę górską nastąpiła niedawno (około 130 lat temu) oraz, że proces ten określić można jako „długodystansową migrację”. Oczekiwano, że stosunkowo niedawna kolonizacja hałdy i długodystansowa migracja roślin przyczyniły się do zmniejszenia różnorodności genetycznej populacji hałdowej w porównaniu z populacjami naturalnymi z obszaru Tatr. Spodziewano się niewielkich dystansów genetycznych dzielących badane populacje oraz brak genotypów charakterystycznych tylko dla populacji hałdowej. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że poziom różnorodności genetycznej (ustalony metodą AFLP¹⁶) był

porównywalny w analizowanych populacjach, niezależnie od ich pochodzenia. Dodatkowo odległości genetyczne, które odczytywać można jako wskaźnik genetycznego podobieństwa lub różnicy pomiędzy populacjami, okazały się mocno zróżnicowane. Odległość genetyczna mierzona pomiędzy populacją hałdową a populacjami tatrzańskimi była ponad 30-krotnie większa, niż odległość genetyczna pomiędzy samymi populacjami tatrzańskimi. Badania wykazały także obecność w populacji hałdowej genotypów, których nie stwierdzono w populacjach tatrzańskich. Przepływ genów pomiędzy populacjami z terenu Tatr i hałdy galmanowej ustał już prawdopodobnie co najmniej kilka tysięcy lat temu, o czym świadczą wyniki badań genetycznych. Wyniki tych badań przedstawiono na Rycinie 2. Wykazały one, że populacja z hałdy galmanowej istotnie różni się od populacji tatrzańskich pod względem genetycznym i tworzy odrębną grupę. Natomiast osobniki z populacji tatrzańskich nie skupiały się w wyraźne grupy (stosownie do ich pochodzenia z określonej populacji/miejsca). Może to świadczyć o istnieniu znaczącego przepływu genów pomiędzy osobnikami z populacji tatrzańskich. Populacji *B. laevigata* z hałd nadano rangę podgatunku – *B. laevigata* L. subsp. *woycickii* M. Wierzb., Pielich. & Wasowicz (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020, Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6 niniejszy tom).

Istnienie silnego zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami pleszczotki górskiej z Tatr i rejonu olkuskiego wykazali także Babst-Kostecka i in. (2014), którzy w swoich badaniach wykorzystywali sekwencje mikrosatelitarne¹⁷. Także i oni wskazali, że na skutek zajścia procesów mikroewolucyjnych nastąpiło rozejście się populacji z terenu hałd pogórnicych i populacji z Tatr. W innych badaniach Babst-Kosteckiej i in. (2016) określony został poziom tolerancji na cynk populacji *B. laevigata* z obszarów metalonośnych i niemetalonośnych z południowej Polski, aby określić zmienność fenotypową tego gatunku pod kątem tolerancji

¹⁶ Metoda AFLP – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów DNA, należy do grupy metod tzw. „genetycznego odcisku palca”. AFLP polega na trawieniu matrycowego DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie poddaniu uzyskanych fragmentów DNA dwukrotnej amplifikacji: niespecyficznej i specyficznej. Polimorfizm dotyczy różnic w długości amplifikowanych fragmentów DNA, które powstają na skutek substytucji nukleotydowych w obrębie albo w pobliżu miejsc restrykcyjnych, lub też na skutek delecji albo insercji. Większość tego polimorfizmu jest dominująca.

¹⁷ Sekwencje mikrosatelitarne – fragmenty DNA składające się z tandemowych powtórzeń motywu nukleotydowego o długości od 1 do 6 par zasad, jeden z częściej stosowanych markerów molekularnych.

na cynk. Zbadano cechy morfologiczne i fizjologiczne (np. biomasę, widoczne objawy stresu, zawartość cynku w liściach). Następnie strukturę tych ilościowych cech porównano z neutralnymi markerami molekularnymi¹⁸ w celu przetestowania, czy dobór naturalny spowodował zróżnicowanie populacji *B. laevigata* pod kątem tolerancji na cynk. Okazało się, że tolerancja na cynk występowała w całym gatunku, jednak stwierdzono wyższą tolerancję na cynk u roślin z obszarów metalonośnych w porównaniu do roślin z obszarów niemetalonośnych. Wykazano, że zwiększona tolerancja na cynk w populacjach tego gatunku z obszarów metalonośnych wynika z rozbieżnej selekcji w odpowiedzi na zanieczyszczenie środowiska tym metalem. Ponadto analizy interakcji genotyp vs. środowisko wskazywały, że to zróżnicowanie jest dziedziczne (Babst-Kostecka i in. 2016). Badania Babst-Kosteckiej i in. (2016) dotyczące tolerancji *B. laevigata* na cynk są zgodne z badaniami Wierzbickiej i in. (2015, 2017), w których wykazano „cynkolubność” tego gatunku. Warto w tym miejscu także zauważyć, że proces selekcji u *B. laevigata* ma miejsce już przy produkcji nasion, na co wskazują badania embriologiczne. Szczegółowe informacje na ten temat zostały zawarte w Rozdziale 4 niniejszego tomu.

Znane są przykłady powstawania tolerancyjnych roślin, wykazujących zdolność do wzrostu i wydajnego rozmnażania się na terenach o podwyższonej zawartości metali w glebie, w ciągu stosunkowo krótkiego czasu – od kilkunastu do kilkudziesięciu lat. Jednak są to przykłady jedynie fizjologicznego dostosowania się roślin do podwyższonego stężenia metali ciężkich (Wu i in. 1975, Bradshaw i McNeilly 1981, Al-Hiyaly i in. 1993, Briggs i Walters 2000). W przypadku roślin *B. laevigata* z hałdy galmanowej w Bolesławiu przystosowania do wysokich stężeń metali ciężkich obejmowały oprócz cech fizjologicznych, także cechy morfologiczne i anatomiczne. Powstanie adaptacji na tych poziomach wymaga dłuższego okresu czasu oddziaływania czynnika stresowego i izolacji populacji, jak miało

to miejsce w przypadku hałdowej populacji pleszczotki górskiej (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020).

Podsumowując badania genetyczne *B. laevigata*, wykazano, że odrębność populacji z hałdy galmanowej w stosunku do populacji tatrzańskich jest wynikiem procesu ewolucyjnego, którego czas trwania znacząco przekracza ramy czasowe wyznaczone przez pierwszą wzmiankę o tym gatunku na terenach pogórnicych w okolicach Olkusza (1876 rok). Wydaje się, że już znacznie wcześniej, naturalne wychodnie skał rudonośnych mogły stać się miejscem ewolucji dla przybyłych z Tatr przodków obecnej populacji *B. laevigata* w Bolesławiu, która po rozpoczęciu wydobywania rud metali rozprzestrzeniła się na dogodnie dla siebie siedliska terenu górniczego. Podjęte próby datowania czasu dywergencji (rozejścia się) roślin z Tatr i Bolesławia pokazały, że przecięcie genetycznych więzów (przepływu genów) pomiędzy nimi mogło nastąpić w czasie zlodowacenia środkowopolskiego, a więc nawet około 120 000 lat temu. Uzyskany wynik otrzymany na podstawie metody datowania molekularnego można traktować jako prawdopodobny, tym bardziej, że za długim okresem izolacji przemawiają także inne dowody pośrednie (Kropf i in. 2009, Uechtritz 1877, Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020).

Obecność licznych różnic pomiędzy naturalnymi populacjami tatrzańskimi *B. laevigata* a jej populacją z hałdy odpadów galmanowych w Bolesławiu uzasadnia wysunięcie hipotezy o klasyfikacji tych roślin do odrębnego taksonu. Omówione wyżej badania (Wąsowicz i in. 2014, Wierzbicka i in. 2015, 2017, 2020) wykazały, że *B. laevigata* z hałdy w Bolesławiu, od dłuższego już czasu ewoluuje w izolacji od tatrzańskich populacji tego gatunku. Różnice pomiędzy tymi dwiema populacjami są na tyle duże, iż populacji z Bolesławia można nadać rangę podgatunku *B. laevigata* subsp. *woycickii* (Wierzbicka i in. 2020, Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom). Jest to podgatunek reliktowy, mający prawdopodobnie charakter endemiczny. Rośliny te posiadają liczne cechy (wymienione we wcześniejszych akapitach) umożliwiające im wzrost w ekstremalnie trudnych warunkach terenów silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Zatem podgatunek ten jest szczególnie

¹⁸ Markery molekularne – marker inaczej wskaźnik to genetycznie kontrolowana cecha fenotypowa lub też dowolna różnica genetyczna wykorzystywana dla ujawnienia polimorfizmu osobniczego, którą można zidentyfikować metodami analitycznymi.

cenny do dalszych badań mechanizmów tolerancji roślin na metale ciężkie. Wydaje się, że może mieć również praktyczne zastosowanie do rewitalizacji terenów przemysłowych (Muszyńska i in. – Rozdział 7, Wiszniewska i in. – Rozdział 8, niniejszy tom). Biorąc pod uwagę bardzo ograniczony teren występowania *B. laevigata* subsp. *woycickii* jedynie

do hałd rejonu olkuskiego (Bemowska-Kałabun i in. – Rozdział 6, niniejszy tom) i szybkie przekształcania tego terenu, związane z naturalnymi zmianami roślinności, jak i działalnością człowieka (Jędrzejczyk-Korycińska i Szarek-Łukaszewska – Rodział 10, niniejszy tom) istnieje pilna potrzeba ochrony prawnej tych cennych roślin.