



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2011-2012

Invloed van hittestress en metaalstress op bomen

Sofie Goormachtigh

Promotoren: Prof. dr. ir. Kathy Steppe en Prof. dr. ir. Gijs. Du Laing

Tutor: ir. Jochen Hanssens

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Bos- en natuurbeheer

De auteur en de promotoren geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de masterproef te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

De auteur:

Gent, 8 juni 2012

Sofie Goormachtigh

De tutor en promotoren:

Jochen Hanssens

Kathy Steppe

Gijs Du Laing

Woord vooraf

Na 5 jaar studeren aan de Universiteit van Gent stel ik u met voldoening mijn masterthesis voor. Als bijna afgestudeerde Bio-ingenieur (Bos- en natuurbeheer) was het een grote uitdaging om me te verdiepen in onderzoek met betrekking tot de actuele bodemvervuiling en klimaatverandering. Deze masterthesis handelt dan ook over het gecombineerd effect van hittestress en metaalstress op bomen en is een vervolg op de masterproef van ir. J. Hanssens.

Bij het verwezenlijken van deze masterproef werd geregeld beroep gedaan op de vakkundige kennis van de leden van de universiteit van Gent. Hierbij wens ik dan ook uitdrukkelijk enkele mensen mijn oprechte dank te betuigen.

*Vooreerst dank ik mijn promotoren Prof. dr. ir. K. Steppe en Prof. dr. ir. G. Du Laing voor de mogelijkheid en het vertrouwen om deze masterthesis tot een goed einde te brengen. Daarnaast gaat ook een zeer groot dankwoord uit naar mijn begeleider Jochen voor de vele uren waarin hij mij bijstond met al mijn vragen en problemen. Zijn enthousiasme en professionele aanpak hebben een groot aandeel in het uiteindelijke resultaat van dit onderzoek. Ook Joachim Neri verdient mijn dank voor het begeleiden van de chemische analyses in het labo van het *Laboratorium voor Analytische Chemie en Toegepaste Ecochemie*. Verder wens ik ook Nancy De Saeyer van het *Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie* te bedanken voor het uitvoeren van chemische analyses.*

Ook Marlies Christiaens wens ik te bedanken voor de enthousiaste samenwerking tijdens de metingen en labowerk.

Als laatste, maar zeker niet in het minst, bedank ik Jochen Hanssens en Matthias Carchon voor het aandachtige naleeswerk van deze masterthesis.

Sofie Goormachtigh

Gent, 8 juni 2012

Samenvatting

De klimaat- en milieuproblematiek wint steeds meer aan belang en onderzoek over deze thema's neemt sterk toe. Toch is de kennis over het gecombineerd effect van bodemvervuiling en klimaatverandering op bomen beperkt. In dit onderzoek werden experimentele proeven uitgevoerd in de groeikamers van het Laboratorium voor Plantecologie aan de Universiteit van Gent. Hierbij werden de ecofysiologische en fluorescentieparameters gemeten en blad- en bodemstalen genomen voor de bepaling van cadmiumconcentraties. Hiervoor werden 40 populieren (*Populus canadensis* 'Robusta') gebruikt die al dan niet blootgesteld werden aan cadmium en/of hittegolven. Verontreinigde potgrond bestond uit 100 mg Cd/L verse potgrond en gedurende de hittegolf bedroeg de temperatuur 40°C/25°C (dag/nacht). Op deze manier werden acht verschillende behandelingen verkregen waarbij elke behandeling vijf populieren omvat. Er werden twee hittegolven gesimuleerd, één in de lente en één in de zomer. In functie van verschillende ecofysiologische en fluorescentieparameters werden verbanden onderzocht en de respons van *Populus canadensis* op hitte en/of Cd geanalyseerd. De fotosynthesesnelheid van bomen blootgesteld aan Cd lag significant lager dan de fotosynthesesnelheid van bomen die niet blootgesteld werden aan Cd. Deze daling in fotosynthese werd veroorzaakt door schade aan het fotosynthetisch apparaat door Cd en door het inwerken van Cd op de enzymen van de Calvin-Benson cyclus. Gedurende de hittegolven werd de fotosynthesesnelheid ook gereduceerd, maar dit was niet het gevolg van schade aan het fotosynthetisch apparaat door hitte. Lichtenergie werd meer gebruikt voor fotorespiratie en daarnaast werd meer energie onder de vorm van warmte gedissipeerd. Stressbomen leken beter bestand tegen de hittegolven dan controlebomen. Tot slot werd ook de acclimatisatie aan hitte onderzocht. Uit de resultaten van de bruto-fotosynthese kan besloten worden dat controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven het beter doen dan controlebomen blootgesteld aan één hittegolf. Dit werd verklaard door de mogelijks hogere [GSH] in controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven, als gevolg van activatie van het DREB1A gen door de hogere [H₂O₂] veroorzaakt door de eerste hittegolf, die zo voor een betere bescherming tegen de tweede hittegolf zorgt. Stressbomen daarentegen leken geen significante verschillen te tonen in de bruto-fotosynthese, zowel bij stressbomen blootgesteld aan één hittegolf als bij stressbomen blootgesteld aan twee hittegolven. Stressbomen hebben zich mogelijks reeds geacclimatiseerd door de blootstelling aan Cd. Hierdoor hebben ze reeds een hogere [GSH], opnieuw als gevolg van de activatie van het DREB1A gen door hogere [H₂O₂] veroorzaakt door Cd, waardoor stressbomen beter beschermd zijn tegen hitte. Deze [H₂O₂], [GSH] en gen activatie vormen een belangrijk onderwerp voor verder onderzoek.

Lijst van figuren

2.1	Schatting van de wereldgemiddelde <i>radiative forcing</i> door de belangrijkste vertegenwoordigers en mechanismen (IPCC, 2007).	4
2.2	Links: Gemiddelde globale oppervlaktetemperatuur (boven), gemiddeld globaal zeeniveau (midden) en de sneeuwbedekking van de noordelijke hemisfeer (onder). Op de linkerass wordt de afwijking weergegeven relatief ten opzichte van het gemiddelde over de periode 1961-1990. Rechts: Veranderingen in oppervlaktetemperatuur over de periode 1970-2004 (IPCC, 2007).	5
2.3	Gebruik van lichtenergie in het fotosynthetisch apparaat (Schulze et al., 2005).	7
2.4	Fluorescentie in functie van de tijd. F_0 wordt bepaald na donkeradaptatie door het aanschakelen van het meetlicht. Een verzadigingspuls (pijl) induceert de maximale fluorescentie F_M . Vervolgens wordt actinisch licht aangeschakeld wat het fotochemisch elektrontransport op gang brengt en verzadigingspulsen bepalen de fotochemische (qP) en niet-fotochemische quenching (qN) (Van Kooten & Snel, 1990).	8
2.5	Op donkergeadapteerde bladeren wordt de minimum F_0 en maximum F_M waarden gemeten. Op lichtgeadapteerde bladeren wordt de steady state waarde (F_S), de maximum waarde (F'_M) gedurende een verzadigingsflits en de minimum waarde (F'_0) gedurende het uitschakelen van het actinisch licht in combinatie met verrood licht gemeten (LI-COR, 2004).	9
2.6	Moleculaire mechanismen betrokken in de opname en accumulatie van metalen door planten. (a) Metaalionen worden gemobiliseerd door secretie van chelators en door acidificatie van de rhizosfeer. (b) Opname van gehydrateerde metaalionen of metaal-chelaat complexen wordt bemiddeld door verschillende opnamesystemen gevestigd in het plasmamembraan. Binnenin de cel worden metalen gechelateerd en overmatig metaal wordt afgezonderd door transport naar de vacuole (Clemens et al., 2002).	14
3.1	Typische proefopstelling van de uitvoering van het experiment met hittestress en Cd-stress.	22
3.2	Schematische voorstelling van de 2 groeikamers, resp. 23/18°C en 40/25°C (hittegolf) met hun plantenbezetting tijdens de lente en/of zomer.	24

3.3	De LI-6400XT (LI-COR, 2004) (links) en een schematisch overzicht van het stroomschema van de LI-6400XT bij gebruik van de CO ₂ -mixer (LI-COR, 2004) (rechts).	24
3.4	Gemiddeld fotosyntheseverloop van populieren niet blootgesteld aan Cd (links) en populieren blootgesteld aan Cd (rechts).	25
4.1	Verloop van de gemiddelde [Cd] in de bladeren van de stressbomen die niet blootgesteld zijn aan hitte in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd op tijdstippen die overeenkomen met respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf. 1 en 2 wijzen respectievelijk op de eerste hittegolf (lente) en de tweede hittegolf (zomer). De staafjes geven de gemiddelde concentratie van bladeren uit behandeling 2 met de standaardfout weer (n=5 tot 60).	29
4.2	Overzicht van de gemiddelde lichtverzadigde fotosynthese (P_{sat} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en de donkerrespiratie (R; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).	31
4.3	Overzicht van de gemiddelde stomatale geleidbaarheid (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en Water Use Efficiency (WUE; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).	31
4.4	Overzicht van de gemiddelde fotochemische quenching (q_p) en niet-fotochemische quenching (NPQ) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).	33
4.5	Overzicht van de gemiddelde F_V/F_M en $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).	33
4.6	F_0 , F_M , F'_0 en F'_M uitgezet in functie van de tijd tijdens de gesimuleerde hittegolf in de lente. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 20).	34

4.7	Overzicht van de gemiddelde lichtverzadigde fotosynthese (P_{sat} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en de donkerrespiratie (R ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 40).	35
4.8	Overzicht van de gemiddelde stomatale geleidbaarheid (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en Water Use Efficiency (WUE; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 40).	36
4.9	Overzicht van de gemiddelde fotochemische quenching (q_P) en niet-fotochemische quenching (NPQ) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 40).	37
4.10	Overzicht van de gemiddelde F_V/F_M en $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 40).	38
4.11	F_0 , F_M , F'_0 en F'_M uitgezet in functie van de tijd tijdens de gesimuleerde hittegolf in de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 10).	39
4.12	Overzicht van de ecofysiologische parameters P_{bruto} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), R ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), WUE ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) en g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) voor behandeling 5, 6, 7 en 8. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=20 tot 50). . .	40
4.13	Overzicht van de fluorescentieparameters F_V/F_M , q_P , $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en NPQ voor behandeling 5, 6, 7 en 8. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. Significante verschillen tussen de behandelingen tijdens de hittegolf in de zomer worden weergegeven met een letter. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=20 tot 50).	42

4.14 A: F'_V/F'_M uitgezet in functie van de hittegolf in de lente. B: F'_V/F'_M uitgezet in functie van de hittegolf in de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=5 tot 20). 43

Lijst van tabellen

3.1	Overzicht van de acht verschillende behandelingen	22
4.1	Effect van Cd op <i>Populus canadensis</i> . De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de ecofysiologische en de fluorescentieparameters (%), relatief ten opzichte van de controlebomen. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	29
4.2	Effect van Cd en hitte op <i>Populus canadensis</i> . De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	32
4.3	Effect van Cd en hitte op <i>Populus canadensis</i> . De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	34
4.4	Effect van Cd en hitte op <i>Populus canadensis</i> . De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	36
4.5	Effect van Cd en hitte op <i>Populus canadensis</i> . De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	38
4.6	Acclimatisatie van <i>Populus canadensis</i> aan hitte. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de ecofysiologische parameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	41
4.7	Acclimatisatie van <i>Populus canadensis</i> aan hitte. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de fluorescentieparameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$	43

Lijst met afkortingen

A	Assimilatiesnelheid	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]
A_{donker}	Donkerassimilatiesnelheid	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]
ABA	Abcissinezuur	[-]
ATP	Adenosinetriofosfaat	[-]
CAT	Catalase	[-]
Cd	Cadmium	[-]
CO_2	Koolstofdioxide	[-]
DW	Dry weight	[-]
E	Transpiratiesnelheid	[$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]
ETR	Electron Transport Rate	[$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]
F_0	Minimale fluorescentie op donkergeadapteerde bladeren	[-]
F'_0	Minimale fluorescentie	[-]
F_M	Maximale fluorescentie op donkergeadapteerde bladeren	[-]
F'_M	Maximale fluorescentie	[-]
F_S	Steady-state fluorescentie	[-]
F_V	Variabele fluorescentie	[-]
Fe	Ijzer	[-]
g_s	Stomatale geleidbaarheid	[$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]
GSH	Glutathion	[-]
GSH-Px	Glutathion peroxidase	[-]
H_2O_2	Waterstofperoxide	[-]
HSP	Heat Shock Protein	[-]
IC	Inorganic carbon	[mg C/L bodemvocht]
LHC II	Light-harvesting chlorophyll a/b complex II	[-]
NADPH	Gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat	[-]
NPOC	Non-purgeable organic carbon	[mg C/L bodemvocht]
NPQ	Niet-fotochemische quenching	[-]

PSI	Fotosysteem I	[-]
PSII	Fotosysteem II	[-]
ϕ_{CO_2}	Actuele efficiëntie van CO ₂ -fixatie	[-]
ϕ_{PSII}	Actuele efficiëntie van PSII	[-]
$\phi_{\text{PSII,max}}$	Maximale kwantumopbrengst van PSII	[-]
PAR	Fotosynthetisch actieve straling	[$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
P_{bruto}	Bruto-fotosynthesesnelheid	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
P_{net}	Netto-fotosynthesesnelheid	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
P_{sat}	Lichtverzadigde fotosynthesesnelheid	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Q_a	Plastoquinone A	[-]
Q_b	Plastoquinone B	[-]
q_N	Niet-fotochemische quenching	[-]
q_P	Fotochemische quenching	[-]
R	Donkerrespiratie	[$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
ROS	Reactive Oxygen Species	[-]
Rubisco	Ribulose-1,5-bifosfaat carboxylase/oxygenase	[-]
RuBP	Ribulose-1,5-bifosfaat	[-]
SOD	Superoxide dismutase	[-]
S0	Grondtoestand	[-]
S1	Singlet 1 toestand	[-]
S3	Singlet 3 toestand	[-]
S4	Singlet 4 toestand	[-]
T1	Triplet toestand	[-]
VPD	Vapour Pressure Deficit	[kPa]
WUE	Water Use Efficiency	[$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Zn	Zink	[-]

Inhoudsopgave

Lijst van figuren	iv
Lijst van tabellen	viii
1 Inleiding	1
2 Literatuurstudie	3
2.1 Klimaatverandering	3
2.1.1 Algemeen	3
2.1.2 Effect van een verhoogde [CO ₂] in de atmosfeer op C ₃ -planten	5
2.1.3 Effect van een verhoogde temperatuur en hitte op ecosystemen	6
2.1.4 Effect van een verhoogde temperatuur en hitte op C ₃ -planten	6
2.1.5 Acclimatisatie aan hitte	12
2.2 Cadmiumtoxiciteit	12
2.2.1 Algemeen	12
2.2.2 Mechanismen: opname, transport, detoxificatie, tolerantie	13
2.2.3 Effecten van Cd-stress	16
2.2.4 Invloed van omgevingscondities	18
2.3 Gecombineerd effect van Cd en hitte	19
3 Materiaal en methoden	21
3.1 Proefopzet	21
3.2 Plantenmateriaal	22
3.3 Experiment	23
3.4 Fotosynthese en chlorofyl-A fluorescentie	24
3.5 Cadmiumbepalingen	26
3.6 Bodemkarakterisatie	26
3.7 Statistische verwerking	27

4 Resultaten	28
4.1 Respons van <i>Populus canadensis</i> op Cd	28
4.2 Respons van <i>Populus canadensis</i> op hitte en Cd	30
4.2.1 Respons van <i>Populus canadensis</i> op een gesimuleerde hittegolf in de lente	30
4.2.2 Respons van <i>Populus canadensis</i> op een gesimuleerde hittegolf in de zomer	35
4.3 Acclimatisatie van <i>Populus canadensis</i> aan hitte	39
5 Discussie	44
5.1 Respons van <i>Populus canadensis</i> op Cd	44
5.2 Respons van <i>Populus canadensis</i> op hitte en Cd	46
5.3 Acclimatisatie van <i>Populus canadensis</i>	50
5.4 Beperkingen van het experiment	52
6 Conclusies	54
A Materiaal en methoden	
Spiken potgrond met Cd	56
B Materiaal en methoden	
Destructieprotocol bladstalen	58
C Materiaal en methoden	
Destructieprotocol bodemstalen	60
C.1 Bodemstalen gespiked met Cd	60
C.2 Bodemstalen zonder Cd	61
Bibliografie	62

1

Inleiding

De meest recente klimaatmodellen tonen aan dat de gemiddelde temperatuur zal stijgen en dat de frequentie van klimatologische extremen zoals hittegolven zal toenemen. De klimaatverandering is voornamelijk te wijten aan antropogene activiteiten waardoor de atmosferische CO₂-concentratie ([CO₂]) sterk toeneemt. De respons van bomen op een verhoogde [CO₂] en temperatuur werd reeds uitgebreid onderzocht wat geleid heeft tot een brede kennis rond dit onderwerp. Antropogene activiteiten, voornamelijk industrie, zijn echter ook verantwoordelijk voor bodemverontreiniging met zware metalen. Onderzoek omtrent de invloed van deze zware metalen op bomen en het potentieel van bomen in fyto-remediatie werd reeds veelvuldig uitgevoerd.

De kennis over het gecombineerd effect van zware metalen en hitte op bomen is echter beperkt. In deze masterproef wordt een antwoord gezocht op wat de invloed van het gecombineerd effect van hittestress en metaalstress op bomen is. In de masterthesis van Hanssens (2010) werden trends gevonden die erop wijzen dat bomen blootgesteld aan zware metalen beter bestand zouden zijn tegen effecten van hoge temperaturen. De eerste doelstelling van deze masterproef is dan ook het bevestigen van dit vermoeden met behulp van meerdere controlebomen en stressbomen. Een tweede doelstelling is de acclimatisatie van bomen aan hitte onderzoeken.

Om een antwoord te vinden op deze onderzoeksvragen werden 40 populieren (*Populus canadensis* 'Robusta') gebruikt die al dan niet blootgesteld werden aan cadmium en/of hittegolven. Hierdoor worden acht verschillende behandelingen verkregen waarbij elke behandeling vijf populieren omvat. Er werden twee hittegolven gesimuleerd op verschillende tijdstippen en kunnen gezien worden als een hittegolf in de lente en een hittegolf in de zomer. Voor en na elke hittegolf werden de bomen onderworpen aan respectievelijk een controleperiode en een herstelperiode.

In het eerstvolgende hoofdstuk, *hoofdstuk 2*, wordt een overzicht gegeven van de relevante literatuur voor deze masterproef. Vervolgens wordt in *hoofdstuk 3* de proefopzet en de gebruikte meettechnieken toegelicht. *Hoofdstuk 4* presenteert de resultaten van het experimenteel onderzoek en *hoofdstuk 5* bespreekt uitgebreid deze resultaten. Tot slot worden in *hoofdstuk 6* de belangrijkste eindresultaten herhaald en enkele conclusies geformuleerd.

2

Literatuurstudie

2.1 Klimaatverandering

2.1.1 Algemeen

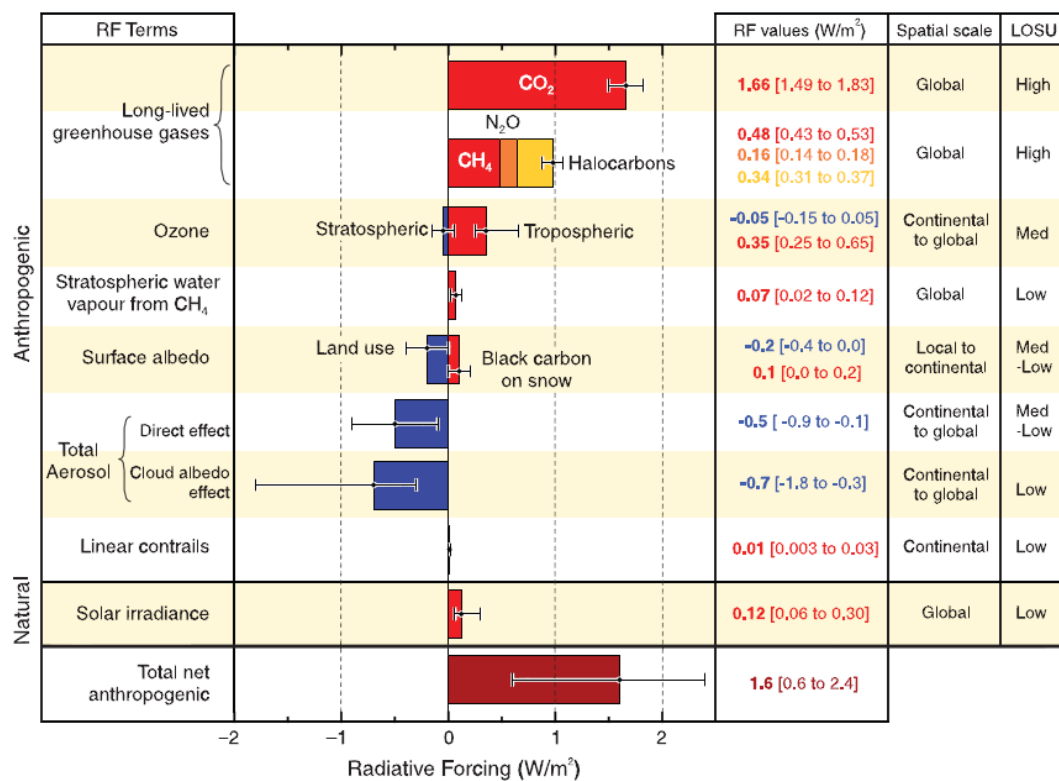
Het klimaat verandert doordat de gemiddelde temperatuur op aarde stijgt. Klimaatverandering en de impact ervan werd reeds uitgebreid onderzocht en toekomstperspectieven werden vastgesteld (IPCC, 2007).

Oorzaken

Zowel natuurlijke als antropogene oorzaken zijn verantwoordelijk voor klimaatverandering. Hierbij speelt de uitstoot van broeikasgassen een belangrijke rol. Koolstofdioxide (CO_2) is het belangrijkste antropogene broeikasgas en de globale atmosferische concentratie van CO_2 ($[\text{CO}_2]$) is sinds de pre-industriële tijden gestegen van 280 ppm tot 379 ppm in 2005. De jaarlijkse emissie van CO_2 is tussen 1970 en 2004 toegenomen met 80% en vertegenwoordigt 77% van de totale antropogene broeikasgasemissie in 2004. Over de periode van 1995 tot en met 2005 is de jaarlijkse toename sterk gestegen met ongeveer 1,9 ppm per jaar (IPCC, 2007). De National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) meldde in 2011 dat de $[\text{CO}_2]$ in de atmosfeer toegenomen was met een snelheid van 2,06 ppm per jaar. Volgens de NOAA is de atmosferische

[CO₂] momenteel 393,53 ppm (Conway & Tans, 2012). De globale stijging in CO₂ concentraties wordt voornamelijk veroorzaakt door het gebruik van fossiele brandstoffen en verandering in landgebruik. Verder spelen ook CH₄, N₂O, ozon en aërosolen een rol (IPCC, 2007).

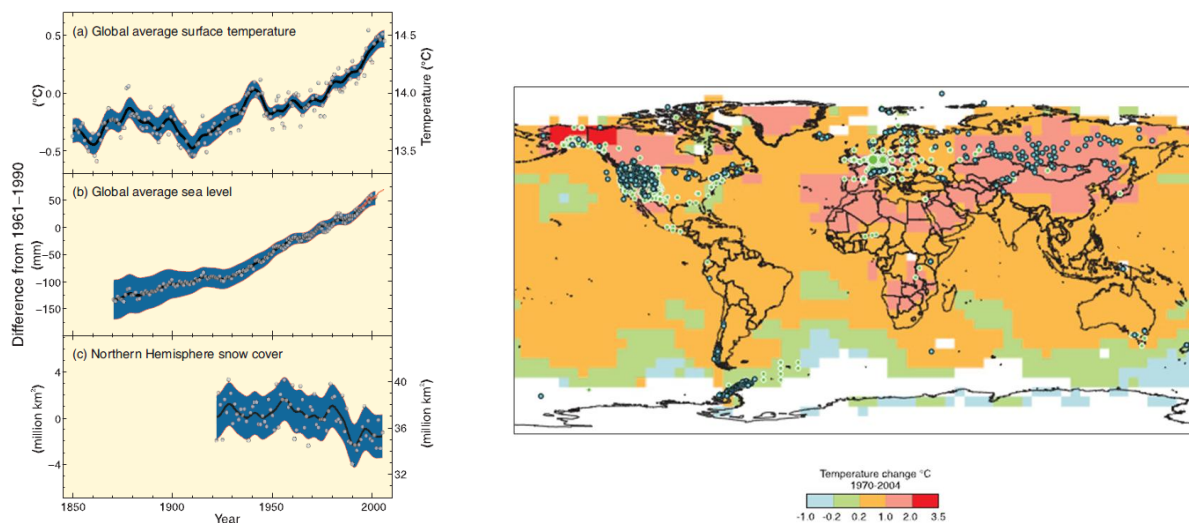
Een wijziging in de concentratie van CO₂ in de atmosfeer kan leiden tot een wijziging in de energiebalans van de aarde. Dit effect wordt *radiative forcing* genoemd. CO₂ en andere broeikasgassen in de atmosfeer absorberen een deel van de infraroodstraling dat door het aardoppervlak wordt uitgezonden en zenden een deel daarvan terug naar het aardoppervlak waardoor deze opwarmt. De toename aan atmosferisch CO₂ zorgt voor een *radiative forcing* van +1,66 Wm⁻² (IPCC, 2007). Figuur 2.1 geeft een overzicht van de atmosferische componenten die bijdragen tot *radiative forcing*.



Figuur 2.1: Schatting van de wereldgemiddelde *radiative forcing* door de belangrijkste vertegenwoordigers en mechanismen (IPCC, 2007).

Observaties en toekomstperspectieven

Uit het rapport van het Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) blijkt dat de opwarming van het klimaat onmiskenbaar is. Dit is af te leiden uit stijgingen van de gemiddelde lucht- en oceaantemperatuur, het wijdverspreide smelten van sneeuw en ijs en het stijgen van het gemiddelde zeeniveau (Figuur 2.2).



Figuur 2.2: Links: Gemiddelde globale oppervlaktetemperatuur (boven), gemiddeld globaal zeeniveau (midden) en de sneeuwbedekking van de noordelijke hemisfeer (onder). Op de linkeras wordt de afwijking weergegeven relatief ten opzichte van het gemiddelde over de periode 1961-1990. Rechts: Veranderingen in oppervlaktetemperatuur over de periode 1970-2004 (IPCC, 2007).

De globale gemiddelde temperatuur stijgt volgens een lineair verband en stijgt sterker in meer noordelijk gelegen gebieden (Figuur 2.2). Tijdens de laatste eeuw is de globale opwarming in twee fases gebeurd. Van 1910 tot 1940 was er een toename van de temperatuur met $0,35^{\circ}\text{C}$ en van 1970 tot nu een toename met $0,55^{\circ}\text{C}$. De laatste decennia heeft er zich dus een versnelling voorgedaan waardoor 11 van de 12 jaren gedurende 1995-2006 behoren tot de warmste jaren sinds 1850.

Veel natuurlijke systemen worden beïnvloed door de regionale klimaatverandering, in het bijzonder door stijgende temperaturen. Deze opwarming beïnvloedt sterk de terrestrische biologische systemen door vroegere lentes en bladontvouwing wat resulteert in een langer groeiseizoen. Verder zorgt de opwarming voor een opwaartse verschuiving van plantensoorten (IPCC, 2007). In veel gebieden is de lengte van of het aantal hittegolven gestegen sinds het midden van de 20ste eeuw (IPCC, 2012). Volgens IPCC (2012) is het zeer waarschijnlijk dat de lengte, frequentie, en/of intensiteit van hittegolven zal stijgen in de meeste gebieden (IPCC, 2012).

2.1.2 Effect van een verhoogde $[\text{CO}_2]$ in de atmosfeer op C_3 -planten

In deze thesis werden populieren gebruikt in de experimenten om het gecombineerd effect van hitte en Cd te onderzoeken. Populieren zijn C_3 -planten en zijn zeer geschikt voor fyto-remediatie (zie sectie 2.2.1). In wat volgt zullen we ons dus steeds beperken tot C_3 -planten.

Een verhoogde $[\text{CO}_2]$ in de atmosfeer zorgt voor een stijging van de fotosynthese in C_3 -planten omdat Ribulose-1,5-bifosfaat carboxylase/oxygenase (Rubisco) niet substraat-verzadigd is en oxygenatie geïnhibeerd wordt. Bij verhoogde $[\text{CO}_2]$ zal het fotosynthetisch elektrontransport

bestemd voor CO₂-assimilatie hier proportioneel mee stijgen, terwijl het elektronentransport voor zuurstof geïnhibeerd wordt. Daarentegen veroorzaakt groei onder verhoogde [CO₂] op lange termijn een daling in Rubisco-activiteit, wat de stijging in elektronentransport voor CO₂- en O₂-fixatie beperkt. Wanneer de daling in Rubisco-activiteit sterk is, zal het elektronentransport lager zijn dan bij planten die groeien onder de huidige [CO₂]. In de toekomst kan een verhoogde [CO₂] en temperatuur een positief effect op de fotochemische efficiëntie hebben, ondanks de daling in C-assimilatie capaciteit. Een hogere [CO₂] kan immers de ongunstige effecten van hoge temperaturen op fotosynthese verzachten (Gutiérrez et al., 2009).

2.1.3 Effect van een verhoogde temperatuur en hitte op ecosystemen

Volgens Ciais et al. (2005) zal de klimaatopwarming de plantengroei versterken in gematigde ecosystemen en de C-sequestratie doen toenemen. Hittegolven hebben echter in tegenstelling tot een geleidelijke opwarming een negatief effect op de plantengroei. Voor de zomer van 2003 werd de daling in bruto primaire productie over Europa geschat op 30%. De reductie in productiviteit in Oost- en West-Europa kan verklaard worden door een regenvaltekort en extreme zomerhitte. Ook daalt de ecosysteem respiratie samen met de bruto primaire productie i.p.v. te verhogen met de temperatuurstijging. Een stijging in toekomstige droogtes kan de gematigde ecosystemen veranderen in C-bronnen ondanks het feit dat de ecosysteem respiratie daalt. Dit is te verklaren door een sterkere daling in de bruto primaire productie dan in de ecosysteem respiratie waardoor de ecosysteemrespiratie groter wordt dan de bruto primaire productie. Het ecosysteem wordt dus een netto-bron van CO₂ en kan zo bijdragen tot een positieve feedback op de opwarming van het klimaat door een daling van de koolstofopname (Ciais et al., 2005).

2.1.4 Effect van een verhoogde temperatuur en hitte op C₃-planten

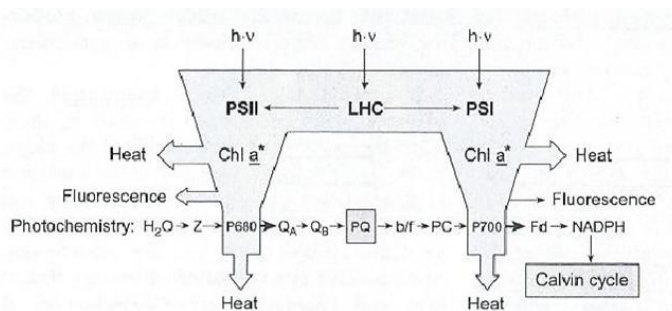
Chlorofyl-A fluorescentie metingen zijn een zeer geschikte techniek om fotosynthese en stress in planten te onderzoeken. Fluorescentieparameters kunnen gebruikt worden om veranderingen in de fotochemische reacties van fotosysteem II (PSII), het lineair elektronentransport en de CO₂-assimilatie te evalueren (Baker, 2008). Daarom wordt eerst de chlorofyl-A fluorescentie besproken vooraleer wordt ingegaan op de effecten van hittestress en acclimatisatie.

Chlorofyl-A fluorescentie en fotosynthese

Wanneer een chlorofylmolecule belicht wordt door fotosynthetisch actieve straling, kan de lichtenergie overgedragen worden op een elektron. Door absorptie van een blauw foton wordt het geëxciteerde elektron naar de singlet 3 (S3) of de singlet 4 (S4) toestand gebracht, terwijl bij absorptie van een rood foton het elektron geëxciteerd wordt naar de singlet 1 (S1) toestand. Echter, na 10⁻¹⁴ tot 10⁻¹³ seconden valt het elektron van S4 of S3 terug naar S1. Deze tijdsduur is te kort voor fotosynthese zodat de deactivatie-energie omgezet wordt in warmte. Vervolgens valt S1 terug naar de grondtoestand S0. Hierbij komt energie vrij die kan gebruikt worden voor resonantie, fotochemische reacties, fluorescentie, fosforescentie en warmte. Resonantie is de transfer van excitatie-energie naar een naburige chlorofyl-A molecule. Bij fotochemische

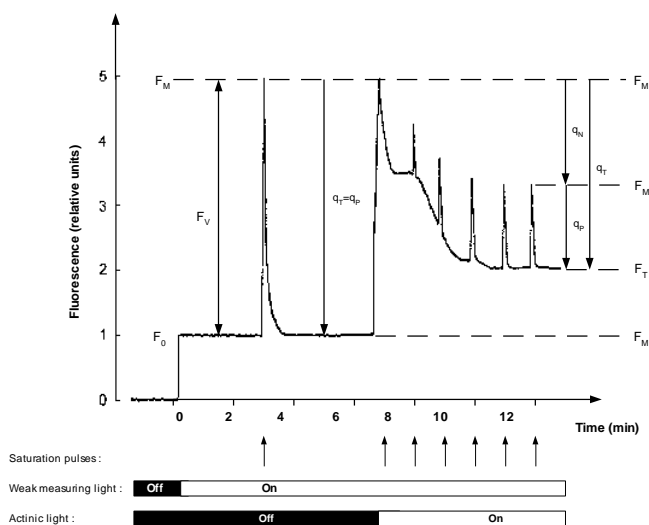
reacties wordt het hoogenergetisch elektron doorgegeven aan een elektronenacceptor die deel uitmaakt van de lichtreacties van de fotosynthese. Fluorescentie is straling die in het blad zelf gecreëerd wordt wanneer de geëxciteerde elektronen niet deelnemen aan de andere processen (Steppe, 2011). Er is een klein verlies aan energie bij het terugvallen van S1 naar S0 waardoor de fluorescentiestraling een langere golflengte heeft dan het geabsorbeerde foton. Dit fenomeen is gekend als de *Stokes shift*. Slechts 1 à 2 % van de geabsorbeerde energie gaat naar fluorescentie (Maxwell & Johnson, 2000). Fosforescentie wordt steeds vooraf gegaan door intersysteem crossing waarbij een elektron overgaat naar de triplet (T1) toestand, die kan leiden tot de vorming van een sterk oxiderende singlet zuurstof. Fosforescentie komt minder vaak voor dan fluorescentie (Steppe, 2011; Schulze et al., 2005).

De voornaamste bestemmingen van de geabsorbeerde lichtenergie zijn fotosynthese, warmte en fluorescentiestraling (Figuur 2.3). Deze drie processen treden in competitie met elkaar zodat een stijging in efficiëntie van één component zal resulteren in een daling van de andere twee componenten. Door de fluorescentiestraling te meten, kan dus informatie over veranderingen in de efficiëntie van fotosynthese en warmteafvoer verkregen worden (Maxwell & Johnson, 2000).



Figuur 2.3: Gebruik van lichtenergie in het fotosynthetisch apparaat (Schulze et al., 2005).

Wanneer een donkergeadapteerd blad wordt blootgesteld aan actinisch licht, voldoende intens om de fotosynthese op gang te brengen, zal er fluorescentiestraling worden uitgezonden. De efficiëntie van de verschillende processen die in competitie treden met elkaar variëren in de tijd zodat het uitgezonden fluorescentiesignaal een kenmerkend patroon in de tijd veroorzaakt. Dit typisch verloop in de tijd staat bekend als het *Kautsky effect* of de fluorescentie inductie curve (Figuur 2.4). Het wordt gekenmerkt door een snelle kinetiek (0-0,5 sec) geassocieerd met processen ter hoogte van PSII en een trage kinetiek (0,5 sec-30 min) gekoppeld aan processen in de thylakoïdmembranen en metabolische processen in het stroma van de chloroplast (Steppe, 2011).

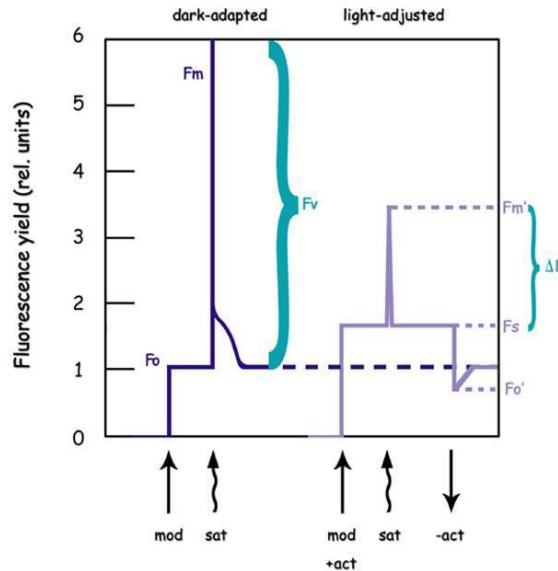


Figuur 2.4: Fluorescentie in functie van de tijd. F_0 wordt bepaald na donkeradaptatie door het aanschakelen van het meetlicht. Een verzadigingspuls (pijl) induceert de maximale fluorescentie F_M . Vervolgens wordt actinisch licht aangeschakeld wat het fotochemisch elektrontransport op gang brengt en verzadigingspulsen bepalen de fotochemische (qP) en niet-fotochemische quenching (qN) (Van Kooten & Snel, 1990).

Wanneer een blad in het donker gehouden wordt, zal de primaire elektronenacceptor van PSII (Q_a) maximaal geoxideerd worden. Blootstelling van een donkergeadapteerd blad aan licht met een intensiteit die te laag is om de fotosynthese op gang te brengen, resulteert in stijging van het fluorescentiesignaal naar een minimaal fluorescentieniveau F_0 . De intensiteit van het licht moet voldoende laag zijn om te verzekeren dat Q_a maximaal geoxideerd blijft. Vervolgens wordt het blad blootgesteld aan een korte verzadigingspuls, waardoor Q_a maximaal gereduceerd wordt en het maximale fluorescentieniveau F_M bereikt wordt (Figuur 2.5) (Baker, 2008). De reden hiervoor is dat Q_a geen nieuw elektron kan ontvangen zolang het het vooraf aangenomen elektron niet heeft doorgegeven aan de volgende elektronenacceptor Q_b . Hierdoor gaat de fotochemische efficiëntie tijdelijk dalen, wat leidt tot een toename in fluorescentie. Wanneer Q_a zijn elektronen doorgeeft aan Q_b daalt het fluorescentiesignaal opnieuw, doordat de reactiecentra opnieuw in geoxideerde toestand verkeren. Uiteindelijk raken zowel Q_a als Q_b volledig gereduceerd zodat nu alle reactiecentra gereduceerd zijn waardoor geen fotochemische reacties kunnen worden verricht (Steppe, 2011).

De waarde voor F_0 en F_M wordt bepaald op een donkergeadapteerd blad, respectievelijk door het aanschakelen van het meetlicht en het uitzenden van een verzadigende lichtpuls. Nadat het blad wordt blootgesteld aan actinisch licht kunnen de waarden voor F'_M en F'_0 gemeten worden respectievelijk bij een verzadigingspuls en het uitschakelen van het actinisch licht in combinatie met verrood licht (Figuur 2.5). De steady-state fluorescentie (F_S) is de fluorescentie wanneer de protonengradiënt verdwijnt door een grotere activiteit van de Calvin cyclus wat de reoxidatie van protonenacceptoren versneld. Deze F_S wordt gemeten op een lichtgeadapteerd blad net voor een verzadigingspuls (Steppe, 2011).

Het fluorescentiesignaal kan dalen als gevolg van fluorescentie quenching. Er bestaan twee vormen van quenching: fotochemische quenching (q_P) en niet-fotochemische quenching (q_N). q_P is het doorgeven van elektronen via de elektronentransportketen en q_N is de afvoer van energie onder de vorm van warmte (Sayed, 2003).



Figuur 2.5: Op donkergeadapteerde bladeren wordt de minimum F_0 en maximum F_M waarden gemeten. Op lichtgeadapteerde bladeren wordt de steady state waarde (F_S), de maximum waarde (F'_M) gedurende een verzadigingsflits en de minimum waarde (F'_0) gedurende het uitschakelen van het actinisch licht in combinatie met verrood licht gemeten (LI-COR, 2004).

Het verschil tussen F_M en F_0 wordt gedefinieerd als de variabele fluorescentie F_V (vergelijking 2.1). De ratio F_V/F_M is een maat voor de maximale quantumopbrengst van de fotochemische reacties die optreden ter hoogte van PSII ($\phi_{PSII,max}$) (vergelijking 2.2). F_V/F_M heeft een waarde van ongeveer 0,83 voor niet-gestresseerde bladeren. Wanneer planten blootgesteld worden aan abiotische of biotische stress, worden regelmatig dalingen in F_V/F_M geobserveerd. F_V/F_M metingen geven dus via een snelle en simpele manier een indicatie van stress (Baker, 2008).

$$F_V = F_M - F_0 \quad (2.1)$$

$$\phi_{PSII,max} = \frac{F_V}{F_M} \quad (2.2)$$

Vergelijking 2.3 geeft de niet-fotochemische quenching (q_N) weer. Soms wordt de niet-fotochemische quenching op een alternatieve manier uitgedrukt als de NPQ (vergelijking 2.4). q_P (vergelijking 2.5) is een maat voor de fractie reactiecentra die zich in geoxideerde toestand bevinden. De actuele efficiëntie van de fotochemische reacties ter hoogte van PSII

(ϕ_{PSII}) wordt weergegeven door vergelijking 2.6. De actuele efficiëntie van de CO₂-fixatie (ϕ_{CO_2}) wordt weergegeven door vergelijking 2.7 waarbij A de assimilatie en A_{donker} de assimilatie in het donker weergeeft en beide parameters worden uitgedrukt in $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. De factor 0,84 in deze vergelijking geeft de fractie van de invallende PAR-straling die wordt geabsorbeerd weer. De ETR geeft het actuele lineaire elektrontransport (J) weer uitgedrukt in $\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ (vergelijking 2.8). In deze vergelijking weerspiegelt de factor 0,5 het feit dat het transport van één elektron twee fotonen vereist en de factor 0,84 geeft opnieuw de fractie van de invallende PAR-straling die wordt geabsorbeerd (LI-COR, 2004; Steppe, 2011).

$$qN = \frac{F_M - F'_M}{F_M - F'_0} \quad (2.3)$$

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} \quad (2.4)$$

$$qP = \frac{F'_M - F_S}{F'_M - F'_0} \quad (2.5)$$

$$\phi_{PSII} = \frac{F'_V}{F'_M} * qP \text{ met } F'_V/F'_M = \frac{F'_M - F'_0}{F'_M} \quad (2.6)$$

$$\phi_{CO_2} = \frac{A - A_{donker}}{0,84 * PAR} \quad (2.7)$$

$$ETR = \phi_{PSII} * 0,84 * PAR * 0,5 \quad (2.8)$$

De fotosynthese bestaat uit licht- en donkerreacties. De lichtreacties zetten de stralingsenergie om naar chemische energie onder de vorm van NADPH en ATP. De elektrontransportketen van het Z-schema zorgt voor de reductie van NADP⁺ naar NADPH, terwijl ATP gevormd wordt via het ATP-synthasecomplex. De drijvende kracht van dit ATP-synthasecomplex is de protonengradiënt over het thylakoïdmembraan dat gevormd wordt door zowel het cyclisch als het lineaire elektrontransport. De donkerreacties staan in voor de CO₂-assimilatie waarbij de energie gebruikt wordt die geproduceerd werd gedurende de lichtreacties. Bij C₃-planten gebeurt de CO₂-assimilatie door toedoen van Rubisco in de Calvinyclus. De donkerreacties worden gedreven door enzymen en zijn dus sterk temperatuursgevoelig (Steppe, 2011; Zhu et al., 2008).

Effecten van hittestress

Planten worden beïnvloed door hitte doordat de fotosynthese zeer gevoelig is aan hittestress. Bij gematigde hittestress (35-40°C) loopt het PSII meestal geen schade op, maar toch kan de fotosynthetische capaciteit gereduceerd worden tot bijna nul. Dit kan verklaard worden door het feit dat de fotorespiratie sneller toeneemt met de temperatuur dan fotosynthese. De reductie van de fotosynthese is echter groter dan kan verklaard worden door gestimuleerde fotorespiratie. Hittestress beïnvloedt ook de thylakoïdreacties, rubiscoactivatie, productie van reactieve oxygen species (ROS), niet-fotochemische quenching en chlorofylgehalte. Deze effecten van hittestress worden verder uiteengezet (Sharkey, 2005).

Fotorespiratie

Fotorespiratie is een vorm van respiratie die door licht wordt gestimuleerd. Het is een gevolg van de oxygenase-activiteit van Rubisco waardoor O_2 in plaats van CO_2 reageert met ribulose-1,5-bifosfaat (RuBP) (Sharkey, 2005). Dit proces verlaagt de efficiëntie van fotosynthese zowel door een hoger verbruik van ATP als door het vrijstellen van CO_2 . Dit verlies aan efficiëntie stijgt met de temperatuur (Zhu et al., 2008). Bij een $[CO_2]$ van 380 ppm en een $[O_2]$ van 21% zou volgens Zhu et al. (2008) de maximale efficiëntie van de omzetting van energie in biomassa van C_3 -planten dalen met 49% bij 30°C. Oberhuber & Edwards (1993) toonde aan dat ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} toeneemt in *F. pringlei* bij stijgende temperaturen. In C_3 -planten is een stijgende ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} ratio bij stijgende temperatuur een indicator voor fotorespiratie (Oberhuber & Edwards, 1993).

Thylakoïdreacties

Hitte veroorzaakt een hogere fluiditeit van de membranen, een hogere protonengeleidbaarheid en een hoger cyclisch elektrontransport rond PSI. Als gevolg hiervan ontstaan er thylakoïdmembraanlekken die voorkomen kunnen worden door de inductie van zeaxanthin synthese (Sharkey, 2005; Haldimann & Feller, 2005). Daarnaast kan hitte schade veroorzaken aan het zuurstofvormend complex van PSII zodat andere elektronendonoren in plaats van water eveneens elektronen kunnen geven aan PSII (Wahid et al., 2007; Haldimann & Feller, 2005). Hitte kan ook interfereren met de elektrontransfer tussen de reactiecentra van PSII (Haldimann & Feller, 2005).

Activatie van rubisco

Hitte zorgt voor een lagere Rubisco-activiteit en deactivatie van Rubisco aangezien Rubisco hittelabiel is (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004). Carmo-Silva & Salvucci (2011) onderzochten de respons van de activase-activiteit op hoge temperaturen in bladeren van de zandraket (*Arabidopsis thaliana*), de huttentut (*Camelina sativa*), de tabakspant (*Nicotiana tabacum*) en de katoenplant (*Gossypium*). Bij temperaturen boven de 32,5°C werd er een duidelijke daling in activase-activiteit waargenomen in zowel zandraket als in huttentut. De temperaturen die corresponderen met een volledige inhibitie van de activase-activiteit waren 38 en 40°C voor respectievelijk huttentut en zandraket en 43°C voor de tabakspant en de katoenplant (Carmo-Silva & Salvucci, 2011).

Reactive oxygen species (ROS)

Hittestress kan oxidatieve stress veroorzaken wat resulteert in de productie van ROS zoals O_2^- , H_2O_2 en OH^\cdot . Door reactie met deze ROS worden pigmenten en membranen beschadigd waardoor membranen hun semi-permeabiliteit verliezen (Wahid et al., 2007). Cd induceert ook de productie van ROS en in sectie 2.2.3 worden de gevolgen van ROS en verderdigingsmechanismen meer in detail besproken.

Niet-fotochemische quenching

Salvucci & Crafts-Brandner (2004) toonden aan dat NPQ sterk toeneemt in bladeren die blootgesteld zijn aan hittestress. Dit wil zeggen dat er onder hittestress een verschuiving gebeurt naar het verlies van energie onder de vorm van warmte.

2.1.5 Acclimatisatie aan hitte

Acclimatisatie aan hitte is een genetisch gecontroleerd proces dat geactiveerd wordt door blootstelling aan hoge, maar niet dodelijke temperaturen (Yuan et al., 2011). De redox in de organellen en het ROS metabolisme in chloroplasten en mitochondria zijn bronnen voor signalisatie. Gedurende stresscondities speelt deze signalisatie een belangrijke rol in de acclimatisatie van planten (Suzuki et al., 2012). Acclimatisatie aan hitte kan zeer snel plaats vinden. Op hete dagen is hiteresistentie groter in de namiddag en avond dan in de ochtend. Om planten af te harden moet de temperatuur hoog genoeg zijn om een stressreactie in het protoplasma uit te lokken. Dit is normaal gezien het geval vanaf temperaturen boven 35°C bij de meeste terrestrische planten. Zeer snelle acclimatisatie aan hitte gebeurt via specifieke heat-shock proteïns (HSPs) (Larcher, 2003). De meeste HSPs zijn moleculaire chaperones en zijn onder normale omstandigheden in zeer kleine hoeveelheden aanwezig (Schulze et al., 2005). Gedurende stresscondities zijn HSPs binnen het uur gecodeerd door de celnucleus en vervolgens in het cytosol gesynthetiseerd en naar de chloroplast en mitochondria getransporteerd. De rol van HSPs in hittetolerantie blijkt de stabilisering van chromatinestructuren en -membranen en het bevorderen van herstelmechanismen te zijn (Larcher, 2003).

Yuan et al. (2011) onderzocht acclimatisatie aan hitte door zaailingen van *Freesia hybrida* vooraf bloot te stellen aan hittestress bij 38°C voor 6 uur met een herstelperiode bij 22°C voor 72 uur. De *Freesia* zaailingen verdedigden zich tegen hittestress via een fysiologische respons, zoals activatie van antioxidant enzymen en accumulatie van proline en oplosbare suiker. In het experiment werd een significante stijging in de activiteit van antioxidant enzymen waargenomen. Dit toont aan dat hoge temperaturen antioxidant enzymen activeren om ROS op te ruimen (Yuan et al., 2011).

Een relatieve trage acclimatisatie aan hitte is de verandering in de samenstelling van vetzuren (enkele uren tot enkele dagen). Tussen 20 en 40°C stijgt het aandeel verzadigde vetzuren waardoor het aantal hydrofobe interacties tussen naburige vetzuren stijgt en dus de rigiditeit van het membraan vergroot. Op korte termijn (minuten tot uren) is de membraanfluiditeit gestabiliseerd door snelle productie van zeaxanthin die een stijging in de membraan hydrofobiciteit realiseert. De hoeveelheid zeaxanthin stijgt door een hoge pH gradiënt die gevormd wordt door cyclische fotofosforylatie (Sage & Kubien, 2007).

2.2 Cadmiumtoxiciteit

2.2.1 Algemeen

Cadmium (Cd) is een niet-essentieel zwaar metaal en wijdverspreid door antropogene activiteiten. Het is één van de meest gevaarlijke zware metalen door zijn hoge mobiliteit en het vertonen van toxische effecten bij reeds lage concentraties (Das et al., 1997). Te hoge concentraties aan Cd ([Cd]) in het milieu zijn schadelijk voor de gezondheid van de mens aangezien Cd opgenomen wordt door planten en zo via de voedselketen in de mens terecht komt. Hoge [Cd] in de bodem zijn fytotoxisch.

Om zware metalen uit de bodem te halen kan gebruik gemaakt worden van planten. Remediatie

van vervuilde bodems met gebruik van planten wordt fytoextractie genoemd (He et al., 2011). Men maakt verder een onderscheid tussen fytoextractie en fytostabilisatie. Bij fytoextractie worden planten gebruikt om de zware metalen op te nemen en bij fytostabilisatie worden planten gebruikt om de mobiliteit en biobeschikbaarheid van zware metalen te reduceren (Gu et al., 2007; Verheyen, 2011). De ideale plant voor fytoextractie heeft een snelle groei, een hoge biomassa, een diep wortelstelsel, is gemakkelijk te oogsten en tolereert en accumuleert een reeks zware metalen in bovengrondse oogstbare delen. Geen enkele plant voldoet echter aan al deze eisen (Clemens et al., 2002). De populier bevat wel een groot aantal van deze eigenschappen en is daarom zeer geschikt voor fytoextractie. De grootste beperking bij populier is dat deze zich bij de opname van zware metalen beperkt tot Cd en Zn (Verheyen, 2011). De Cd^{2+} influx in de wortels bij populier is zeer hoog en saturatie treedt pas na zeer lange tijd op (He et al., 2011). In deze thesis heeft men dus gekozen voor het wijdverspreide zwaar metaal Cd en de mogelijk oplossing die populier kan bieden voor Cd verontreinigde bodems. Bovendien zijn er reeds trends vastgesteld in de respons van populier op het gecombineerd effect van Cd en hitte. Deze trends wijzen op een positief effect op de plantengroei wat van groot belang kan zijn in de huidige klimaatverandering (Hanssens, 2010).

Planten blootgesteld aan Cd vertonen een reeks symptomen en de gevoeligheid voor Cd varieert volgens soorten en variëteiten. Veel voorkomende symptomen zijn bladopkrulling, chlorosis, necrosis, daling in chlorofylconcentratie en groeiachterstand (Gu et al., 2007). Wanneer een plant aan chlorosis lijdt, produceert de plant te weinig chlorofyl. Chlorosis ontstaat doordat Cd de opname van Fe onderdrukt. Volgens Das et al. (1997) werd de opname van Cd gereduceerd bij een stijgende pH (Das et al., 1997). Gu et al. (2007) stelden een daling in de fotosynthese van populieren vast door een daling in fotosynthetische pigmenten, stomatale geleidbaarheid en transpiratie (Gu et al., 2007). Daarnaast veroorzaakt Cd enzyminhibitie door eiwitdenaturatie. Verder zorgt de hoge [Cd] in de bodem voor een lagere bodemactiviteit en wordt de bodemdecompositie en bodemrespiratie belemmerd (Das et al., 1997).

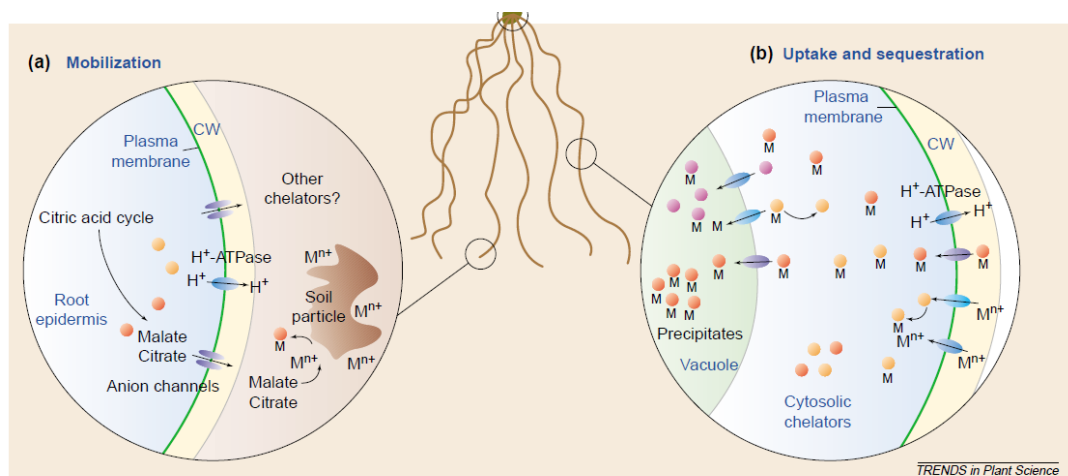
2.2.2 Mechanismen: opname, transport, detoxificatie, tolerantie

Planten hebben geen perfecte controle over welke elementen ze opnemen, waardoor ze ook niet-essentiële elementen opnemen en accumuleren zoals Cd (Clemens et al., 2002). Cd kan via de apoplastische en/of symplastische weg in de wortelcellen terecht komen (He et al., 2011). Deze kan gemakkelijk getransporteerd worden in de vorm van metallo-organische complexen (Hasan et al., 2009).

Biobeschikbaarheid en opname

De biobeschikbaarheid van Cd in de bodem hangt af van de concentratie, pH, temperatuur, redoxpotentiaal en de concentratie van andere elementen. Bodems met een hogere metaalabsorptiecapaciteit hebben een lager potentieel voor opname van metalen door planten (Das et al., 1997). Cd bevindt zich voornamelijk in de toplaag, waar het gebonden is met organisch materiaal. Cd-beschikbaarheid voor planten is groter in zure bodems en de

oplosbaarheid van Cd stijgt bij aanwezigheid van wortellexudaten. Cd komt in de bodem voornamelijk voor als Cd^{2+} , maar ook als Cd-chelaten (Lux et al., 2011). Chelatie houdt de vrije metaal activiteit laag maar zorgt voor een stijging van de opgeloste metaalconcentratie. Zowel absorptie en chelatie worden sterk beïnvloed door de bodempH (Das et al., 1997). De competitie voor absorptieplaatsen tussen Cd en andere minerale nutriënten met gelijkaardige chemische karakteristieken (vb. Zn) speelt een belangrijke rol. Ook minerale nutriënten die geen gelijkaardige chemische karakteristieken hebben met Cd worden beïnvloed door Cd aangezien Cd meestal eerst opgenomen wordt en het wortelsysteem beschadigt zodat opname van andere elementen gehinderd wordt (Hasan et al., 2009). Beschadiging aan wortels door Cd kan ook leiden tot droogtestress (Gaudet et al., 2011). Cd-absorptie over het plasmamembraan van wortelcellen wordt gestuurd door het elektrochemische potentiaalverschil tussen de activiteit van Cd^{2+} in het cytosol en dat in de wortelapoplast. Het groot negatief membraan potentiaal is de drijvende kracht voor Cd^{2+} -opname, zelfs bij lage concentraties Cd^{2+} (Hasan et al., 2009). De moleculaire mechanismen die betrokken zijn in de opname en accumulatie van metalen door planten wordt weergegeven in Figuur 2.6.



Figuur 2.6: Moleculaire mechanismen betrokken in de opname en accumulatie van metalen door planten. (a) Metaalionen worden gemobiliseerd door secretie van chelators en door acidificatie van de rhizosfeer. (b) Opname van gehydrateerde metaalionen of metaal-chelaat complexen wordt bemiddeld door verschillende opnamesystemen gevestigd in het plasmamembraan. Binnenin de cel worden metalen gechelateerd en overmatig metaal wordt afgezonderd door transport naar de vacuole (Clemens et al., 2002).

Transport

De Cd-ionen in de wortelcellen kunnen via het xyleem naar de bladeren getransporteerd worden met de transpiratiestroom. Cd kan herverdeeld worden via het floëemtransport en zo in de schors terecht komen wat een belangrijke opslagplaats blijkt te zijn (He et al., 2011). In de plantencel komt Cd meer voor onder de vorm van een complex dan een vrij ion (Mendoza-Cozatl et al., 2008). Cd verkiest om te binden aan S-bevattende liganden, maar bindt ook met N-

en O-bevattende liganden. Cysteïne en andere thiol-bevattende componenten (fytochelatine, glutathion, enz.) en verschillende organische zuren (citraat) en andere aminozuren in het xylemsap kunnen een belangrijke rol spelen in het transport van Cd van de wortels naar de scheuten (Hasan et al., 2009). Thiolen blijken de hoogste affiniteit te hebben voor Cd. Fytochelatine, een afgeleid product van glutathion (GSH), bevat een thiol component en bindt het sterkst met Cd (Mendoza-Cozatl et al., 2008). De overvloed aan organische liganden (organische zuren, aminozuren, suikers, vetten en eiwitten) en de alkalische pH (pH 7.0-8.0) van het floëmsap verzekert dat al het Cd²⁺ in het floëem aanwezig is in gecomplexeerde vorm (Hasan et al., 2009). In de experimenten van (Mendoza-Cozatl et al., 2008) met koolzaad (*Brassica napus*) werd in het floëmsap 50 keer meer thiolen teruggevonden dan in het xylemsap. Fytochelatines komen dus voornamelijk voor in het floëmsap. Het floëmsap lijkt verantwoordelijk te zijn voor het lange afstand transport van Cd en voor de redistributie van Cd vanuit de bladeren naar andere delen van de plant (Mendoza-Cozatl et al., 2008). Ondanks het verschil in mobiliteit van metaalionen in de planten is de metaalconcentratie in het algemeen groter in de wortels dan in de bovengrondse plantendelen (Hasan et al., 2009). Dit toont aan dat Cd-transport naar het xyleem beperkt is in de meeste planten (Lux et al., 2011). De Cd verdeling in populieren daalt in volgende volgorde: wortel > stam > blad (Nikolic et al., 2008).

Tolerantie

Tolerantie voor hoge [Cd] varieert tussen soorten en variëteiten. Deze verschillen zijn meestal genetisch bepaald. Cd-tolerante planten zijn in staat om overmatige absorptie van Cd tegen te gaan of te ontgiften.

Om overmatige absorptie van Cd tegen te gaan, immobiliseren planten zware metalen in de celwand zodat contact met de protoplast en verder transport via de apoplast voorkomen wordt (Larcher, 2003). Wanneer Cd toch wordt opgenomen door de wortels is het cruciaal dat de centrale cilinder geïsoleerd wordt van de perifere lagen van de wortel. De rhizodermis, exodermis en endodermis gedragen zich als barrières voor de apoplastische beweging van toxische elementen, waaronder Cd. De epidermale laag, die de buitenste cellaag omvat, wordt de rhizodermis genoemd. De rest van de perifere weefsels worden de cortex genoemd. De endodermis scheidt de cortex van de centrale cilinder en extracellulaire bewegingen van opgeloste stoffen in het xyleem zijn beperkt door suberine-afzettingen in de celwanden van de endodermis. Suberine en lignine vormen samen een apoplastische barrière en staan bekend als de Caspary bandjes. De endodermis met Caspary bandjes vormen een aanzienlijke, maar geen ondoordringbare barrière voor de beweging van opgeloste stoffen door de apoplast. De exodermis kan parallel met de endodermis gevormd worden. Omgevingscondities kunnen echter de snelheid van de ontwikkeling van de exodermis wijzigen. Deze versnelde ontwikkeling van de exodermis is gerelateerd met een gereduceerde Cd-opname door de wortels. Verschillende studies bevestigen het belang van de exodermis als een variabele omgevingsbarrière voor de opname van water en ionen bij maïs (*Zea mays*) en blauwe lis (*Iris germanica*) (Lux et al., 2011).

Blootstelling aan Cd resulteert in de vorming van Caspary bandjes en suberinelamellen dichter

bij de wortelapex in verschillende plantensoorten. Deze veranderingen kunnen duiden op een acclimatisatierespons die de apoplastische beweging van Cd naar het xyleem en zijn translocatie naar de scheut reduceert (Lux et al., 2011).

Twee types van cysteinerijke peptides zijn doeltreffend in de sequestratie van zware metalen in vacuolen: metallothioneïnes en fytochelatines. Metallothioneïnes staan in voor het transport naar en de opslag in de vacuole. Ze zijn niet substraatspecifiek en worden geproduceerd wanneer bepaalde genen worden geactiveerd. Fytochelatines worden geproduceerd door een enzymatische peptidetransfer van tripeptides. De synthese van fytochelatines gebeurt via fytochelatine synthase die geactiveerd wordt door zware metalen met een hoge affiniteit voor SH-groepen (Schulze et al., 2005; Lux et al., 2011). Door Cd te stabiliseren in complexen met fytochelatine zijn sommige planten tolerant voor Cd. De complexen minimaliseren de interactie tussen Cd en fotosynthetische componenten en dragen ook bij aan het Cd-transport en afzondering in vacuolen. Het vastleggen van Cd in vacuolen laat toe om redelijk hoge hoeveelheden Cd te accumuleren en wordt het detoxificatie mechanisme genoemd. Dit mechanisme heeft echter een gelimiteerde capaciteit, afhankelijk van het zwavelreductie metabolisme, wat meestal plaatst vindt in de chloroplast. Daar worden thiolmoleculen geproduceerd voor glutathion en dus voor fytochelatine synthese (Pietrini et al., 2009). Verder is ook proline betrokken in de detoxificatieprocessen. Vrij proline chelateert Cd-ionen, wat resulteert in de vorming van het niet-toxische Cd-proline complex. Meestal accumuleert proline meer in de wortels dan in de bladeren (Nikolic et al., 2008).

2.2.3 Effecten van Cd-stress

De hoofdmechanismen betrokken in de plantrespons op Cd toxiciteit zijn oxidatieve stress, de sterke affiniteit voor thiol-groepen en de competitie voor absorptieplaatsen tussen Cd en minerale nutriënten met gelijkaardige chemische eigenschappen. Deze mechanismen leiden tot zichtbare schade in planten en tot een reductie van fotosynthese en water- en nutriëntenopname, wat resulteert in een zwakke groei (Gaudet et al., 2011).

Oxidatieve stress

Eén van de responsen van planten op verschillende stressfactoren, waaronder zware metalen, is overproductie van vrije radicalen en ROS wat resulteert in oxidatieve stress (Nikolic et al., 2008). Oxidatieve stress verstoort de redoxbalans in cellen (He et al., 2011). Cd is geen redox-actief metaal en de stijging van ROS wordt waarschijnlijk via indirecte mechanismen geïnduceerd. Oxidatieve stress in planten blootgesteld aan Cd is een vroeg symptoom van toxiciteit (Nikolic et al., 2008). De plant heeft twee antioxidant verdedigingsmechanismen, nl. enzymatisch en niet-enzymatisch.

De niet-enzymatisch opruiming van ROS gebeurt door metaboliëten zoals proline en fenolen. Proline reageert met OH° tot een stabiel radicaal (He et al., 2011). Cd stimuleert de accumulatie van proline in sommige plantensoorten. Tolerantie tegen stress stijgt met vrij proline door osmoregulatie, stabiliserende eiwitsynthese en bescherming van eiwitten tegen denaturatie

(Nikolic et al., 2008). Fenolen zijn krachtige Cd-chelators en ruimen radicalen op. Deze fenolen zijn voornamelijk terug gevonden in de wortels en een sterke stijging bij Cd-stress vond plaats. In populieren zijn fenolen vooral belangrijk als opruimers van ROS omdat hun concentraties het sterkst stijgt in weefsel met de grootste Cd-accumulatie, nl. in de schors en wortels (He et al., 2011).

Planten beschikken ook over antioxidant enzymen, die instaan voor de enzymatische verdediging tegen oxidatieve stress. Superoxide dismutase (SOD) zet het superoxide anion om naar H_2O_2 en O_2 , catalase (CAT) zet H_2O_2 om naar H_2O en O_2 en glutathion peroxidase (GSH-Px) katalyseert de reductie van organische peroxides en H_2O_2 naar H_2O gebruik makend van GSH (Nikolic et al., 2008). Lijnen et al. (2007) onderzocht het effect van metaalstress op de cellulaire redoxbalans van *Arabidopsis thaliana*. Uit dit onderzoek werd besloten dat GSH een sleutelmetaboliet is in de verwerking van metalen in zowel wortel als blaadjes. GSH is een precursor voor fytochelamines en is op die manier belangrijk voor de complexatie van Cd. Ook voor GSH-gerelateerde enzymen en transporters werden transcriptionele veranderingen waargenomen na behandeling met Cd. GSH blijkt dus een belangrijk verdedigingsmechanisme tegen metaal toxiciteit, zowel voor complexatie, sequestratie en detoxificatie van metalen en in de antioxidatieve verdediging (Lijnen et al., 2007). De activiteit van antioxidatieve enzymen onder Cd-stress is afhankelijk van de [Cd]. In het algemeen zijn antioxidatieve enzymen in het blad gevoeliger voor Cd. In populieren blootgesteld aan Cd werd vastgesteld dat de activiteit van SOD daalde in de wortels en steeg in de bladeren (Nikolic et al., 2008).

Fotosynthese

Cd-ionen binden gemakkelijk met S, O en N van de functionele groepen van vele enzymen en structurele eiwitten waardoor de fotosynthetische activiteit belemmerd wordt (Pietrini et al., 2009). De invloed van zware metalen op de activiteit van enzymen van de Calvin-Benson cyclus is de hoofdoorzaak van inhibitie van fotosynthese door zware metalen. Daarnaast kunnen zware metalen ook direct interageren met de elektronentransportketen. De inhibitie van het elektronentransport in de thylakoïdmembranen door metaal ionen wordt veroorzaakt door twee mechanismen: metaal ionen onderscheppen elektronen van water naar $NADP^+$ en de verstoring van het lichtopvangsysteemcomplex en membraanstructuur door metaal ionen (Papageorgiou & Govindjee, 2004).

Cd kan ook indirect intrageren met fotosynthese door competitie voor wortelabsorptie met andere metalen. Deze metalen kunnen essentiële cofactoren van enzymen, pigmenten en structurele componenten van het fotosynthetisch apparaat zijn. Bij een tekort aan deze metalen wordt de metabolische capaciteit voor CO_2 -fixatie gereduceerd (Pietrini et al., 2009).

De effecten van Cd op fotosynthese werken dus op verschillende processen en plaatsen in, nl. chlorofylbiosynthese en -degradatie, PSI en PSII, degradatie van thylakoïd acyl vetten, desorganisatie van zuurstofvormend complex en light harvesting complex (LHC) II antennasysteem. Cd heeft een direct effect op de samenstelling en structuur-functie relatie van thylakoïden. De inhibitie van PSII is gerelateerd aan de substitutie van Mn gebonden aan het

zuurstofvormend complex. Bovendien inhibeert Cd ook enzymen van de CO₂-assimilatie. Cd inhibeert de Rubisco-activiteit en het effect kan veroorzaakt worden door een algemene daling in eiwitbiosynthese of door destabilisatie van de SH-bindingen. Cd²⁺ verandert het normale Q_a-Q_b evenwicht en het effect blijkt permanent te zijn. Cd vertraagt zowel de reductie van Q_a en de oxidatie van het gereduceerde Q_a (Papageorgiou & Govindjee, 2004).

De daling in fotosynthetische activiteit wordt ook deels toegeschreven aan een laag chlorofylgehalte. Cd wijzigt de chlorofylbiosynthese door inhibitie van protochlorofyl reductase, waarschijnlijk door interactie van Cd met SH-groepen. Cd kan ook de integratie van chlorofylmoleculen in pigment-eiwit complexen van fotosystemen beïnvloeden. Substitutie van Mg-ionen in chlorofylmoleculen door Cd kan een ander mogelijk mechanisme zijn, wat resulteert in de vernietiging van chlorofyl. Cd wijzigt de celverdeling en chloroplastreproductie, wat aanleiding geeft tot een drastische daling in het aantal chloroplasten en bijgevolg van de hoeveelheid chlorofyl (Nikolic et al., 2008).

Chlorofyl-A fluorescentie

Zware metalen inhiberen meerdere metabolische processen in planten en bijna alle chlorofyl-A fluorescentie inductie parameters (F₀, F_V, F_M en F_S) worden beïnvloed. De mate van variatie van deze parameters is afhankelijk van het groeistadium van de plant tijdens de blootstelling aan metalen en de tijdsduur van de blootstelling aan metaalionen (Papageorgiou & Govindjee, 2004).

Uit onderzoek van Papageorgiou & Govindjee (2004) werd besloten dat F_V/F_M weinig verandering toont bij planten blootgesteld aan Cd. Dit effect wordt verklaard op basis van Cd afhankelijk stijging van q_N. Planten blootgesteld aan Cd vertonen ook een vertraging in het bereiken van steady state van chlorofyl-A fluorescentie wat een vertraagde aanvang van de activiteiten van de Calvin-Benson cyclus enzymen aantoont. Een korte blootstelling van jonge planten aan Cd beïnvloedde F_V/F_M niet, maar veroorzaakte een lichte stijging in q_N. Dit toont een hogere afvoer van geabsorbeerde energie onder de vorm van warmte aan (Papageorgiou & Govindjee, 2004).

Gogorcena et al. (2011) onderzocht de effecten van verschillende Cd behandelingen (10 μM-50 μM) op eik (*Quercus suber* L.). De Cd behandelingen induceerden een matige daling (9-18%) in de maximale efficiëntie van PSII, wat af te leiden was uit de F_V/F_M ratio. De PSII efficiëntie bij steady state fotosynthese (ϕ_{PSII}) was ook gedaald met 30-50% bij alle Cd behandelingen. NPQ steeg in alle behandelingen (met 42-107%) vergeleken met controleplanten (Gogorcena et al., 2011).

2.2.4 Invloed van omgevingscondities

Gaudet et al. (2011) onderzocht de verschillen tussen de respons van populier in contrasterende omgevingscondities. Twee *P. nigra* genotypes van noordelijke (genotype 58-861) en zuidelijke (genotype Poli) oorsprong werden gebruikt. Biomassa productie en fotosynthese werden in beide

klonen beïnvloed maar de zuidelijke kloon was duidelijk meer tolerant voor Cd-stress dan de noordelijke. De hoeveelheid Cd in de bladeren was echter niet significant verschillend tussen de twee klonen.

Transpiratie werd significant gereduceerd in beide klonen maar het effect was sterker in de noordelijke kloon (75% reductie versus 50% in de zuidelijke kloon). De blootstelling van wortels aan Cd kan abscissinezuur (ABA) signalen triggeren van de wortels naar de bladeren wat leidt tot stomatale sluiting en daling in transpiratie. De noordelijke kloon accumuleerde dubbel zoveel Cd in zijn wortels vergeleken met de zuidelijke kloon. Een hoge [Cd] in de wortels kan hun functionaliteit beschadigen en tot droogtestress leiden. Dit kan de zeer lage transpiratie van de noordelijke kloon en zijn lage assimilatie verklaren. De nettofotosynthese was bij de noordelijke kloon namelijk met 70% gedaald terwijl dit slechts 8% was bij de zuidelijke kloon.

De analyse van chlorofyl-A fluorescentie toonde aan dat de Cd-behandeling geen schade aan PSII door oxidatieve stress had veroorzaakt. De resultaten toonden een significant effect van Cd op fotoinhibitie, met reductie van elektronentransport, maar de chloroplast ultrastructuur bleek niet beschadigd te zijn. (F_V/F_M) was constant in planten al dan niet blootgesteld aan Cd. De quantum opbrengst van het elektronentransport ($\Delta F/F_M$) werd meer negatief beïnvloed in de noordelijke kloon en q_P en NPQ waren consistent met deze trend. Een hogere NPQ voorkomt oxidatieve schade door overmatige energie af te voeren als warmte. Het verschil in inhibitie van elektronentransport kan toegeschreven worden aan het verschil in fotosynthetische assimilatie van de twee genotypes (Gaudet et al., 2011).

2.3 Gecombineerd effect van Cd en hitte

Vaak ondergaat een plant meer dan één stress gelijktijdig en de meeste stresscondities hebben, ten minste voor een deel, gelijkaardige effecten op planten zoals de generatie van ROS (Kohan et al., 2011). GSH is een component van het antioxidatief beschermingssysteem dat ROS onder controle houdt. Het vermogen om GSH te synthetiseren blijkt cruciaal te zijn voor de bescherming tegen Cd. Er werd reeds aangetoond dat de plant een bescherming tegen Cd-stress verkrijgt wanneer de plant voorafgaand blootgesteld wordt aan hoge temperaturen (Chao et al., 2009).

Chao et al. (2009) onderzocht de rol van GSH in de bescherming, geïnduceerd door hittegolven en H_2O_2 , van rijstzaailingen (*Oryza sativa* L.) tegen Cd-stress. De experimenten van Chao et al. (2009) toonden dat Cd-geïnduceerde veranderingen gereduceerd kunnen worden door voorafgaande behandeling met hoge temperaturen. Dit komt overeen met de resultaten van Hsu & Kao (2007) die rapporteerden dat een drie uur durende blootstelling aan hoge temperaturen de toxiciteit van hoge $CdCl_2$ -concentraties ($50 \mu M$ en $500 \mu M$) voorkomt (Hsu & Kao, 2007). De resultaten van het onderzoek van Chao et al. (2009) toonden een stijging van de GSH-concentratie ([GSH]) in bladeren van rijstzaailingen die voordien waren blootgesteld aan hoge temperaturen. De resultaten toonden ook een stijging in de synthese van GSH door de H_2O_2 -behandeling. Deze beide behandelingen resulteerden in een versterkte Cd-tolerantie (Chao et al., 2009). H_2O_2 kan een dubbele rol spelen in plantencellen. Enerzijds is H_2O_2 een sterk

toxisch oxidant die celschade en zelfs celdood veroorzaakt (Hung et al., 2005). Hsu & Kao (2007) besloten dat de Cd-toxiciteit in de bladeren van de rijstzaailingen het gevolg was van H_2O_2 accumulatie (Hsu & Kao, 2007). Anderzijds is H_2O_2 een signaalmolecule voor activatie van het verdedigingsmechanisme om de redox in plantencellen te herstellen (Chen et al., 1993; Hung et al., 2005). Een verhoogde H_2O_2 -concentratie ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) resulteert in activatie van genen, waaronder deze die coderen voor antioxidantenzymen, signaaleiwitten en transcriptiefactoren (Hung et al., 2005). Volgens Kohan et al. (2011) wordt het DREB1A gen geïnduceerd als respons op stresscondities. Het is een transcriptie factor dat vele genen reguleert. Dit resulteert in adaptatie van planten tegen stresscondities en oefenen van specifieke tolerantie mechanismen (Kohan et al., 2011). Volgens Kohan et al. (2011) is het mogelijk dat overexpressie van DREB1A leidt tot resistentie van planten tegen zware metaal toxiciteit. Het DREB-type transcriptie factor gen is ook teruggevonden in *Populus* spp. (Kohan et al., 2011).

Men kan dus stellen dat populieren die blootgesteld zijn aan hoge temperaturen een hogere $[\text{H}_2\text{O}_2]$ hebben. Deze hoge $[\text{H}_2\text{O}_2]$ zorgt voor de inductie van het DREB1A gen die op zijn beurt genen activeert waardoor de $[\text{GSH}]$ stijgt. Deze hoge $[\text{GSH}]$ kan populieren beschermen tegen de oxidatieve schade door Cd.

3

Materiaal en methoden

3.1 Proefopzet

De metingen werden uitgevoerd in twee groeikamers van het *Laboratorium voor Plantecologie*. Omgevingsfactoren zoals temperatuur en straling kunnen in deze kamers geregeld worden. In de groeikamers werden temperatuur (thermokoppels type T: koper-constantaan), fotosynthetisch actieve straling (PAR) (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) en relatieve vochtigheid (relatieve vochtigheidssensor serie EE08, E+E elektronik Ges.m.b.H., Oostenrijk) online gemonitord en data werden elke 20 seconden gelogged (Agilent 34970A, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA). In kamer 1 werden geen hittegolven gesimuleerd en deze kamer wordt de referentiekamer genoemd. In kamer 2 werden twee hittegolven gesimuleerd en deze kamer wordt de hittekamer genoemd. Verder kreeg de helft van de planten potgrond die verontreinigd was met cadmium (Cd). Door de planten te wisselen tussen de referentiekamer en de hittekamer werden acht behandelingen verkregen (Tabel 3.1). Voor de bespreking van de resultaten en de discussie worden bomen met verontreinigde potgrond en bomen zonder verontreinigde potgrond respectievelijk stressbomen en controlebomen genoemd. In Figuur 3.1 is een typische proefopzet van de uitwerking van het experiment met hittestress en Cd-stress te zien.

Tabel 3.1: Overzicht van de acht verschillende behandelingen

behandeling	naam	Cd (mg/L verse potgrond)	hitte	aantal
1	Controle	-	-	5
2	Stress	100	-	5
3	C.Lente	-	Lente	5
4	S.Lente	100	Lente	5
5	C.Zomer	-	Zomer	5
6	S.Zomer	100	Zomer	5
7	C.Lente.Zomer	-	Lente en zomer	5
8	S.Lente.Zomer	100	Lente en zomer	5

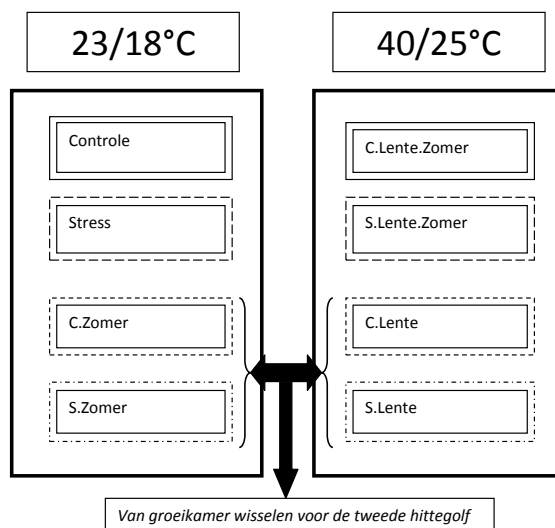
**Figuur 3.1:** Typische proefopstelling van de uitvoering van het experiment met hittestress en Cd-stress.

3.2 Plantenmateriaal

Voor de experimenten werd gebruik gemaakt van *Populus canadensis* 'Robusta'. Bij Sylva Van Hulle werden 40 stekken aangekocht. De stekken werden op 1 juni geplant in potten van 4L. Bij de potgrond van 20 populieren werd Cd toegevoegd (Bijlage A).

3.3 Experiment

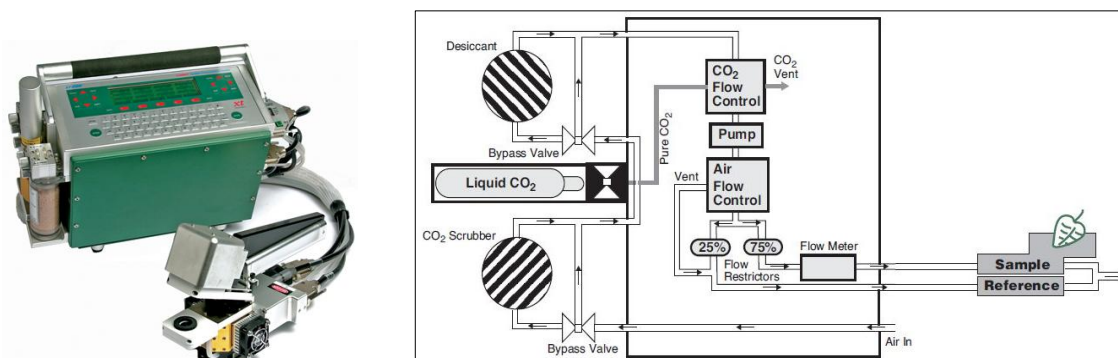
Bij de start van het experiment werden in elke kamer ad random 20 populieren geplaatst waarvan de helft blootgesteld aan Cd. Na de eerste hittegolf werden er reeds vier behandelingen verkregen (behandelingen 1 tot 4 in Tabel 3.1). Voor de tweede hittegolf werden vijf planten van behandeling 3 en vijf planten van behandeling 4 vanuit de hittekamer gewisseld met vijf planten van behandeling 1 en vijf planten van behandeling 2 vanuit de referentiekamer (Figuur 3.2). Op die manier werden acht behandelingen verkregen na de tweede hittegolf. Eén hittegolf duurde ongeveer één week en aan elke hittegolf werden controlemetingen (voor de hittegolf) en herstelmetingen (na de hittegolf) gekoppeld van ongeveer één week. In de lente vonden de controlemetingen plaats van 9/08 tot 16/08 (zes dagen voor behandeling 1 en 2), de hittegolf van 17/08 tot 23/08 (één dag voor behandeling 1 en 2, en vijf dagen voor behandeling 3 en 4) en de herstelmetingen van 24/08 tot 1/09 (twee dagen voor behandeling 1 en 2, en vier dagen voor behandeling 3 en 4). In de zomer vonden de controlemetingen plaats van 27/09 tot 7/09 (vier dagen voor behandeling 1 en 2, en vijf dagen voor behandeling 3 en 4), de hittegolf van 8/09 tot 14/09 (één dag voor behandeling 1, 2, 3 en 4, en vier metingen voor behandeling 5, 6, 7 en 8) en de herstelmetingen van 15/09 tot 20/09 (twee dagen voor behandeling 1, 2, 3 en 4, en vier dagen voor behandeling 5, 6, 7 en 8). Voor, tijdens en na de hittegolf werd er dus telkens een gemiddelde genomen van meerdere metingen gespreid over een aantal dagen. In de controle en herstelweek bedroeg de temperatuur 23°C /18°C (dag/nacht) en tijdens de hittegolf 40°C/25°C. De daglengte werd ingesteld op 15 uur met een gemiddelde PAR van 150 $\mu\text{mol fotonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Tijdens het experiment werden fotosynthese en chlorofyl-A fluorescentie metingen uitgevoerd. Voor de Cd-bepaling werden bladstalen en bodemstalen genomen.



Figuur 3.2: Schematische voorstelling van de 2 groeikamers, resp. 23/18°C en 40/25°C (hittegolf) met hun plantenbezetting tijdens de lente en/of zomer.

3.4 Fotosynthese en chlorofyl-A fluorescentie

Fotosynthese, transpiratie en fluorescentieparameters werden opgemeten met behulp van LI-6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). De LI-6400 XT is een draagbaar open differentieel gasuitwisselingssysteem (Figuur 3.3).



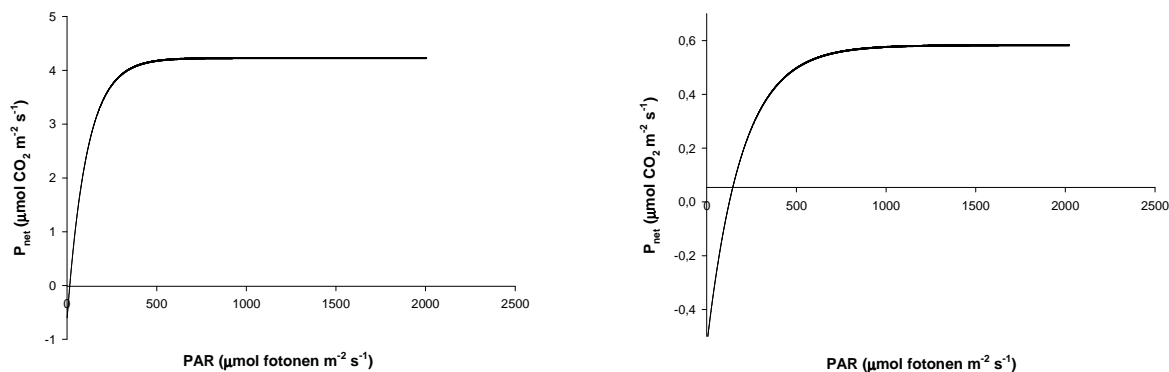
Figuur 3.3: De LI-6400XT (LI-COR, 2004) (links) en een schematisch overzicht van het stroomschema van de LI-6400XT bij gebruik van de CO₂-mixer (LI-COR, 2004) (rechts).

De netto-fotosynthese (P_{net} uitgedrukt in $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wordt berekend uit het verschil in CO₂-concentratie tussen de luchtstroom die de meetkamer binnenkomt (referentielucht) en de luchtstroom die de meetkamer verlaat (sample lucht)(vergelijking 3.1).

$$P_{\text{net}} = \frac{\Delta\text{CO}_2 * \text{luchtdebiet}}{\text{bladoppervlakte}} \quad (3.1)$$

De [CO₂] worden gemeten d.m.v. een IRGA (Infra Red Gas Analyser) die ingebouwd is in het sensorhoofd van de LI-6400. De IRGA straalt infrarood licht uit dat gemeten wordt door een detector. CO₂ absorbeert energie zodat de reductie van het energieniveau dat de detector bereikt gelinkt kan worden aan de [CO₂]. Voor de start van het experiment werd P_{net} gemeten voor een sequentie van PAR-intensiteiten (0, 25, 50, 100, 500, 1000, 1500, 1800 en 2000 $\mu\text{mol fotonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) door een blad in de meetkamer van het sensorhoofd te brengen. De fotosynthese is verzadigd bij 1000 $\mu\text{mol fotonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figuur 3.4). De metingen in het experiment werden dus uitgevoerd bij 0 en 1000 PAR. Verder werd de Optimum Flash Intensity en Optimum Measurements Intensity bepaald die resp. 5 en 1 zijn. De metingen werden uitgevoerd bij een CO₂-concentratie van 400 ppm. De blokt temperatuur van de bladkamer werd ingesteld op 25°C of 40°C afhankelijk van de omgevingstemperatuur. Op het sensorhoofd van de LI-6400 XT kan een fluorescentiekamer worden gemonteerd die toelaat om de chlorofyl A-fluorescentie te meten. Er wordt hierbij gebruik gemaakt van gemoduleerd meetlicht en verschillende lichtbronnen (actinisch licht, verzadigingspulsen en verrood licht) (LI-COR, 2004). Op deze manier kunnen verschillende fluorescentieparameters worden bepaald: het minimale fluorescentieniveau na donkeradaptatie (F_0), het maximale fluorescentieniveau na een verzadigingspuls op een donkergeadapteerd blad (F_M), het fluorescentiesignaal na een verzadigingspuls op een lichtgeadapteerd blad (F'_M), het minimaal fluorescentiesignaal van een lichtgeadapteerd blad (F'_0) en de steady state fluorescentie (F_S). Hiermee werden de andere

parameters bepaald aan de hand van de vergelijkingen beschreven in sectie 2.1.4. Voor metingen van donker-geadapteerde bladeren werd gebruik gemaakt van 'Dark Adapting Clips'. Deze werden 20 minuten op het blad geplaatst voor de start van de metingen. Twee dagen waren nodig om de fotosynthese- en chlorofyl A-fluorescentiemetingen uit te voeren op dezelfde bladeren van de 40 populieren. Een groenheidsindex, die een maat is voor het chlorofylgehalte, werd gemeten met de SPAD 502 Chlorophyll Meter (Konica Minolta Sensing Inc., Japan).



Figuur 3.4: Gemiddeld fotosyntheseverloop van populieren niet blootgesteld aan Cd (links) en populieren blootgesteld aan Cd (rechts).

3.5 Cadmiumbepalingen

Op de bladstalen werd een Cd-bepaling uitgevoerd. Zowel bladeren van populieren blootgesteld aan Cd en populieren zonder blootstelling aan Cd werden geoogst. In het totaal waren er zes oogsten, drie in de lente en drie in de zomer. De bladeren werden telkens voor de hittegolf, op het einde van de hittegolf en na de hittegolf geoogst. De ovendroge bladeren werden fijngemalen met een mortier en vervolgens werd minimum 0,1 g bladmateriaal analytisch afgewogen in buisjes. De metalen werden ontsloten door een open microgolfdestructie (Mars 5, CEM Corporation, Matthews, NC, USA) zodat Cd in zijn vrije metaalvorm aanwezig is. Dit is noodzakelijk voor de bepaling van Cd via ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) (Varian Vista MPX, Varian, Palo Alto, California) volgens de methode van Balen. Bij elke batch werd ook een standaard geanalyseerd om de accuraatheid van de methode te controleren. De ICP-OES werd enkel voor de bladstalen van populieren blootgesteld aan Cd gebruikt omdat de bladstalen van populieren niet blootgesteld aan Cd onvoldoende Cd bevatten en bijgevolg onder de detectielimiet van ± 4 ppb zaten. Daarom werd de bepaling van Cd van bladstalen van populieren die niet blootgesteld zijn aan Cd via ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) (Agilent 7500ce; Agilent, Palo Alto, CA, USA) uitgevoerd, aangezien deze een detectielimiet van $\pm 0,05$ ppb heeft. Voor een volledig overzicht van het destructieprotocol wordt verwezen naar Bijlage B.

3.6 Bodemkarakterisatie

Het bodemvocht werd geëxtraheerd via rhizons en vacuettes. De pH, IC, NPOC en Cd-gehalte van het bodemvocht werden bepaald. De pH werd bepaald via een elektrode (KNI911 pH, ELSCOLAB.nv). De gemiddelde pH van het bodemvocht lag tussen 7 en 8, waarbij de gemiddelde pH van het bodemvocht uit een gespikte bodem steeds lager was dan de pH van het bodemvocht uit een bodem zonder Cd. De bepaling van IC en NPOC werd uitgevoerd door het *Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie*. De gemiddelde IC van het bodemvocht uit een bodem zonder en met Cd lag respectievelijk tussen 2,4 - 7,0 mg C/L bodemvocht en 1,8 - 2,6 mg C/L bodemvocht. De gemiddelde NPOC van het bodemvocht uit een bodem zonder en met Cd lag respectievelijk tussen 24,6 - 38,5 mg C/L bodemvocht en 25,5 - 35,5 mg C/L bodemvocht. Het bodemvocht werd verdund (Microlab 500 series, Hamilton) en vervolgens werd een Cd-bepaling uitgevoerd via de ICP-OES volgens de methode van Lommel. Ook hier werd de bepaling van Cd in bodemstalen van populieren die niet blootgesteld zijn aan Cd via ICP-MS uitgevoerd aangezien deze methode een lagere detectielimiet heeft.

Op de bodemstalen, die aan het begin van het experiment genomen werden, werd een Cd-bepaling uitgevoerd. 1 g van alle bodemstalen gespiked met Cd werd analytisch afgewogen en behandeld met koningswater. Voor de bepaling van Cd via de ICP-OES volgens de methode van Lommel werden deze bodemstalen sterk verdund (60x). De gemiddelde [Cd] van de bodemstalen met Cd bedroeg 524 Cd mg/kg bodem. Vijf bodemstalen zonder Cd werden gemengd waaruit vijf maal 1 g analytisch werd afgewogen die ook behandeld werden met koningswater. De bepaling van Cd voor deze bodemstalen werd via de ICP-MS uitgevoerd. De gemiddelde [Cd] van bodemstalen zonder Cd bedroeg 1,01 Cd mg/kg bodem. Verder werd uit de vijf bodemstalen zonder Cd ook vijf maal 1 g in porseleinen kroesjes analytisch afgewogen. Deze kroesjes werden vervolgens in een moffeloven geplaatst, waar de bodemstalen verast werden. Nadien werd opnieuw het gewicht van het bodemstaal bepaald. Het gemiddeld verast organisch materiaal was 0,77 g/ g bodem. Voor een volledig overzicht van het destructieprotocol wordt verwezen naar Bijlage C.

3.7 Statistische verwerking

Om significante verschillen tussen bomen wel en niet blootgesteld aan Cd te detecteren werd een t-test gebruikt. Indien de populatie niet aan de voorwaarden voldeed, werd een Mann-Whitney Rank Sum Test toegepast. Om na te gaan of de procentuele verschillen tussen voor en tijdens de hittegolf significant zijn, werd een gepaarde t-test gebruikt. Hier werd een Wilcoxon Signed Rank Test toegepast indien de populatie niet aan de voorwaarden voldeed. De significante verschillen tussen behandelingen onderling werden met een ANOVA test bepaald, waarbij de onderlinge paarsgewijze significantie bepaald werd via de Dunn's methode. De statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van Sigmaplot.

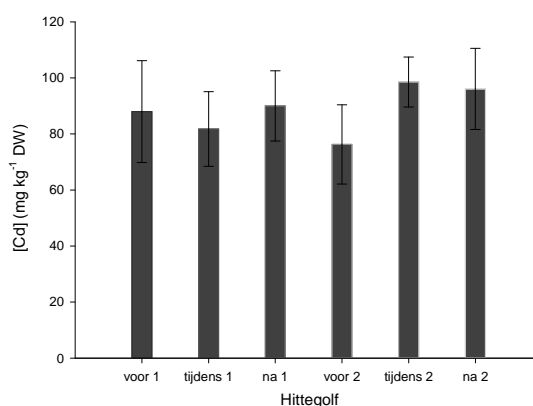
4

Resultaten

4.1 Respons van *Populus canadensis* op Cd

De resultaten van de respons van *Populus canadensis* op de Cd-behandeling worden in deze sectie weergegeven. Figuur 4.1 geeft het verloop van de gemiddelde [Cd] in de bladeren van de stressbomen in functie van de tijd weer. Deze concentraties liggen tussen de 75 en 95 mg Cd/kg DW. De gemiddelde [Cd] bij controlebomen was 7,5 mg Cd/kg DW.

Om de ecofysiologische en fluorescentieparameters tussen controlebomen en stressbomen te vergelijken, werd telkens voor de eerste hittegolf het procentueel verschil van beide genomen. In Tabel 4.1 worden deze procentuele verschillen weergegeven. Aangezien het gaat over de waarden van de parameters voor de hittegolven, werd het gemiddelde van alle stressbomen (behandeling 2, 4, 6 en 8) en van alle controlebomen (behandeling 1, 3, 5 en 7) samengenomen. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel.



Figuur 4.1: Verloop van de gemiddelde [Cd] in de bladeren van de stressbomen die niet blootgesteld zijn aan hitte in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd op tijdstippen die overeenkomen met respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf. 1 en 2 wijzen respectievelijk op de eerste hittegolf (lente) en de tweede hittegolf (zomer). De staafjes geven de gemiddelde concentratie van bladeren uit behandeling 2 met de standaardfout weer (n=5 tot 60).

Tabel 4.1: Effect van Cd op *Populus canadensis*. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de ecofysiologische en de fluorescentieparameters (%), relatief ten opzichte van de controlebomen. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

ecofysiologische parameter	%-verschil	fluorescentieparameter	%-verschil
P_{sat}	-69***	F_V/F_M	-28***
R	-22	F'_V/F'_M	-37***
P_{bruto}	-50***	ϕ_{PSII}	-60***
E	- 6	qP	-34***
WUE	-72***	NPQ	14***
g_s	- 9	ETR	-60***
		ϕ_{CO_2}	-56***

Ecofysiologische parameters

De lichtverzadigde fotosynthese (P_{sat}) en donkerrespiratie (R) zijn respectievelijk 69% en 22% lager in de stressbomen dan in controlebomen, maar het verschil bij donkerrespiratie werd niet significant bevonden. Hieruit volgt dat ook de bruto fotosynthese (P_{bruto}) 50% lager is in stressbomen. De Water Use Efficiency (WUE) is tevens 72% lager in stressbomen door een sterk verlaagde fotosynthese en gelijke transpiratie (E) (Tabel 4.1).

Fluorescentieparameters

F_V/F_M en F'_V/F'_M zijn respectievelijk 28% en 37% lager in stressbomen dan in controlebomen. De lagere waarden van F_V/F_M en F'_V/F'_M in stressbomen zijn te wijten aan respectievelijk een significant hogere F_0 (+82%) en F'_0 (+29%) in stressbomen (resultaten niet weergegeven). Er is eveneens een lagere waarde van ϕ_{PSII} (-60%) waar te nemen in stressbomen. Hieruit volgt ook een lagere waarde van ETR (-60%) in stressbomen. q_P en NPQ zijn respectievelijk 34% lager en 14% hoger in stressbomen. ϕ_{CO_2} komt overeen met de trend van q_P en is 56% lager in stressbomen (Tabel 4.1).

4.2 Respons van *Populus canadensis* op hitte en Cd

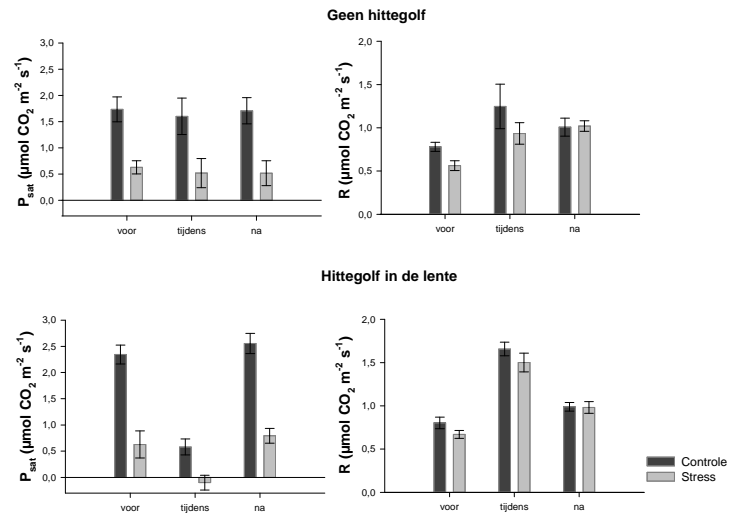
In dit deel worden de resultaten van de invloed van hitte op *Populus canadensis* maar ook het gecombineerd effect van hitte en Cd op populieren weergegeven.

4.2.1 Respons van *Populus canadensis* op een gesimuleerde hittegolf in de lente

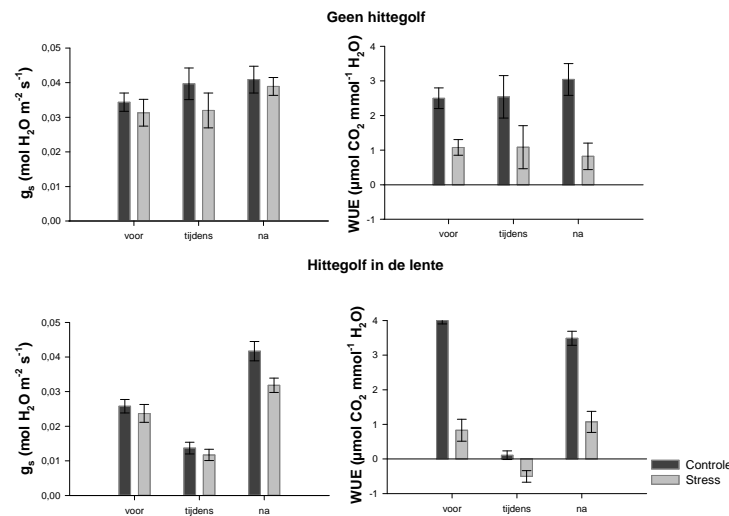
Ecofysiologische parameters

In Figuur 4.2 wordt het verloop van P_{sat} en R in functie van de tijd weergegeven. Zowel voor controle- als stressbomen is er een sterke daling in P_{sat} en een stijging in R waar te nemen gedurende de gesimuleerde hittegolf in de lente. Figuur 4.3 toont het verloop van g_s en de WUE. g_s daalt bij de controlebomen en stressbomen gedurende de hittegolf in de lente. De WUE volgt dezelfde uitgesproken trend als P_{sat} . Hier valt op te merken dat de P_{sat} en de WUE bij stressbomen met en zonder een hittegolf in de lente steeds beduidend lager zijn dan bij controlebomen (zie Figuur 4.2).

In Tabel 4.2 worden de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente gegeven. Waarden van behandeling 1 en 5 werden samengenomen, evenals die van 2 en 6, 3 en 7, 4 en 8. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel. P_{sat} vertoont een sterkere daling bij stressbomen (-116%) dan bij controlebomen (-75%) gedurende de hittegolf in de lente. De E neemt gedurende de hittegolf in de lente toe bij stressbomen en controlebomen met respectievelijk 126% en 147%. Deze procentuele verschillen in P_{sat} en E voor en tijdens de hittegolf in de lente zijn voor zowel stressbomen als controlebomen significant (resultaten niet weergegeven). De WUE toont een significante daling bij zowel controlebomen als stressbomen gedurende de hittegolf in de lente, waarbij de daling bij stressbomen sterker is (Tabel 4.2). De P_{bruto} daalt bij controlebomen (-30%) gedurende de hittegolf in de lente terwijl de P_{bruto} bij stressbomen lichtjes stijgt (+6%). Deze procentuele toename van P_{bruto} bij stressbomen is echter niet significant.



Figuur 4.2: Overzicht van de gemiddelde lichtverzadigde fotosynthese (P_{sat} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en de donkerrespiratie (R ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=10$ tot 60).



Figuur 4.3: Overzicht van de gemiddelde stomatale geleidbaarheid (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en Water Use Efficiency (WUE; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=10$ tot 60).

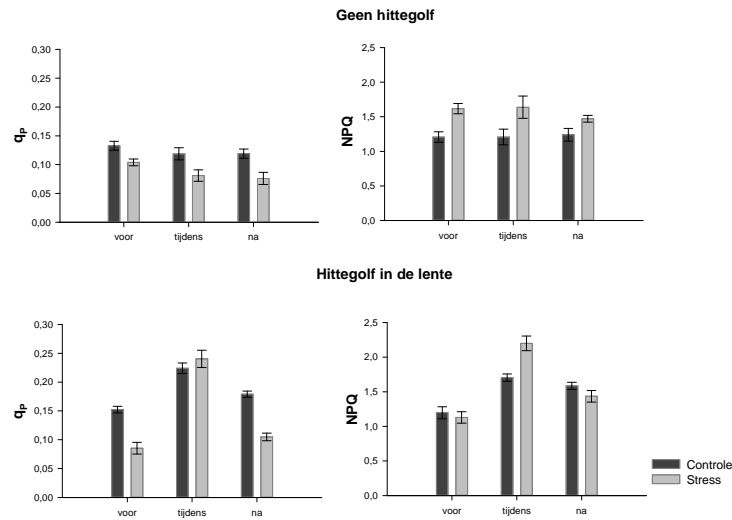
Tabel 4.2: Effect van Cd en hitte op *Populus canadensis*. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

behandeling	C.Lente 3 en 7	S.Lente 4 en 8
P _{bruto}	- 30***	6
R	106***	124***
g _s	- 47***	- 51*
WUE	- 97***	-161***

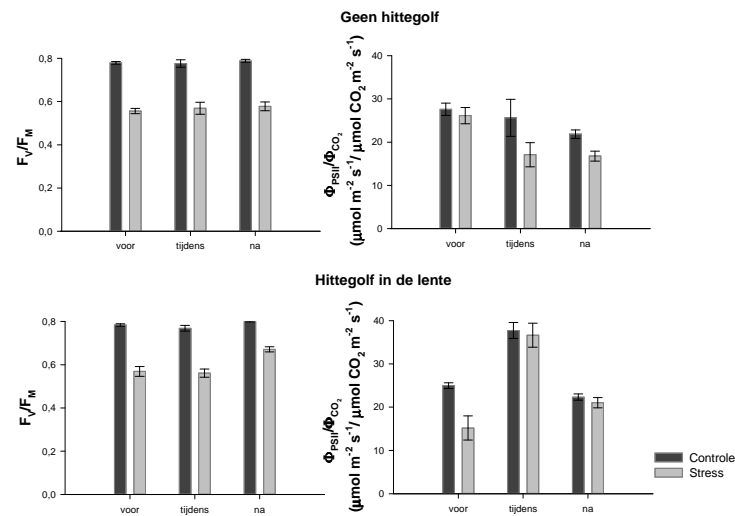
Fluorescentieparameters

Figuur 4.4 geeft het verloop van q_P en NPQ weer in functie van de tijd. Zowel q_P als NPQ stijgen tijdens de hittegolf in de lente. Figuur 4.5 toont het verloop van F_V/F_M en ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} in functie van de tijd. F_V/F_M is bij stressbomen altijd lager dan bij controlebomen zoals reeds werd getoond in sectie 4.1, maar een duidelijk effect van een hittegolf in de lente op F_V/F_M is niet zichtbaar. ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} neemt daarentegen tijdens de hittegolf in de lente toe.

In Tabel 4.3 wordt de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente weergegeven. Waarden van behandeling 1 en 5 werden samengenomen, evenals die van 2 en 6 aangezien deze behandelingen op dat moment gelijk zijn. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel. F'_V/F'_M vertoont een significante reductie bij zowel controlebomen (-20%) als bij stressbomen (-34%) tijdens de hittegolf in de lente. Dit is het gevolg van een sterkere daling in F'_M dan F'_0 tijdens de hittegolf in de lente (Figuur 4.6). Zowel de daling in F'_M als in F'_0 is significant (resultaten niet weergegeven). ϕ_{PSII} neemt sterk toe bij stressbomen (+93%), terwijl bij controlebomen de procentuele toename kleiner is (+16%) gedurende de hittegolf in de lente. ETR volgt dezelfde trend als ϕ_{PSII} . De procentuele toename van q_P is aanzienlijk groter bij stressbomen dan bij controlebomen gedurende de hittegolf in de lente, maar beide toenames zijn significant. Er is ook een significante procentuele stijging in NPQ waar te nemen, die bij stressbomen tweemaal groter is dan bij controlebomen. De procentuele stijging van ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} bij stressbomen en controlebomen gedurende de hittegolf in de lente is significant. Deze stijging van ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} is tevens beduidend groter bij stressbomen dan bij controlebomen.



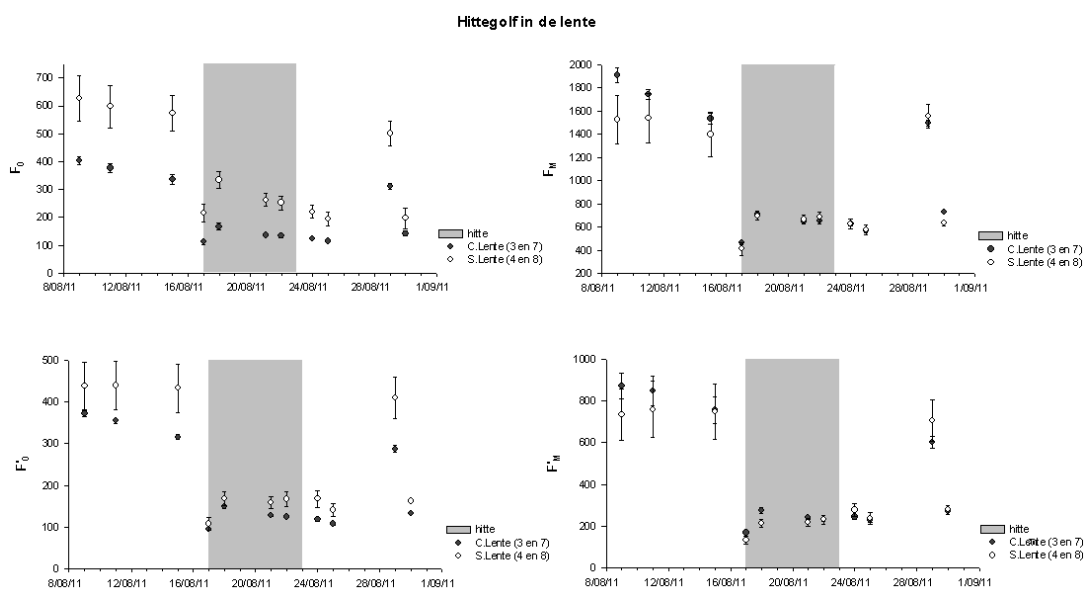
Figuur 4.4: Overzicht van de gemiddelde fotochemische quenching (q_P) en niet-fotochemische quenching (NPQ) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).



Figuur 4.5: Overzicht van de gemiddelde F_v/F_m en ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de lente. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 60).

Tabel 4.3: Effect van Cd en hitte op *Populus canadensis*. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

behandeling	C.Lente 3 en 7	S.Lente 4 en 8
F_V/F_M	- 2**	- 1*
F'_V/F'_M	-20***	- 34***
ϕ_{PSII}	16**	93***
qP	47***	182***
NPQ	42***	95**
ETR	13**	87***
ϕ_{CO_2}	-19*	39
ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2}	51**	141**



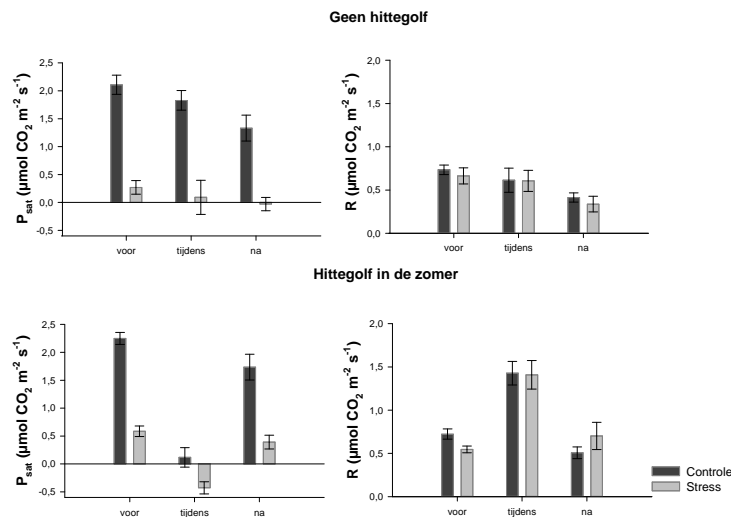
Figuur 4.6: F_0 , F_M , F'_0 en F'_M uitgezet in functie van de tijd tijdens de gesimuleerde hittegolf in de lente. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer (n=10 tot 20).

4.2.2 Respons van *Populus canadensis* op een gesimuleerde hittegolf in de zomer

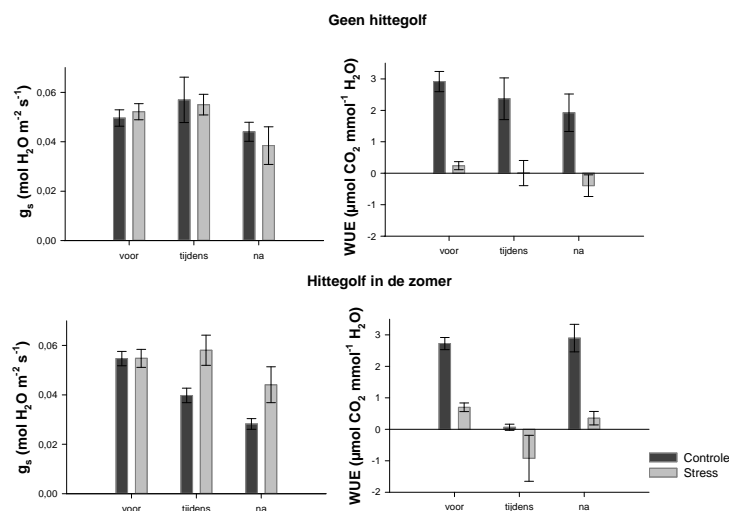
Ecofysiologische parameters

Figuur 4.7 toont het verloop van P_{sat} en R in functie van de tijd. Net zoals bij een hittegolf in de lente is er voor zowel controle- als stressbomen een sterke daling in P_{sat} en een stijging in R waar te nemen gedurende de hittegolf in de zomer. Figuur 4.8 toont het verloop van g_s en de WUE. g_s daalt bij controlebomen gedurende de hittegolf in de zomer. Deze trend is bij stressbomen echter niet aanwezig en g_s blijft gedurende de hittegolf in de zomer ongeveer gelijk. De WUE volgt dezelfde uitgesproken trend als P_{sat} . Hier valt op te merken dat de WUE bij stressbomen ook zonder hittegolf in verloop van tijd daalt en zelfs negatief wordt. Dit is het gevolg van het feit dat er enkel netto gerespireerd wordt (Figuur 4.7).

In Tabel 4.4 wordt de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer gegeven. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel. Evenals tijdens een hittegolf in de lente, vertoont P_{sat} een sterkere daling bij stressbomen (-173%) dan bij controlebomen (-95%). De E heeft bij stressbomen en controlebomen een procentuele toename van respectievelijk 220% en 134% gedurende de hittegolf in de zomer. De procentuele toe- of afnames van P_{sat} en E zijn significant. De WUE daalt zowel bij controlebomen als bij stressbomen gedurende de hittegolf in de zomer, waarbij de daling bij stressbomen opnieuw aanzienlijk sterker is dan bij controlebomen (Tabel 4.4). De procentuele afname van P_{bruto} bij controlebomen (-48%) is significant gedurende de hittegolf in de zomer, terwijl dit niet het geval is voor de kleinere procentuele daling in P_{bruto} bij stressbomen (-13%).



Figuur 4.7: Overzicht van de gemiddelde lichtverzadigde fotosynthese (P_{sat} ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en de donkerrespiratie (R ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 40).



Figuur 4.8: Overzicht van de gemiddelde stomatale geleidbaarheid (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en Water Use Efficiency (WUE; $\mu\text{mol CO}_2 \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 40).

Tabel 4.4: Effect van Cd en hitte op *Populus canadensis*. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de ecofysiologische parameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

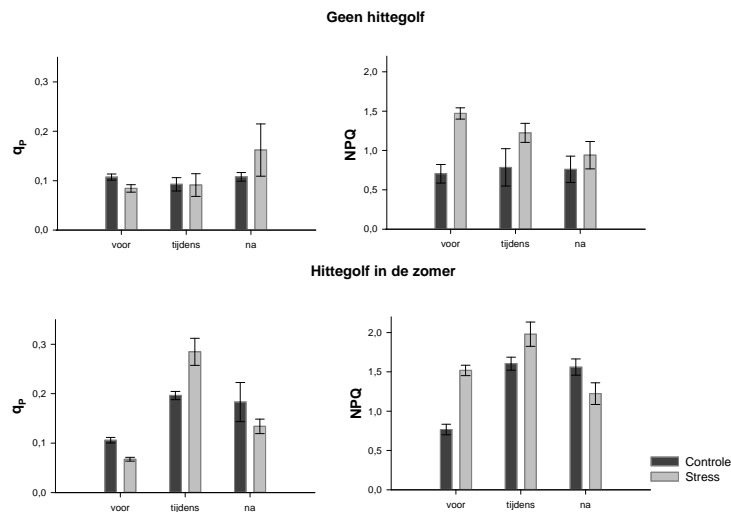
	C.Zomer	S.Zomer
behandeling	5	6
P_{bruto}	-48***	- 13
R	97	158
g_s	-27*	6
WUE	-98	-232

Fluorescentieparameters

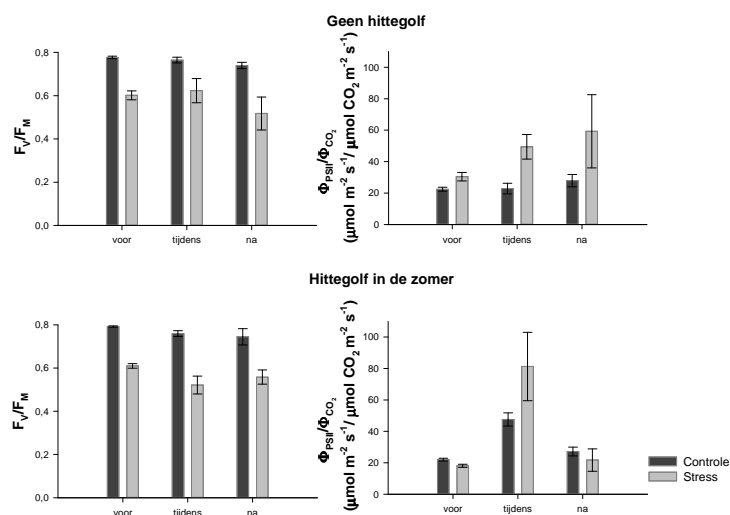
Figuur 4.9 geeft het verloop van q_P en NPQ weer in functie van de tijd. Zowel q_P als NPQ stijgen tijdens de hittegolf in de zomer. Figuur 4.10 toont het verloop van F_V/F_M en $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ in functie van de tijd. Ook tijdens de hittegolf in de zomer is er geen duidelijk effect van een hittegolf op F_V/F_M zichtbaar. $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ neemt tijdens de hittegolf in de zomer toe. Op het einde van het groeiseizoen wordt ook een stijgende trend in $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ waargenomen bij de stressbomen die niet aan hitte werden blootgesteld.

In Tabel 4.5 wordt de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de lente weergegeven. Statistisch

significante verschillen worden aangeduid in de tabel. F'_V/F'_M daalt zowel bij controlebomen (-29%) als bij stressbomen (-34%) tijdens de hittegolf in de zomer, maar in tegenstelling tot bij een hittegolf in de lente blijkt enkel de afname bij controlebomen significant te zijn. De daling in F'_V/F'_M is opnieuw te wijten aan een sterkere daling in F'_M dan F'_0 (Figuur 4.11). ϕ_{PSII} neemt sterk toe bij stressbomen (+157%), terwijl bij controlebomen de toename kleiner is (+34%) gedurende de hittegolf in de zomer. De procentuele toenames van ϕ_{PSII} bij stressbomen en controlebomen zijn wel beide significant, al lijkt de kleinere toename significanter. De ETR volgt dezelfde trend als ϕ_{PSII} . De significante toename van q_P gedurende de hittegolf in de zomer is beduidend groter bij stressbomen dan bij controlebomen. De significante procentuele stijging in NPQ is, in tegenstelling tot een hittegolf in de lente, bij controlebomen aanzienlijk groter dan bij stressbomen gedurende een hittegolf in de zomer. ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} stijgt gedurende de hittegolf in de zomer. Net zoals tijdens de hittegolf in de lente, is deze stijging van ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} bij stressbomen beduidend groter dan bij controlebomen gedurende de hittegolf in de zomer. Tijdens de hittegolf in de zomer is echter enkel de procentuele toename van ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} bij controlebomen significant.



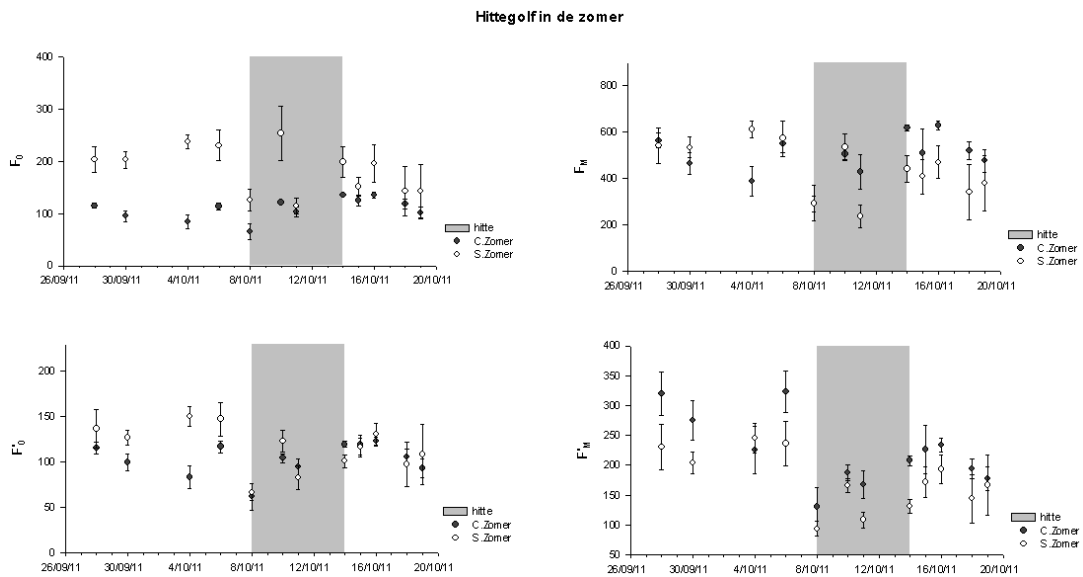
Figuur 4.9: Overzicht van de gemiddelde fotochemische quenching (q_P) en niet-fotochemische quenching (NPQ) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 40).



Figuur 4.10: Overzicht van de gemiddelde F_V/F_M en ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) van de controlebomen en stressbomen in functie van de tijd. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 40).

Tabel 4.5: Effect van Cd en hitte op *Populus canadensis*. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname (%) van de fluorescentieparameters, relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

behandeling	C.Zomer 5	S.Zomer 6
F_V/F_M	- 4*	- 14
F'_V/F'_M	- 29**	- 34
ϕ_{PSII}	34***	157*
qP	85***	323**
NPQ	109***	30*
ETR	29***	146*
ϕ_{CO_2}	- 41*	- 11
ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2}	116**	348



Figuur 4.11: F_0 , F_M , F'_0 en F'_M uitgezet in functie van de tijd tijdens de gesimuleerde hittegolfin de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 10).

Om na te gaan of planten een verschillende respons hebben op hitte in de lente of hitte in de zomer, werd een t-test op de ecofysiologische en fluorescentieparameters uitgevoerd. Bij zowel controlebomen als stressbomen is R in de lente significant hoger dan R in de zomer. g_s in de lente is daarentegen significant lagere dan g_s in de zomer bij controlebomen en stressbomen. Bij stressbomen is ook ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} in de lente significant lager dan ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} in de zomer (resultaten niet weergegeven).

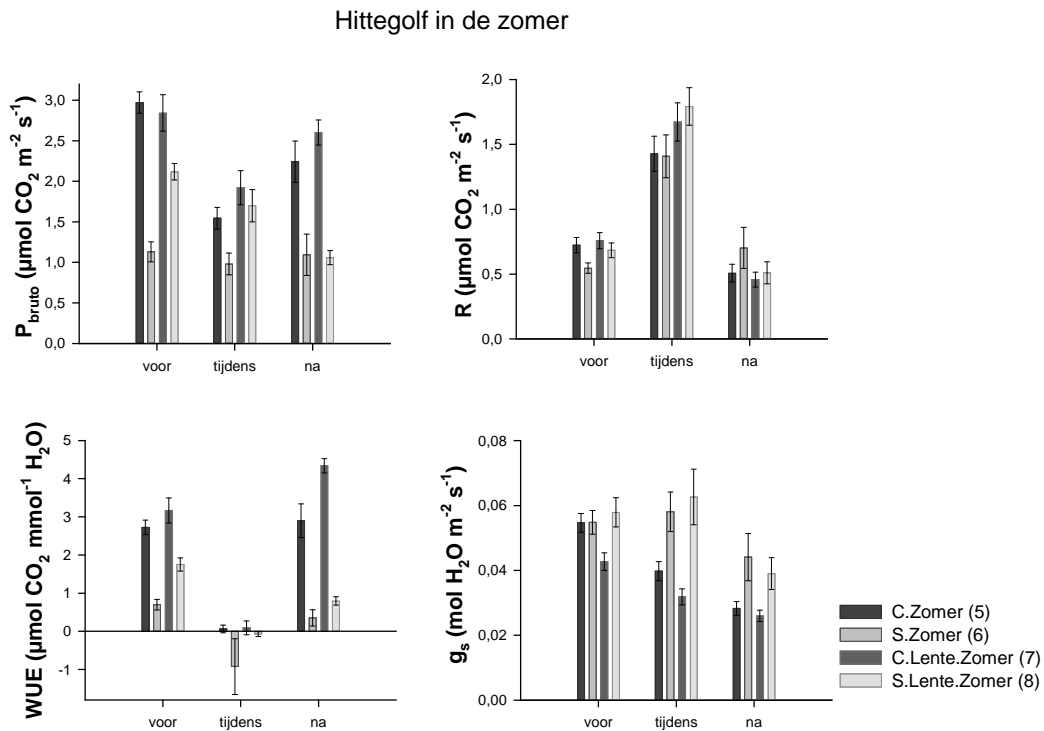
4.3 Acclimatisatie van *Populus canadensis* aan hitte

Een belangrijk onderdeel van deze studie is het nagaan van acclimatisatie aan hitte en het effect van Cd op deze acclimatisatie aan hitte. Om de acclimatisatie te onderzoeken werd dieper ingegaan op behandeling 5, 6, 7 en 8. Dit zijn de controle- en stressbomen die blootgesteld zijn aan ofwel één hittegolfin de zomer ofwel twee hittegolven (lente en zomer).

Ecofysiologische parameters

De respons van de ecofysiologische parameters P_{bruto} , R , WUE en g_s op de hittegolfin de zomer wordt weergegeven in Figuur 4.12. P_{bruto} werd berekend als de som van P_{sat} en R . Bij de stressbomen werd een minder sterke reductie in P_{bruto} waargenomen dan bij controlebomen tijdens de hittegolfin de zomer. Voor de vier behandelingen werd een sterke reductie in P_{sat} waargenomen gedurende de hittegolfin de zomer waarbij P_{sat} bij stressbomen zelfs negatief wordt (resultaten niet weergegeven). R stijgt gedurende de hittegolfin de zomer waarbij de bomen die reeds blootgesteld werden aan een hittegolfin de lente een hogere R lijken te hebben

dan de bomen niet blootgesteld aan een hittegolf in de lente. Daarnaast volgt de WUE dezelfde trend als P_{sat} . g_s van controlebomen daalt tijdens de hittegolf in de zomer, terwijl dit niet het geval is voor stressbomen. Na de hittegolf blijkt g_s van zowel controle- als stressbomen te dalen. Tabel 4.6 toont de procentuele toe- of afname van de ecofysiologische parameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel. De reductie in P_{sat} tijdens de hittegolf in de zomer is telkens groter bij de stressbomen dan de controlebomen. Behandeling 5 en 7 hebben een significante procentuele afname van respectievelijk 95% en 88%. Behandeling 6 en 8 hebben een procentuele afname van respectievelijk 173% en 106% (resultaten niet weergegeven). Het valt hierbij op dat er een groot verschil is tussen de reducties van de stressbomen terwijl dit verschil bij de controlebomen eerder verwaarloosbaar is. Het aantal hittegolven lijkt geen effect te hebben op de verandering in g_s . Het valt daarentegen wel op dat g_s daalt in respons op hitte bij controlebomen en stijgt bij stressbomen, maar deze lichte stijging is echter niet significant.



Figuur 4.12: Overzicht van de ecofysiologische parameters P_{bruto} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), R ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), WUE ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) en g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) voor behandeling 5, 6, 7 en 8. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=20$ tot 50).

Tabel 4.6: Acclimatisatie van *Populus canadensis* aan hitte. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de ecofysiologische parameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

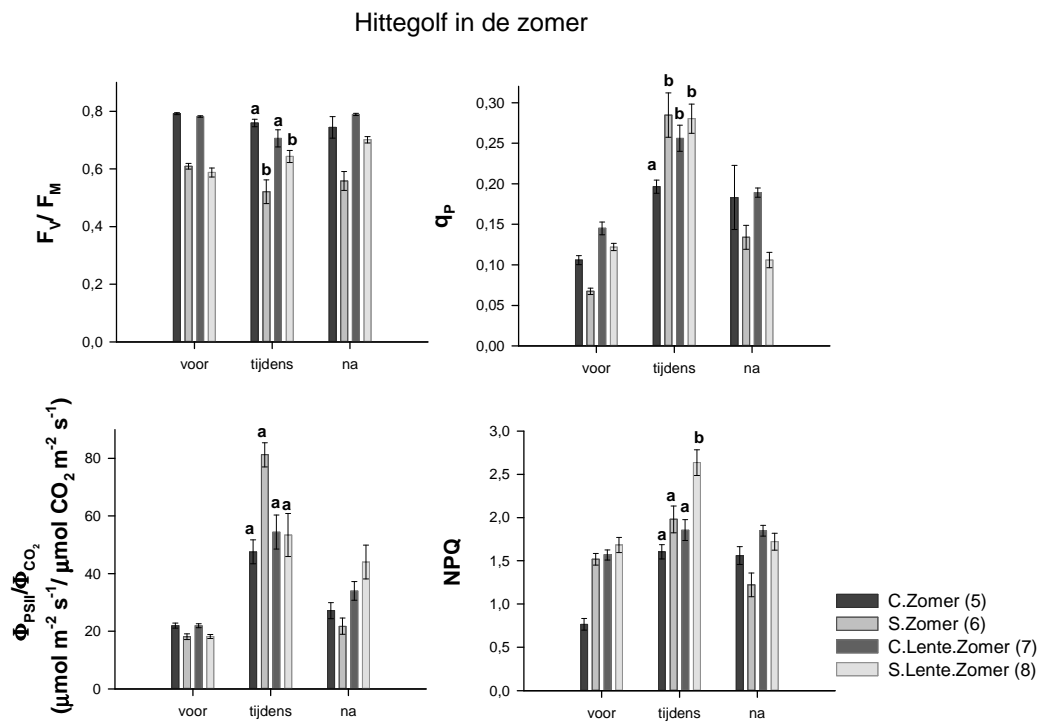
behandeling	C.Zomer 5	S.Zomer 6	C.Lente.Zomer 7	S.Lente.Zomer 8
R	97	158	121**	162*
P_{bruto}	-48***	- 13	-32	-20
WUE	-98	-232	-97	-104
g_s	-27*	6	-26*	8

Fluorescentieparameters

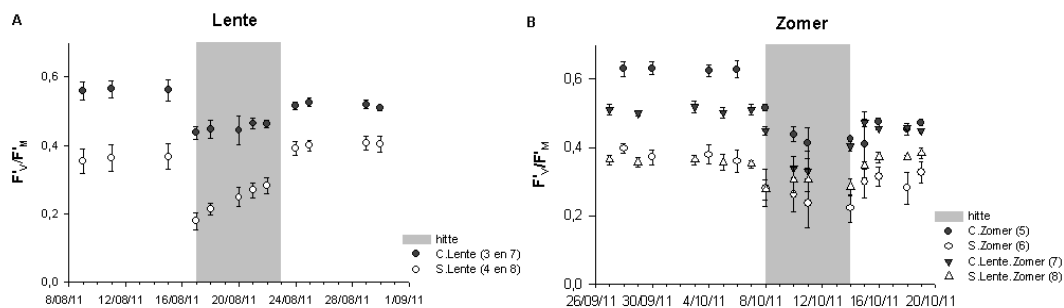
In Figuur 4.13 wordt de respons van de fluorescentieparameters F_V/F_M , q_P , $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ en NPQ op de hittegolf in de zomer weergegeven. F_V/F_M is bij controlebomen steeds hoger dan bij stressbomen, zoals reeds werd getoond in de resultaten uit sectie 4.1. Een duidelijke daling tijdens de hittegolf in de zomer werd echter niet waargenomen. q_P neemt daarentegen toe tijdens de hittegolf in de zomer voor de vier behandelingen. Deze trend geldt ook voor de NPQ, maar de stijging van NPQ is minder sterk dan die van q_P . $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ neemt tijdens de hittegolf in de zomer eveneens voor alle vier behandelingen toe, maar de toename lijkt het sterkst te zijn voor behandeling 6. Na de hittegolf is $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ het laagst voor behandeling 6 en het hoogst voor behandeling 8.

De significantie wordt met een letter boven de staafjes weergegeven in Figuur 4.13. Tabel 4.7 toont een overzicht van de procentuele toe- of afname van de fluorescentieparameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf. Statistisch significante verschillen worden aangeduid in de tabel. Opmerkelijk is de lichte stijging van F_V/F_M bij behandeling 8 gedurende de hittegolf in de zomer, maar deze is echter niet significant. F'_V/F'_M daalt slechts met 18% bij behandeling 8. Deze reductie is kleiner dan voor behandeling 5, 6 en 7. In Figuur 4.14 wordt F'_V/F'_M per dag uitgezet gedurende de hittegolf in de lente en zomer. Voor, tijdens en na de hittegolf in de lente werden de waarden van behandeling 3 en 7 samengenomen evenals die van 4 en 8. De controlebomen starten voor de hittegolf in de lente reeds met een hogere F'_V/F'_M dan stressbomen (zie sectie 4.1). Zodra een eerste hittegolf wordt gesimuleerd, daalt F'_V/F'_M abrupt, zowel voor controle- als stressbomen. De F'_V/F'_M van stressbomen neemt echter weer sterker toe tijdens de hittegolf dan bij controlebomen. Bovendien hebben de stressbomen na de hittegolf in de lente een hogere F'_V/F'_M dan voor de hittegolf terwijl dit bij controlebomen net omgekeerd is. Er kon bovendien een significant verschil in F'_V/F'_M worden vastgesteld voor en na de hittegolf in de lente bij controlebomen, maar niet bij stressbomen (resultaten niet weergegeven). Gedurende de hittegolf in de zomer daalt F'_V/F'_M sterker bij controlebomen dan bij stressbomen, hoewel dit gedurende de hittegolf in de lente omgekeerd was. Opmerkelijk is dat de F'_V/F'_M van controlebomen en stressbomen die reeds blootgesteld zijn aan een hittegolf

in de lente minder sterk dalen dan controlebomen en stressbomen die niet blootgesteld zijn aan een hittegolf in de lente (Figuur 4.14). Bovendien is de procentuele daling in F'_V/F'_M tijdens de hittegolf in de zomer enkel significant voor behandeling 5 en 7 (Tabel 4.7). F'_V/F'_M van behandeling 8 neemt na de hittegolf in de zomer weer dezelfde waarde aan als ervoor, terwijl dit niet het geval is voor behandeling 5, 6 en 7 (Figuur 4.14). Tabel 4.7 toont eveneens dat ϕ_{PSII} stijgt gedurende de hittegolf in de zomer. De stijging in ϕ_{PSII} is beduidend hoger bij stressbomen dan controlebomen. Echter, de procentuele stijging in ϕ_{PSII} van behandeling 6 is twee keer zo hoog als die van behandeling 8. ETR en q_P volgen een analoge trend als ϕ_{PSII} , waarbij het verschil tussen behandeling 6 en 8 bij q_P zelfs nog groter is. Controlebomen lijken een sterkere daling in ϕ_{CO_2} te vertonen dan stressbomen tijdens de hittegolf in de zomer. ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} stijgt gedurende de hittegolf in de zomer. Behandeling 6 vertoont de sterkste stijging, maar opvallend is dat behandeling 8 niet zoveel sterker stijgt als behandeling 5 en 7 (Tabel 4.7).



Figuur 4.13: Overzicht van de fluorescentieparameters F_V/F_M , q_P , ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en NPQ voor behandeling 5, 6, 7 en 8. Voor, tijdens en na wijzen op metingen uitgevoerd respectievelijk voor, tijdens en na het simuleren van de hittegolf in de zomer. Significante verschillen tussen de behandelingen tijdens de hittegolf in de zomer worden weergegeven met een letter. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De staafjes geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=20$ tot 50).



Figuur 4.14: A: F'_V/F'_M uitgezet in functie van de hittegolf in de lente. B: F'_V/F'_M uitgezet in functie van de hittegolf in de zomer. De cijfers in de legende verwijzen naar de behandeling. De punten geven de gemiddeldes van de behandelingen met de standaardfout weer ($n=5$ tot 20).

Tabel 4.7: Acclimatisatie van *Populus canadensis* aan hitte. De waarden in deze tabel geven de procentuele toe- of afname van de fluorescentieparameters (%), relatief ten opzichte van de periode voorafgaand aan de hittegolf in de zomer. Significantie: *** voor $p < 0,001$; ** voor $p < 0,01$; * voor $p < 0,05$.

behandeling	C.Zomer 5	S.Zomer 6	C.Lente.Zomer 7	S.Lente.Zomer 8
F_V/F_M	- 4*	- 14	- 10*	9
F'_V/F'_M	- 29**	- 34	- 25**	- 18
ϕ_{PSII}	34***	157*	31***	82**
q_P	85***	323**	77**	130
NPQ	109***	30*	18	57*
ETR	29***	146*	27**	76*
ϕ_{CO_2}	- 41*	- 11	- 38	- 19
ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2}	116**	348	148**	194*

5

Discussie

5.1 Respons van *Populus canadensis* op Cd

Er werd reeds veelvuldig aangetoond dat Cd de fotosynthese negatief beïnvloedt (Gaudet et al., 2011). In het experiment van Gaudet et al. (2011) werd de transpiratie significant gereduceerd door Cd-behandeling. De blootstelling van de wortels aan Cd kan abscissinezuur signalen activeren van de wortels naar de bladeren. Dit kan leiden tot het sluiten van de huidmondjes en een daling in transpiratie. Een hoge [Cd] in de wortels kan hun functionaliteit beschadigen en leiden tot droogtestress. Dit kan ook eventueel de lagere transpiratie en lagere assimilatie verklaren (Gaudet et al., 2011). Gu et al. (2007) observeerde een daling in P_{sat} die duidelijk gerelateerd was met de stomatale geleidbaarheid en de transpiratiesnelheid toonde gelijkaardige veranderingen. In deze experimenten werd echter geen significante daling in E en g_s waargenomen, maar wel een significante reductie in P_{sat} bij bomen blootgesteld aan Cd (Tabel 4.1). De daling in P_{sat} is hier dus niet gerelateerd met g_s en E en bijgevolg lijkt Cd geen reductie in fotosynthese te veroorzaken als gevolg van stomatale limitatie. In onze experimenten werd de P_{bruto} berekend als de som van P_{sat} en R . Uit de resultaten bleek dat de daling van P_{sat} groter is dan de daling van P_{bruto} (Tabel 4.1). Zowel P_{bruto} , P_{sat} en R dalen in deze experimenten, terwijl men toch een stijging in R verwacht onder stresscondities. Via donkerrespiratie probeert de plant immers zijn schade, veroorzaakt door stress, te herstellen. De daling in R kan mogelijks verklaard

worden door substraatlimitatie. Het substraat voor respiratie bestaat voornamelijk uit zetmeel (Hüve et al., 2012). In experimenten van Ivanova et al. (2008) was de donkerrespiratiesnelheid in soorten die zetmeel accumuleren significant hoger dan in soorten met een tekort aan zetmeel. De respiratiesnelheid wordt bepaald door de beschikbaarheid van substraat, de vraag naar producten van het respiratieproces en de capaciteit van de respiratie-enzymen. Bij gematigde temperaturen wordt de respiratiesnelheid in het donker gereguleerd door de voorziening van substraat en/of adenylaten, terwijl in koude omstandigheden de respiratie gelimiteerd is door de maximum capaciteit van de respiratie-enzymen. Daarnaast verschilt de respiratieregulatie tussen species: snelgroeïende soorten zoals *P. tremula* zullen sneller substraat gelimiteerd zijn dan traaggroeïende soorten (Hüve et al., 2012).

F_V/F_M is een maat voor de maximale efficiëntie van PSII, m.a.w. de quantum efficiëntie als alle PSII centra open zijn. De optimale waarde voor F_V/F_M is 0,83. Indien F_V/F_M kleiner is dan 0,83, ondergaat de plant stress. In onderzoek van Gaudet et al. (2011) was F_V/F_M constant in planten blootgesteld aan Cd en niet gerelateerd met Cd-tolerantie (Papageorgiou & Govindjee, 2004; Gaudet et al., 2011). In deze masterproef blijkt F_V/F_M echter wel een goede indicator voor Cd-stress te zijn, aangezien F_V/F_M in stressbomen steeds significant lager is dan F_V/F_M in controlebomen. Deze trend geldt ook voor F'_V/F'_M (Tabel 4.1). F'_V/F'_M geeft een indicatie voor de schade aan het fotosynthetisch apparaat (Baker, 2008; Maxwell & Johnson, 2000). Wanneer het fotosynthetisch apparaat schade ondervindt, zal de waarde voor F'_0 toenemen, zodat F'_V/F'_M daalt (Figuur 4.6 en 4.11). De significante lagere waarde van F'_V/F'_M in stressbomen toont aan dat Cd schade veroorzaakt aan het fotosynthetisch apparaat (Figuur 4.14).

Volgens Papageorgiou & Govindjee (2004) is de hoofdoorzaak van een lagere fotosynthese door zware metalen de invloed van deze zware metalen op de activiteit van de enzymen van de Calvin-Benson cyclus. Hierdoor zal de Calvin-Benson cyclus niet op zijn optimale snelheid werken waardoor ook het elektronentransport vertraagd kan worden (Papageorgiou & Govindjee, 2004). In onze experimenten is de ETR van stressbomen significant lager dan de ETR van controlebomen (Tabel 4.1). Dit toont aan dat Cd het elektronentransport sterk vertraagt. Een vertraagd elektronentransport kan een daling in de bereikte efficiëntie van PSII (ϕ_{PSII}) veroorzaken. Anderzijds kan een daling in ϕ_{PSII} ook te wijten zijn aan schade aan het fotosynthetisch apparaat. In deze experimenten is ϕ_{PSII} van stressbomen significant lager dan ϕ_{PSII} van controlebomen. De oorzaak van de lagere ϕ_{PSII} bij stressbomen kan dus zowel veroorzaakt worden door de inwerking van Cd op de Calvin-Benson cyclus en door schade aan PSII door Cd. q_P en NPQ zijn respectievelijk significant lager en hoger in stressbomen (Tabel 4.1). Dit toont aan dat er minder elektronen naar de fotochemische reacties gaan en meer lichtenergie gedissipeerd wordt als warmte. Dit wordt bevestigd door een significant lagere waarde van ϕ_{CO_2} in stressbomen aangezien ϕ_{CO_2} de actuele efficiëntie van de CO_2 -fixatie weergeeft (Tabel 4.1).

De lagere fotosynthese bij stressbomen in deze experimenten is dus het gevolg van schade aan het fotosynthetisch apparaat en niet door het sluiten van stomata. Hierdoor kunnen minder elektronen gebruikt worden voor de aanmaak van ATP, die voor de inbouw van CO_2 zorgt.

Anderzijds kan de lagere fotosynthese ook verklaard worden door de inwerking van Cd op de enzymen van de Calvin-Benson cyclus. Dit leidt tot een trager elektrontransport en bijgevolg tot een lagere fotosynthesesnelheid. Hieruit kan besloten worden dat stressbomen een minder sterke groei hebben dan controlebomen.

5.2 Respons van *Populus canadensis* op hitte en Cd

Het fotosyntheseproces is zeer gevoelig voor hitte en wordt dus sterk beïnvloed door hittestress. Hitte veroorzaakt niet noodzakelijk schade aan het fotosynthetisch apparaat, maar kan toch een sterke reductie in de fotosynthetische capaciteit veroorzaken (Sharkey, 2005). In deze experimenten werden zowel de controlebomen als de stressbomen onderworpen aan gesimuleerde hittegolven. Deze hittegolven hadden een dagtemperatuur van 40°C, die ruim boven het temperatuuroptimum gelegen is. In deze sectie wordt enkel de invloed van een hittegolf in de lente of in de zomer op populieren die wel en niet blootgesteld zijn aan Cd onderzocht. In de volgende sectie wordt dieper ingegaan op acclimatisatie en worden de verschillen in de respons van *Populus canadensis* op één en twee hittegolven onderzocht.

P_{sat} vertoont een significante daling tijdens de hittegolf in de lente en zomer voor zowel controlebomen als stressbomen. Bij controlebomen daalt P_{bruto} significant en stijgt R significant tijdens de hittegolf in de lente. Tijdens de hittegolf in de zomer is enkel de stijging in P_{bruto} significant (Tabel 4.2 en 4.4). Een daling in fotosynthese door hitte wordt veroorzaakt door verschillende mechanismen. Ten eerste neemt bij stijgende temperaturen de oxygenase activiteit van Rubisco toe en zal Rubisco een hogere affiniteit hebben voor O_2 waardoor de fotorespiratie stijgt en bijgevolg de netto-fotosynthese daalt. Daarnaast is de daling in de CO_2/O_2 oplosbaarheid bij stijgende temperaturen tevens verantwoordelijk voor 1/3 van de stijging in fotorespiratie. Bovendien is Rubisco hittelabel waardoor de Rubisco-activiteit afneemt en deactivatie van Rubisco plaatsvindt tijdens hitte (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004). Carmo-Silva & Salvucci (2011) toonden aan dat de activase-activiteit daalt boven temperaturen van 32,5°C bij verschillende planten. De temperaturen die corresponderen met een volledige inhibitie van de activase-activiteit waren 38 en 40°C voor respectievelijk huttentut en zandraket en 43°C voor de tabakspant en de katoenplant (Carmo-Silva & Salvucci, 2011). De temperatuur gedurende de hittegolf in onze experimenten komt overeen met deze range waar volledige inhibitie van de activase-activiteit plaatsvindt en speelt dus zeker een rol in de daling van de fotosynthese. Een daling in fotosynthese door hitte kan ook veroorzaakt worden door een toename van de niet-fotochemische quenching die gerelateerd is met de intra-thylakoïd protonengradiënt. Het elektrontransport gaat namelijk gepaard met een protontransport naar het thylakoïdlumen, zodat een protonengradiënt tussen het thylakoïdlumen en het stroma ontstaat. Een grote protonengradiënt lijkt violaxanthin reversibel om te zetten in zeaxanthin. Binding van protonen en zeaxanthin aan eiwitten van de light-harvesting antennae veroorzaken vorm veranderingen die leiden tot een energiedissipatie onder de vorm van warmte (Steppe, 2011). In deze experimenten werd een significante procentuele stijging in NPQ gedurende de hittegolf in de lente en zomer vastgesteld, voor zowel controle- als stressbomen (Tabel 4.3 en 4.5). Deze toename van NPQ

is gedeeltelijk verantwoordelijk voor de daling in P_{sat} , doordat opgevangen lichtenergie meer gedissipeerd wordt als warmte.

In deze experimenten werd naast een daling in P_{bruto} eveneens een significante stijging in R voor controlebomen en stressbomen gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.2) waargenomen. Enzymen werken sneller door de hogere temperatuur waardoor de R stijgt. Gedurende de donkerrespiratie wordt energie geproduceerd voor onderhoud en eventueel herstel.

De stomatale geleidbaarheid wordt sterk beïnvloed door hoge temperaturen en daar speelt ook VPD een belangrijke rol. Bij hitte zal het VPD toenemen waardoor de stomata zullen sluiten om waterverlies te beperken. In deze experimenten is er tijdens de hittegolf in de lente een significante daling in g_s waar te nemen (Tabel 4.2). Een daling in g_s gaat normaal gepaard met een daling in E . In deze experimenten is er echter een significante toename in E waar te nemen gedurende de hittegolf in de lente (sectie 4.2). Dit is te wijten aan een grotere stijging in VPD dan de daling in g_s . Door de hoge temperaturen moeten de populieren meer afkoelen dan onder normale omstandigheden en dit gebeurt via transpiratie. De sterke toename in transpiratie in combinatie met de lagere P_{sat} leidt tot een significante procentuele reductie van de WUE gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.2).

Guo et al. (2006) onderzochten het effect van hoge temperaturen bij citrusvruchten. Een daling van F_V/F_M en stijging in F_0 wees op schade aan PSII als respons op hoge temperaturen. De tolerantie voor hoge temperaturen was duidelijk gecorreleerd met F_V/F_M (Guo et al., 2006). In het experiment van Haldimann & Feller (2005) daarentegen werd de F_V/F_M ratio nauwelijks beïnvloed door hoge bladtemperaturen tussen 25 en 38°C (Haldimann & Feller, 2005). Dalingen in F_V/F_M werden gezien als een indicator van inactivatie van PSII reactiecentra, die veroorzaakt zijn door schade aan het thylakoïdmembraan (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004). In deze experimenten daalt de F_V/F_M nauwelijks bij controlebomen (-2%) en stressbomen (-1%) gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.3). Deze procentuele dalingen in F_V/F_M blijken echter significant, maar zijn zo gering dat F_V/F_M in deze experimenten niet als indicator voor hittestress beschouwd wordt. Bovendien gaat in onderzoek van Guo et al. (2006); Haldimann & Feller (2005); Hüve et al. (2012) schade aan PSII door hitte gepaard met een stijging in F_0 . In de experimenten van Ducruet (1999) met maïs werd eveneens boven 40°C een sterke stijging in F_0 waargenomen. Dit bleek het gevolg van een blokkade van het PSII (Ducruet, 1999). Armond et al. (1980) stelden daarentegen vast dat F_0 ook kon dalen bij hittestress. Dit was het gevolg van een verminderde interactie tussen het LHC en PSII. In de experimenten van Ducruet (1999) werd tevens eerst een stijging en vervolgens een daling in F_0 waargenomen bij hoge temperaturen door het gecombineerd effect van de blokkade van PSII en de dissociatie van LHC. In deze experimenten werd er echter enkel een significante daling in F_0 waargenomen tijdens de hittegolf in de lente (Figuur 4.6). Hierdoor lijkt het dus dat hitte (40°C) geen schade aan het fotosynthetisch apparaat veroorzaakt bij *Populus canadensis*. Een stabiel PSII bij populieren en bijgevolg geen blokkade van PSII is hiervoor een mogelijke verklaring. Volgens Hüve et al. (2012) beschikt *P. tremula* over een beschermingsmechanisme tegen hitte door de uitstoot van isopreen. Isopreen is namelijk in staat om de membraanstructuren te stabiliseren (Hüve et al., 2012). Dit mechanisme kan mogelijks de grotere stabiliteit van PSII van *Populus*

canadensis tegen hitte verklaren door het vermogen om isopreen uit te stoten. Vermoedelijk vond in onze experimenten enkel de dissociatie van het LHC plaats wat de daling in F_0 kan verklaren. De parameter F'_V/F'_M is ook een belangrijke indicator voor schade aan het fotosynthetisch apparaat. In deze experimenten vertoont F'_V/F'_M een significante daling bij controlebomen en stressbomen gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.2). Dit wijst normaal gezien op schade aan het PSII. Deze conclusie kan enkel genomen worden indien de daling in F'_V/F'_M het gevolg is van een stijging in F'_0 (Baker, 2008; Maxwell & Johnson, 2000). In deze experimenten daalt F'_0 waardoor de daling in F'_V/F'_M veroorzaakt wordt door een sterkere daling in F'_M dan F'_0 en dus geen indicatie is voor schade aan PSII (Figuur 4.6 en 4.11). Bovendien is er in dit experiment een significante toename van ϕ_{PSII} bij controlebomen en stressbomen waar te nemen tijdens de hittegolf in de lente en zomer, wat ook aantoont dat er geen schade aan PSII is (Tabel 4.3 en 4.5). ϕ_{PSII} neemt bij controlebomen en stressbomen respectievelijk met +16% en +93% toe gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.3). Bij een stijging van ϕ_{PSII} zou men normaal ook een stijging in P_{sat} verwachten. Echter, volgens Maxwell & Johnson (2000) is er enkel een sterke lineaire relatie tussen ϕ_{PSII} en de efficiëntie van CO_2 -fixatie onder laboratoriumcondities. Wanneer planten blootgesteld zijn aan stress gaat deze relatie tussen ϕ_{PSII} en CO_2 -fixatie niet meer op als gevolg van veranderingen in de fotorespiratie of pseudocyclisch elektrontransport (Maxwell & Johnson, 2000). Volgens Sharkey (2005) komt schade aan PSII enkel voor bij zeer hoge temperaturen, vaak boven $45^\circ C$. Gematigde hittestress brengt in de meeste planten geen schade aan PSII maar reduceert wel sterk de fotosynthesesnelheid (Sharkey, 2005). In deze experimenten is er een sterke daling in P_{sat} tijdens de hittegolven. Dit stemt overeen met de bevindingen in deze experimenten. Bovendien waren de maximale temperaturen ($40^\circ C$) lager dan de temperaturen waarbij Sharkey (2005) vermeldt dat er schade aan PSII optreedt.

In het onderzoek van Haldimann & Feller (2005) met erwten ging de inhibitie van netto-fotosynthese bij bladtemperaturen hoger dan $35^\circ C$ samen met een hitte-afhankelijk reductie van ϕ_{PSII} , wat ontstaat uit zowel een daling in q_P als een daling in F'_V/F'_M , wat gecorreleerd is met een stijging in NPQ. De reductie van ϕ_{PSII} was minder groot dan de netto-fotosynthese, wat aantoont dat elektronen naar alternatieve sinks werden gebracht (Haldimann & Feller, 2005). In onze experimenten was er echter een significante stijging in q_P en ϕ_{PSII} gedurende de hittegolf in de lente en zomer (Tabel 4.3 en 4.5). Desondanks, kon geen significante toename worden vastgesteld in P_{bruto} (Tabel 4.2 en 4.4). Onder deze stresscondities kan de geabsorbeerde energie niet gekanaliseerd worden in de reductie van CO_2 . Hierdoor kan foto-oxidatieve schade ontstaan, veroorzaakt door de Mehlerreactie. De Mehlerreactie is een bron van superoxide radicalen, ook onder optimale condities, en wordt versterkt onder stresscondities. Een stijging in de ratio ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} geeft de werking van de Mehlerreactie weer (Guo et al., 2006). In het onderzoek van Guo et al. (2006) hadden de temperatuursgevoelige citrussoorten een hoge ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} onder hoge temperaturen. Dit werd mogelijks veroorzaakt door de Mehlerreactie aangezien de producten van de Mehlerreactie toenamen (Guo et al., 2006). H_2O_2 wordt gevormd via de Mehlerreactie en via fotorespiratie. In de experimenten van Guo et al. (2006) daalde de fotorespiratie tijdens de hittegolf waardoor men besloot dat H_2O_2 voornamelijk door de Mehlerreactie gevormd werd. In de experimenten van Noctor et al. (2002)

met gewone tarwe (*Triticum aestivum*) was fotorespiratie echter voor 70% verantwoordelijk voor de vorming van H_2O_2 . In het onderzoek van Oberhuber & Edwards (1993) werd een stijging in $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ bij stijgende temperaturen eveneens als een indicatie voor stijging van fotorespiratie bij C_3 -planten beschouwd. In de experimenten, uitgevoerd in deze masterproef, neemt $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ significant toe bij zowel controlebomen als stressbomen gedurende de hittegolf in de lente (Tabel 4.3). Hieruit kunnen we besluiten dat de sterke reductie van P_{sat} te verklaren is door een toename in fotorespiratie en niet enkel door een toename van de donkerrespiratie en NPQ. De stijging in $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ bij stressbomen is in de lente bovendien veel sterker dan bij controlebomen waaruit we kunnen besluiten dat de stijging van fotorespiratie bij stressbomen groter is dan bij controlebomen (Tabel 4.3). Dit verklaart ook de sterkere daling in P_{sat} bij stressbomen dan bij controlebomen gedurende de hittegolf in de lente (zie sectie 4.2). Net zoals bij ϕ_{PSII} , is de toename van q_{P} bij stressbomen veel hoger dan bij controlebomen gedurende de hittegolf in de lente en in de zomer (Tabel 4.3 en 4.5). Dit wil zeggen dat stressbomen hun gecapteerde lichtenergie beter naar fotosynthetische reacties kunnen sturen dan controlebomen tijdens de hittegolf, m.a.w. stressbomen hebben een efficiëntere energieverdeling tijdens hitte. Dit kan ook de sterkere toename in ϕ_{PSII} bij stressbomen in de hittegolf verklaren. Echter, deze hogere ϕ_{PSII} en q_{P} brengen niets op aangezien deze energie voor een groot deel voor fotorespiratie gebruikt wordt. In het experiment van Guo et al. (2006) hebben tolerante soorten een hogere q_{P} dan gevoelige soorten onder hoge temperaturen. Guo et al. (2006) suggereert dat de tolerante soorten beschikken over een beschermingsmechanisme dat overmatige reductie van PSII acceptoren voorkomt (Guo et al., 2006). Vermoedelijk is dit beschermingsmechanisme een hogere fotorespiratie. De hogere q_{P} van de stressbomen tijdens de hittegolf in de lente en zomer uit deze experimenten kunnen dus wijzen op een hogere tolerantie voor hittestress doordat stressbomen meer aan fotorespiratie doen (Figuur 4.4 en 4.9).

Voor de meeste parameters werden geen significante verschillen waargenomen tussen de respons op een hittegolf in de lente en een hittegolf in de zomer. Zowel bij controlebomen als stressbomen is de R in de lente significant hoger dan de R in de zomer. Jonge bladeren zijn actiever en zullen meer respireren. In experimenten van Urban et al. (2008) met drie populierenklonen (*Populus alba*, *P. nigra* en *P. x euramericana*) werd ook een hogere R in jonge bladeren dan in volgroeide bladeren gevonden. Deze experimenten onderzochten echter enkel het effect van de leeftijd van de bladeren, zonder hitte in rekening te brengen. In onze experimenten is de R in jonge bladeren tevens hoger dan de R in volgroeide bladeren. De g_{s} tijdens de hittegolf in de lente is daarentegen significant lager dan de g_{s} tijdens de hittegolf in de zomer. In de experimenten van Urban et al. (2008) werd echter een hogere stomatale limitatie bij volgroeide bladeren dan bij jonge bladeren vastgesteld in alle populierenklonen. Mogelijks kan dit verklaard worden door de blootstelling aan hitte in onze experimenten. Jonge bladeren reageren mogelijks meer op de hitte waardoor ze meer hun stomata sluiten om waterverlies te beperken. Bij stressbomen is ook de parameter $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ van bomen blootgesteld aan een hittegolf in de lente significant lager dan $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ van bomen blootgesteld aan een hittegolf in de zomer. Dit kan wijzen op een hogere fotorespiratie bij stressbomen tijdens de hittegolf in de zomer dan tijdens de hittegolf in de lente. Een mogelijke verklaring voor dit verschil in fotorespiratie is niet gevonden. Verder

onderzoek zal moeten uitwijzen of deze hypothese kan worden bevestigd.

De daling in fotosynthese door hitte wordt dus door verschillende mechanismen verklaard. De daling in de CO_2/O_2 oplosbaarheid bij hoge temperaturen en de sterkere affiniteit van Rubisco voor O_2 zorgt voor een sterkere fotorespiratie. Deze sterkere fotorespiratie is af te leiden uit de sterke stijging van ϕ_{PSII} en q_P terwijl de P_{bruto} veel minder sterk stijgt. Bovendien stijgt de ratio $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ bij stressbomen sterker dan bij controlebomen in de lente, wat kan wijzen op een sterkere toename in fotorespiratie bij stressbomen. Verder werd er meer energie aangemaakt voor onderhoud en eventuele schade wat af te leiden is uit de stijging in R gedurende de hittegolven. Ook wordt een groter deel van de energie gedissipeerd onder de vorm van warmte tijdens de hittegolven, aangezien de NPQ stijgt. Er werd echter geen schade aan PSII vastgesteld aangezien F_0 een daling vertoonde gedurende de hittegolven. Een mogelijke verklaring voor deze daling is de dissociatie van het LHC.

5.3 Acclimatisatie van *Populus canadensis*

De focus in dit onderzoek ligt eveneens op de acclimatisatie van *Populus canadensis* aan hitte. Net zoals tijdens de hittegolf in de lente dalen P_{bruto} , g_s en WUE, en stijgt R tijdens de hittegolf in de zomer (Figuur 4.12). De P_{bruto} in Figuur 4.12 toont aan dat stressbomen minder last hebben van de hittegolf in de zomer, aangezien de P_{bruto} minder sterk daalt bij stressbomen dan bij controlebomen tijdens hitte. De P_{sat} bij stressbomen daalt echter toch sterk door een sterke toename in R . Bovendien zijn er opmerkelijke verschillen in de mate van stijging en daling van deze ecofysiologische parameters. Bij stressbomen lijken er geen significante verschillen te zijn in de ecofysiologische parameters behalve voor R (Tabel 4.6). Echter, bij de controlebomen zijn er telkens twee ecofysiologische parameters significant verschillend. g_s vertoont een lichte stijging bij stressbomen i.p.v. een daling. De stijging van g_s bij stressbomen is echter niet significant, terwijl de daling van g_s bij controlebomen dat wel is (Tabel 4.6). Daarom kunnen we geen conclusies trekken uit de trend van g_s bij stressbomen.

In sectie 5.2 werd reeds aangetoond dat F_V/F_M niet als indicator voor hittestress kon worden gebruikt. Er werd geen schade aan het PSII vastgesteld aangezien F_0 en F'_0 dalen gedurende de hittegolf. De daling in F_V/F_M en F'_V/F'_M is dus te wijten aan een sterkere daling in respectievelijk F_M dan F_0 en F'_M dan F'_0 . In Figuur 4.14 wordt F'_V/F'_M in functie van de hittegolf in de lente en de zomer weergegeven. De abrupte daling in F'_V/F'_M bij de start van de hittegolf in de lente toont aan dat zowel controlebomen als stressbomen hittestress ondervinden. Wanneer een plant blootgesteld wordt aan hittestress, worden grote hoeveelheden ROS in de plantencellen gevormd die leiden tot oxidatieve stress. Deze ROS beschadigen pigmenten en membranen waardoor deze hun semi-permeabiliteit verliezen (Wahid et al., 2007). H_2O_2 is één van deze ROS. Volgens Hung et al. (2005) resulteert een verhoogde $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in de activatie van genen die coderen voor antioxidantenzymen. Kohan et al. (2011) toonden aan dat het DREB1A gen geïnduceerd wordt als respons op stresscondities. Het DREB1A gen is ook teruggevonden in *Populus* spp. (Kohan et al., 2011). In deze experimenten is dit gen bij bomen blootgesteld aan een hittegolf in de lente, vermoedelijk ook geactiveerd waardoor deze meer

antioxidantenzymen aanmaken. In de experimenten van Chao et al. (2009) was er een verhoogde glutathionconcentratie ([GSH]) waar te nemen in bladeren van rijstzaailingen die voordien waren blootgesteld aan hoge temperaturen of behandeld waren met H_2O_2 (Chao et al., 2009). GSH is een component van het antioxidant beschermingsmechanisme en blijkt cruciaal te zijn voor de bescherming tegen Cd (Chao et al., 2009). Hieruit kunnen we afleiden dat de [GSH] in bomen met een hittegolf in de lente vermoedelijk hoger zijn dan de bomen zonder hittegolf in de lente. In Figuur 4.14 A is duidelijk een sterkere stijging in F'_V/F'_M te zien bij stressbomen gedurende de hittegolf in de lente. De hogere [GSH], geïnduceerd door de hitte, zorgt mogelijks voor een betere bescherming tegen Cd-stress. Hierdoor is het mogelijk dat het fotosynthetisch apparaat van stressbomen deels herstelt van de schade veroorzaakt door Cd-stress. Na de hittegolf lijken de controlebomen niet dezelfde waarde van F'_V/F'_M aan te nemen als voor de hittegolf. Er is een significant verschil tussen de waarden van F'_V/F'_M voor de hittegolf en na de hittegolf in de lente bij controlebomen, terwijl dit niet het geval is bij stressbomen.

Tijdens de hittegolf in de zomer is er ook een daling waar te nemen in F'_V/F'_M . In de resultaten werd reeds opgemerkt dat de F'_V/F'_M van behandeling 6 en 8 voor de hittegolf in de zomer ongeveer gelijk zijn maar gedurende de hittegolf en erna is de waarde van F'_V/F'_M van behandeling 8 hoger dan F'_V/F'_M van behandeling 6 (Figuur 4.14 B). Deze trend kan mogelijks ook verklaard worden door de verhoogde [GSH] in planten die reeds blootgesteld zijn aan een hittegolf. Door de verhoogde [GSH] bij stressbomen blootgesteld aan een hittegolf in de lente, zijn deze beter beschermd tegen Cd. Dit heeft als gevolg dat stressbomen met twee hittegolven minder schade aan PSII door Cd hebben dan stressbomen met één hittegolf. Volgens Kohan et al. (2011) is het mogelijk dat overexpressie van DREB1A leidt tot resistentie van planten tegen zware metaal toxiciteit. Bovendien valt op te merken dat F'_V/F'_M van behandeling 8 na de hittegolf in de zomer weer dezelfde waarde aanneemt als voor de hittegolf, terwijl dit niet het geval is voor behandeling 5, 6 en 7 (Figuur 4.14 B). Zoals reeds werd aangetoond, is de daling in F'_V/F'_M te wijten aan een sterkere daling in F'_M dan F'_0 . F'_M is de maximale fluorescentie bij een verzadigingspuls. Bij een verzadigingspuls geraakt het elektronentransport verstopt en zal al de energie, die zonder verzadigingspuls naar de fotochemische reacties gestuurd wordt, nu naar fluorescentie gaan. Dit wil zeggen dat bij een hogere waarde voor F'_M de energie die naar de fotochemische reacties gaat ook groter zal zijn (Steppe, 2011). Stressbomen, die twee hittegolven ondergaan, blijken na de hittegolf in de zomer dus geen verlies aan energie naar de fotochemische reacties te hebben. Opvallend is ook dat behandeling 8 de kleinste daling in F'_V/F'_M heeft in vergelijking met de andere behandelingen tijdens de hittegolf in de zomer (Tabel 4.7). Tijdens de hittegolf zullen bomen van behandeling 8 dus meer energie naar fotochemische reacties kunnen sturen dan bomen van behandeling 5, 6 en 7. Dit kan te wijten zijn aan een beter herstel van de schade aan PSII bij bomen van behandeling 8 vergeleken met bomen van behandeling 6. Echter, een groot deel van de energie voor de fotochemische reacties wordt gebruikt voor fotorespiratie. Er is namelijk een significante procentuele stijging in ϕ_{PSII}/ϕ_{CO_2} bij bomen van behandeling 8, terwijl dit niet het geval is bij bomen van behandeling 6. Dit wordt ook bevestigd door een sterkere daling in P_{bruto} van bomen van behandeling 8 vergeleken met bomen van behandeling 6 (Figuur 4.12). De reducties in P_{bruto} zijn echter voor

stressbomen met één hittegolf (lente of zomer) en twee hittegolven niet significant. Hierdoor lijkt het dat stressbomen reeds geacclimaseerd zijn aan hitte, ongeacht of ze reeds aan een hittegolf blootgesteld zijn. Mogelijks heeft Cd hetzelfde effect als hitte, waardoor er dus reeds een hogere [GSH] aanwezig bij stressbomen voordat ze aan een hittegolf worden blootgesteld. Volgens deze hypothese acclimatiseren stressbomen dus niet aan hitte omdat ze reeds geacclimatiseerd zijn door Cd. Controlebomen lijken wel te acclimatiseren aan hitte aangezien een significante daling in P_{bruto} van controlebomen blootgesteld aan één hittegolf (lente of zomer) werd waargenomen, terwijl controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven geen significante daling tonen. Tot slot valt nog op te merken dat de procentuele daling in F'_V/F'_M niet significant is bij stressbomen tijdens de hittegolf in de zomer, terwijl dit wel het geval is bij controlebomen (Tabel 4.7). De daling in F'_V/F'_M werd veroorzaakt door een reductie in F'_M en F'_0 . Dit toont aan dat Cd een positieve werking zou hebben op de hoeveelheid energie die naar de fotochemische reacties gestuurd wordt en/of de dissociatie van LHC en PSII.

Uit de resultaten van dit onderzoek kan besloten worden dat controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven het beter doen dan controlebomen blootgesteld aan één hittegolf. Dit werd verklaard door de mogelijks hogere [GSH] in controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven, als gevolg van activatie van het DREB1A gen door de hogere $[H_2O_2]$ veroorzaakt door de eerste hittegolf, die zo voor een betere bescherming tegen de tweede hittegolf zorgt. Controlebomen acclimatiseren zich dus aan hitte. Stressbomen daarentegen leken geen significante verschillen te tonen in P_{bruto} zowel bij stressbomen blootgesteld aan één hittegolf als bij stressbomen blootgesteld aan twee hittegolven. Stressbomen hebben zich mogelijks reeds geacclimatiseerd door de blootstelling aan Cd. Hierdoor hebben ze reeds een hogere [GSH], opnieuw als gevolg van de activatie van het DREB1A gen door de hogere $[H_2O_2]$ veroorzaakt door Cd, waardoor stressbomen beter beschermd zijn tegen hitte.

5.4 Beperkingen van het experiment

Per dag werden 20 van de 40 populieren opgemeten waardoor alle behandelingen gemeten werden over twee dagen. Wanneer behandelingen vergeleken worden, worden dus waarden vergeleken van verschillende dagen. De resultaten geven echter voornamelijk gemiddeldes weer waardoor de variatie op twee dagen verwaarloosbaar is. Indien toch een trend werd gevonden in functie van de tijd, werd deze eveneens bestudeerd.

In de masterthesis van Hanssens (2010) werden analoge experimenten uitgevoerd met één controleboom en één stressboom. Hanssens (2010) suggereerde om het experiment met een grotere populatie aan controlebomen en stressbomen uit te voeren om toch een duidelijk beeld te krijgen van hoe *Populus canadensis* reageert op het gecombineerde effect van hittestress en Cd-stress. Aangezien in deze experimenten vijf bomen per behandeling werden gebruikt kan de natuurlijke variabiliteit en de individuele respons beter worden uitgesloten.

De lichtintensiteit in de groeikamers is een stuk lager dan deze in buitenomstandigheden. Onder hoge lichtintensiteit in buitenomstandigheden kan de bladtemperatuur hoger worden dan de luchttemperatuur. Dit gebeurt wanneer de input aan zonne-energie groter is dan het

warmteverlies via transpiratie en convectie (Hamerlynck & Knapp, 1996). Het is dus mogelijk dat populieren in buitenomstandigheden meer invloed van de hittestress ondervinden aangezien populieren in groeikamers hun bladtemperatuur onder de luchttemperatuur kunnen houden door een lagere lichtintensiteit.

Een tweede groot verschil met de condities in veldomstandigheden is de duur van de blootstelling aan Cd. In realiteit zijn bomen die op vervuilde bodem groeien vaak reeds jaren blootgesteld aan Cd. In het experiment werd ongeveer 60 dagen voor het experiment de potgrond gespiked. In deze experimenten wordt dus enkel de korte termijn respons van *Populus canadensis* op Cd waargenomen. Om een duidelijk effect van Cd op *Populus canadensis* waar te nemen werd bovendien een veel hogere [Cd] aan de potgrond toegevoegd dan in de meeste veldcondities het geval is. In veldcondities schommelt de [Cd] tussen de 0 en 2 mg Cd/kg DW, terwijl de stressbomen in deze experimenten 75 tot 95 mg Cd/kg DW bevatten (Tabel 4.1) (Oomen et al., 2007). Bovendien verschilt deze potgrond met de bodems in buitenomstandigheden. De structuur en eigenschappen van de bodem zal een invloed hebben op de opname en accumulatie van Cd.

Deze experimenten werden uitgevoerd op éénjarige stekken. De leeftijd van *Populus canadensis* kan ook een invloed hebben op de respons op hittestress en Cd-stress. Wanneer de resultaten geïnterpreteerd worden, moet men dus altijd onthouden dat de resultaten voor volgroeide en/of oudere bomen sterk kunnen verschillen. Tot slot valt er op te merken dat in het begin van het experiment een ziekte werd vastgesteld bij een aantal populieren. Hoogst waarschijnlijk waren deze populieren aangetast door een virus, vermoedelijk het mozaïkvirus. De metingen werden echter altijd op gezonde blaadjes uitgevoerd en in de loop van het experiment verdwenen de symptomen bij alle populieren. Er werd dus verder ook geen rekening gehouden met de invloed van deze aantasting op de resultaten.

Desondanks bovenstaande beperkingen kunnen significante conclusies genomen worden in deze masterproef dankzij de geslaagde proefopzet en grote populatie.

6

Conclusies

In deze masterproef werd de respons van *Populus canadensis* op Cd, hitte en het gecombineerd effect van Cd en hitte onderzocht. In de masterthesis van Hanssens (2010) werden trends gevonden die erop wezen dat bomen blootgesteld aan zware metalen beter bestand zouden zijn tegen effecten van hoge temperaturen. De eerste doelstelling van deze masterproef was dan ook het bevestigen van dit vermoeden met behulp van meerdere controlebomen en stressbomen. De tweede doelstelling was het onderzoeken van acclimatisatie aan hitte.

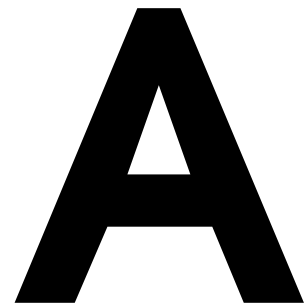
Eerst werd de respons van *Populus canadensis* op Cd afzonderlijk onderzocht om zo de verschillende oorzaken van de effecten van Cd en hitte te kunnen onderscheiden. Zoals reeds in vele studies werd aangetoond, heeft Cd een negatieve invloed op de fotosynthese. De lagere fotosynthese bij stressbomen in deze experimenten is het gevolg van schade aan het fotosynthetisch apparaat en niet door het sluiten van stomata. Hierdoor kunnen minder elektronen gebruikt worden voor de inbouw van CO₂. Anderzijds kan Cd inwerken op enzymen van de Calvin-Benson cyclus. Dit vertraagt de Calvin-Benson cyclus en bijgevolg ook het elektronentransport. Een vertraagd elektronentransport zorgt op zijn beurt voor een lagere fotosynthesesnelheid. Hieruit kan besloten worden dat stressbomen een minder sterke groei hebben dan controlebomen.

Hitte veroorzaakte eveneens een daling in fotosynthese en dit werd door verschillende

mechanismen verklaard. De daling in de CO_2/O_2 oplosbaarheid bij hoge temperaturen en de sterkere affiniteit van Rubisco voor O_2 zorgt voor een sterkere fotorespiratie. Deze sterkere fotorespiratie is af te leiden uit de sterke stijging van ϕ_{PSII} en q_P terwijl de P_{bruto} veel minder sterk stijgt. Bovendien stijgt de ratio $\phi_{\text{PSII}}/\phi_{\text{CO}_2}$ bij stressbomen significant sterker dan bij controlebomen in de lente. Dit kan mogelijks wijzen op een sterkere toename in fotorespiratie bij stressbomen in de lente. De stressbomen lijken bovendien beter bestand tegen hitte aangezien hun P_{bruto} minder sterk daalt dan de P_{bruto} bij controlebomen tijdens hitte. De P_{sat} bij stressbomen daalt echter toch sterk door een sterke toename in R . Uit de stijging van R gedurende de hittegolven kan besloten worden dat er meer energie werd aangemaakt voor onderhoud en eventuele schade. Ook werd een groter deel van de energie gedissipeerd onder de vorm van warmte tijdens de hittegolven, aangezien een stijging in NPQ werd waargenomen. Er werd echter geen schade aan PSII vastgesteld aangezien F_0 een daling vertoonde gedurende de hittegolven. Deze daling in F_0 kan mogelijks verklaard worden door de dissociatie van LHC en PSII, maar onderzoek omtrent dit fenomeen is beperkt, en verdere experimenten zijn nodig. Uit de al dan niet significante reducties van P_{bruto} kon besloten worden dat controlebomen blootgesteld aan twee hittegolven het beter doen dan controlebomen blootgesteld aan één hittegolf. Dit werd verklaard door de volgende hypothese: wanneer bomen een eerste hittegolf ondergaan, wordt er meer ROS gevormd, waaronder H_2O_2 . Deze hogere $[\text{H}_2\text{O}_2]$ kan schade aanbrengen maar functioneert ook als signaalmolecule waardoor het DREB1A gen wordt geactiveerd. Dit gen zorgt voor een grotere productie van antioxidantenzymen, zoals GSH die bescherming biedt tegen hitte. Controlebomen acclimatiseren zich dus aan hitte. Stressbomen daarentegen leken geen significante verschillen te tonen in P_{bruto} zowel bij stressbomen blootgesteld aan één hittegolf als bij stressbomen blootgesteld aan twee hittegolven. Stressbomen hebben zich mogelijks reeds geacclimatisiseerd door de blootstelling aan Cd. Hierdoor hebben ze reeds een hogere $[\text{GSH}]$, opnieuw als gevolg van de activatie van het DREB1A gen door hogere $[\text{H}_2\text{O}_2]$ veroorzaakt door Cd, waardoor stressbomen beter beschermd zijn tegen hitte. Opmerkelijk was ook de niet significante procentuele daling in F'_V/F'_M bij stressbomen tijdens de hittegolf in de zomer, terwijl deze wel significant was voor controlebomen. De daling in F'_V/F'_M werd veroorzaakt door een reductie in F'_M en F'_0 . Dit toont aan dat Cd een positieve werking zou hebben op de hoeveelheid energie die naar de fotochemische reacties gestuurd wordt en de dissociatie van LHC en PSII.

Het is belangrijk om er op te wijzen dat in deze masterthesis vaak de procentuele veranderingen onderzocht werden en de conclusies relatief geïnterpreteerd moeten worden. In absolute waarden doen controlebomen het steeds beter dan stressbomen.

De hypothese die de acclimatisatie aan hitte bij controlebomen en de acclimatisatie door Cd aan hitte bij stressbomen verklaart lijkt plausibel. In deze masterthesis werden de $[\text{H}_2\text{O}_2]$, de $[\text{GSH}]$ en de gen activatie echter niet onderzocht waardoor enkel veronderstellingen gemaakt konden worden. Verder onderzoek hieromtrent is noodzakelijk om deze hypothese te bevestigen. Ook de oorzaak van de daling in F'_0 dient verder onderzocht te worden om de onduidelijkheid hierover te elimineren.



Materiaal en methoden

Spiken potgrond met Cd

1. Homogeniseren van de potgrond door deze te verscheppen.
2. Vervolgens werd er zes keer 1L verse potgrond afgewogen in een maatcilinder en telkens werd het gewicht bepaald waaruit dan het gemiddelde gewicht van 1L verse potgrond werd afgeleid.
3. Aan elke pot (zowel voor de controleplanten als de planten die worden blootgesteld aan Cd) dient drie keer 1L verse potgrond toegevoegd te worden.
4. Voor het spiken werd gebruik gemaakt van een CdSO_4 -oplossing die 1000 mg Cd^{2+} per liter bevat.
5. Aan 1L verse potgrond werd 50 mL van deze oplossing toegevoegd met een pipet nadat de potgrond tot een dunne laag was uitgespreid in een recipiënt. Dit werd gedaan om het spiken zo homogeen mogelijk uit te voeren. Vervolgens werd deze potgrond goed omgeroerd. Deze stap werd 60 keer herhaald teneinde 20 potten te vullen met telkens 3L gespikede potgrond.
6. Vervolgens werden de potten afgedekt met cellofaan om tot evenwicht te komen alvorens

de stekken te planten.

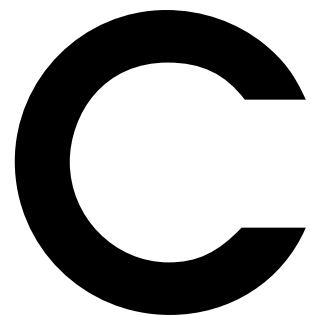
B

Materiaal en methoden

Destructieprotocol bladstalen

1. Bladeren drie dagen in de oven laten drogen op 60-75°C.
2. Ovendroge bladeren fijnmalen met mortier.
3. Maximum 0.5 g afwegen en in buisje (50 mL centrifuge tubes with screw caps) steken.
4. 3.5 mL HNO₃ toevoegen.
5. 3.5 mL H₂O₂ toevoegen.
6. Laten overnachten.
7. Dopjes terugschroeven.
8. Buisjes in microgolf plaatsen en 'Melk open' programma starten:
Op 600W wordt het volgende uitgevoerd:
In 10 minuten naar 55°C en 10 minuten op 55°C blijven,
In 10 minuten naar 75°C en 10 minuten op 75°C blijven,
In 10 minuten naar 100°C en 35 minuten op 100°C blijven.
9. Erlenmeyer en trechter spoelen met 1% HNO₃.

10. Filters opzetten.
11. Stalen filtreren en buisjes 3x spoelen (2x met 1% HNO₃ en 1x met milli Q).
12. Doorspoelen met 1% HNO₃ en aanlengen met milli Q tot 50mL.
13. Stalen in ICP-OES.



Materiaal en methoden

Destructieprotocol bodemstalen

C.1 Bodemstalen gespiked met Cd

1. Bodemstalen drie dagen in de oven laten drogen op 60-75°C.
2. 1 g bodemstaal afwegen in erlenmeyer van 100 mL.
3. Koningswater toevoegen:
 - 2.5 mL H₂O
 - 2.5 mL HNO₃ (65%)
 - 7.5 mL HCl (37%)
4. Twee uur op kookplaat op 100°C en 50W.
5. Laten afkoelen.
6. Stalen filtreren en erlenmeyers 3x spoelen (2x met 1% HNO₃ en 1x met H₂O).
7. Stalen 20 maal verdunnen.
8. Stalen in ICP-OES.

C.2 Bodemstalen zonder Cd

1. Bodemstalen drie dagen in de oven laten drogen op 60-75°C.
2. Vijf bodemstalen mengen.
3. 1 g bodemstaal afwegen uit mengsel in kroesje.
4. Kroesjes in moffeloven plaatsen en volgend programma starten:
In 0.5 uur naar 250°C en 1 uur op 250°C blijven,
In 3 uur naar 550°C en 2 uur op 550°C blijven.
5. Kroesjes laten afkoelen in een excicator.
6. Stalen wegen.

Bibliografie

- Armond, P., Björkman, O., & Staehelin, A. (1980). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes a manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 601, 433–422.
- Baker, N. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113.
- Carmo-Silva, A. & Salvucci, M. (2011). The activity of rubisco's molecular chaperone, Rubisco activase, in leaf extracts. *Photosynth Res*, 108, 143–155.
- Chao, Y.-Y., Hsu, Y., & Kao, C. (2009). Involvement of glutathione in heat shock- and hydrogen peroxide-induced cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil*, 318, 37–45.
- Chen, Z., Silva, H., & Klessig, R. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262, 1883–1886.
- Ciais, P., Reichstein, M., & Viovy, N. (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437, 529–533.
- Clemens, S., Palmgren, M., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science*, 7.
- Conway, T. & Tans, P. (2012). www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/. NOAA/ESRL.
- Das, P., Samantaray, S., & Rout, G. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98, 29–36.
- Ducruet, J. (1999). Relation between the heat-induced increase of F₀ fluorescence and a shift in the electronic equilibrium at the acceptor side of photosystem 2. *PHOTOSYNTHETICA*, 37, 335–338.
- Gaudet, M., Pietrini, F., Beritognolo, I., Iori, V., Zacchini, M., Massacci, A., Mugnozza, G., & Sabatti, M. (2011). Intraspecific variation of physiological and molecular response to cadmium stress in *Populus nigra* L. *Tree Physiology*, 31, 1309–1318.

- Gogorcena, Y., Larbi, A., Andaluz, S., Carpena, R., Abadía, A., & Abadia, J. (2011). Effects of cadmium on cork oak (*Quercus suber* L.) plants grown in hydroponics. *Tree Physiology*, *31*, 1401–1412.
- Gu, J., Qi, L., Jiang, W., & Liu, D. (2007). Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars. *ACTA BIOLOGICA CRACOVENSIS SERIES BOTANICA*, *49*, 7–14.
- Guo, Y., Zhou, H., & Zhang, L. (2006). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperatures stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*, *108*, 260–267.
- Gutiérrez, D., Gutiérrez, E., Pérez, P., Morcuende, R., Verdejo, A., & Martínez-Carrasco, R. (2009). Acclimation to future atmospheric CO₂ levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiologia Plantarum*, *137*, 86–100.
- Haldimann, P. & Feller, U. (2005). Growth at moderately elevated temperature alters the physiological response of the photosynthetic apparatus to heat stress in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment*, *28*, 302–317.
- Hamerlynck, E. & Knapp, A. (1996). Photosynthetic and stomatal responses to high temperature and light in two oaks at the western limit of their range. *Tree Physiology*, *16*, 557–565.
- Hanssens, J. (2010). Invloed van bodemvervuiling (metaal toxiciteit) op de ecofysiologie van populier tijdens gesimuleerde hittegolven. Master's thesis, Universiteit Gent.
- Hasan, A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., & Ahmad, A. (2009). Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology*, *30*(2), 165–174.
- He, J., Qin, J., Long, L., Ma, Y., Li, H., Li, K., Jiang, X., Liu, T., Polle, A., Liang, Z., & Luo, Z. (2011). Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. *Physiologia Plantarum*, *143*, 50–63.
- Hsu, Y. & Kao, C. (2007). Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Soil*, *298*, 231–241.
- Hung, S., YU, C., & Lin, C. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, *46*, 1–10.
- Hüve, K., Bichele, I., Ivanova, H., Keerberg, O., Pärnik, T., Rasulov, B. Tobias, M., & Niinemets, U. (2012). Temperature responses of dark respiration in relation to leaf sugar concentration. *Physiologia Plantarum*, *144*, 320–334.
- IPCC (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

- IPCC (2012). Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Ivanova, H., Keerberg, H., Pärnik, T., & Keerberg, O. (2008). Components of CO₂ exchange in leaves of C₃ species with different ability of starch accumulation. *Photosynthetica*, 46, 84–90.
- Kohan, E., Bagherieh, N., & Mohammad, B. (2011). DRE-binding transcription factor (DREB1A) as a master regulator induced a broad range of abiotic stress tolerance in plant. *African Journal of Biotechnology*, 10, 15100–15108.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology*. Springer.
- LI-COR (2004). *Using the LI-6400/LI-6400XT Portable Photosynthesis System*. (sixth edition ed.). Lincoln, Nebraska: LI-COR Biosciences, Inc.
- Lijnen, L., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2007). Invloed van metaalstress op de cellulaire redoxbalans van *Arabidopsis thaliana*. Masterthesis, Universiteit Hasselt.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., & White, P. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 62, 21–37.
- Maxwell, K. & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659–668.
- Mendoza-Cozatl, D., Butko, E., Springer, F., Torpey, J., Komives, E., Kehr, J., & Schroeder, J. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal*, 54, 249–259.
- Nikolic, N., Kojic, D., Pilipovic, A., Pajevic, S., Krstic, B., Borisev, M., & Orlovic, S. (2008). Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA SERIES BOTANICA*, 50, 95–103.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., & Driscoll, S. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.*, 89, 841–850.
- Oberhuber, W. & Edwards, G. (1993). Temperature dependence of the linkage of quantum yield of photosystem II to CO₂ fixation in C₃ and C₄ plants. *Plant Physiol.*, 101, 507–512.
- Oomen, A., Janssen, P., Eijkeren, J., Bakker, M., & Baars, A. (2007). Cadmium in de kempen.
- Papageorgiou, G. & Govindjee (2004). *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer.
- Pietrini, F., Zacchini, M., Iori, V., Pietrosanti, L., Ferretti, M., & Massacci, A. (2009). Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. *Plant Biology*, 12, 355–363.

- Sage, R. & Kubien, D. (2007). The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 30, 1086–1106.
- Salvucci, M. & Crafts-Brandner, S. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 120, 179–186.
- Sayed, O. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *PHOTOSYNTHETICA*, 321–330.
- Schulze, E.-D., Beck, E., & Müller-Hohenstein, K. (2005). *Plant Ecology*. Springer.
- Sharkey, T. (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment*, 28, 269–277.
- Steppe, K. (2011). *Ecofysiologie*.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35, 259–270.
- Urban, O., Sprtova, M., Kosvancova, M., Tomaskova, I., Lichtenthaler, H., & Marek, M. (2008). Comparison of photosynthetic induction and transient limitations during the induction phase in young and mature leaves from three poplar clones. *Tree Physiology*, 28, 1189–1197.
- Van Kooten, O. & Snel, J. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25, 149.
- Verheyen, K. (2011). *Ecotechnique and Nature Construction*.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199–223.
- Yuan, Y., Qian, H., Yu, Y., Lian, F., & Tang, D. (2011). Thermotolerance and antioxidant response induced by heat acclimation in *Freesia* seedlings. *Acta Physiol Plant*, 33, 1001–1009.
- Zhu, X.-G., Long, S., & Ort, D. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 153–159.