

## AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY ŻYCIORYS WNIOSKODAWCY ORAZ OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE  
ZGLASZANE JAKO PRZEDMIOT POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO, A TAKŻE  
POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

### I. Dane osobowe

1. Imię i nazwisko:

Alina Wiszniewska (nazwisko panieńskie Czura)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne– z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:

**Tytuł magistra inżyniera biotechnologii, specjalność biotechnologia stosowana**

**2004** - Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie), czerwiec 2004: obrona pracy magisterskiej pt. „Badania wybranych tkanek stokłosa *Bromus carinatus* metodą RAPD”; promotor: prof. dr hab. Andrzej Joachimiak, recenzent: prof. dr hab. inż. Maria Klein.

**Stopień doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa**

**2008** - Wydział Ogródniczy, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie  
Rozprawa doktorska pt. „Kultury protoplastów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)”, promotor: dr hab. inż. Anna Pindel; recenzenci: prof. dr hab. Adela Adamus, prof. dr hab. Franciszek Dubert, wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

październik **2004** – grudzień**2008**: doktorantka, Katedra Botaniki, Wydział Ogródniczy, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

wrzesień 2008 – grudzień2008: starszy technik, Biuro Koordynatora ds. Projektów Międzynarodowych w Ramach UE, Wydział Inżynierii Środowiska i Geodezji, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

grudzień 2008 – wrzesień 2010: asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra Botaniki (później Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin), Wydział Ogrodniczy, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

od października 2010 adiunkt naukowo-dydaktyczny, Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii (poprzednia nazwa: Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin), Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

W latach 2010, 2013/14 oraz 2015/16 przebywałam na urloпах macierzyńskich po urodzeniu trojga dzieci (łącznie 2 lata).

## **II. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2018 r. poz. 1789)**

### **A) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.**

Jako osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2018 r. poz. 1789), wskazuję jednotematyczny cykl czterech publikacji, zatytułowany:

**„Indukowanie tolerancji na metale ciężkie w kulturze *in vitro*  
wawrzynka jaśminowego (*Daphne jasminea*)”**

### **B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa.**

Kopie prac zostały zebrane w załączniku 3. Opis mojego udziału, w tym procentowego, w wykonaniu poniższych prac zawiera załącznik 4, p. I B. Oświadczenia współautorów publikacji znajdują się w załączniku 5.

**P1. Wiszniewska A.**, Hanus-Fajerska E., Smoleń S., Muszyńska E. 2015. *In vitro* selection for lead tolerance in shoot culture of *Daphne* species. *Acta Scientiarum Polonorum – Hortorum Cultus*, 14(1): 129-142

**IF<sub>2015</sub>0,583, 15 pkt** MNiSW, autor korespondencyjny

**P2. Wiszniewska A.**, Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Smoleń S., Dziurka M., Dziurka K. 2017. Organic amendments enhance Pb tolerance and accumulation during micropropagation of *Daphne jasminea*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 2421-2432 DOI: 10.1007/s11356-016-7977-2

**IF<sub>2017</sub>2,800, 30 pkt** MNiSW, autor korespondencyjny

**P3. Wiszniewska A.**, Hanus-Fajerska E., Muszyńska E., Smoleń S. 2017. Comparative assessment of response to cadmium in heavy metal-tolerant shrubs cultured *in vitro*. *Water, Air & Soil Pollution*, 228:304 DOI: 10.1007/s11270-017-3488-0

**IF<sub>2017</sub>1,769, 25 pkt** MNiSW, autor korespondencyjny

**P4. Wiszniewska A.**, Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Dziurka K., Dziurka M. 2018. Evaluation of the protective role of exogenous growth regulators against Ni toxicity in woody shrub *Daphne jasminea*. *Planta* 248(6): 1365-1381 <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2979-6>

**IF<sub>2017</sub>3,249, 40 pkt** MNiSW, autor korespondencyjny

Sumaryczny IF oraz sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, o którym mowa a art. 16 ust. 2 ustawy, wynoszą:

**IF8,401, 110pkt** MNiSW

### **C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

#### **Wprowadzenie teoretyczne**

Zawartość pierwiastków śladowych w środowisku znacząco wzrosła w wyniku postępującej industrializacji, zwiększenia liczebności populacji ludzkiej i związanej z tym intensyfikacji działalności rolniczej. Poważne zagrożenie dla funkcjonowania ekosystemów i zdrowia człowieka stanowią pierwiastki należące do metali ciężkich, zwykle o gęstości przekraczającej  $5 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$ . Obecnie są to najbardziej rozpowszechnione zanieczyszczenia nieorganiczne. Niektóre z nich, m.in. Cd, Pb i Hg to składniki balastowe, nie pełniące żadnej biologicznej funkcji w organizmach żywych. Inne natomiast, m.in. Ni, Zn i Cu, należą do mikroelementów i w śladowych ilościach warunkują prawidłowe procesy metaboliczne w komórkach (Nagajyoti et al. 2010). Podwyższenie zawartości metali ciężkich w glebie, wodzie czy powietrzu skutkuje ich wzmożoną akumulacją w tkankach organizmów żywych. Pierwiastki te są trwałe i w zdecydowanej większości nie ulegają biodegradacji, więc krążą w ekosystemach za pośrednictwem łańcuchów pokarmowych, kumulując się i wywierając efekt toksyczny na mikroflorę, zbiorowiska roślin i populacje zwierząt (Singh et al. 2016).

Rośliny rosnące w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi nie mają możliwości ucieczki z zanieczyszczonego terenu. Ich organizm funkcjonuje wtedy w stanie stresu metalicznego, którego specyficzne objawy i konsekwencje mogą być różne dla różnych metali. Niezależnie jednak od rodzaju toksycznego pierwiastka, podobnie jak w przypadku większości stresów abiotycznych, istotnymi objawami stresu metalicznego jest zahamowanie wzrostu i obniżenie zawartości biomasy. Zaburzenia dotyczą wszystkie podstawowe procesy życiowe na poziomie organów, tkanek i komórek, takie jak fotosynteza, oddychanie i inne szlaki metaboliczne, wzrost komórek, regulacja stosunków wodnych, metabolizm azotu, równowaga mineralna i hormonalna (Michalak 2006). Biorąc pod uwagę naturę chemiczną i fizyczną metali ciężkich, ich toksyczne działanie wynika z wywołania nadprodukcji reaktywnych form tlenu (ROS *reactive oxygen species*), zmian konformacji białek na skutek blokowania grup funkcyjnych i struktury kwasów nukleinowych oraz wypierania i zastępowania jonów

pierwiastków niezbędnych stanowiących kofaktory enzymów (Michalak 2006; Singh et al. 2016; Hasan et al. 2017). Stres oksydacyjny jest uznawany za jeden z najwcześniejszych symptomów toksyczności metali ciężkich u roślin i u gatunków wrażliwych obserwuje się wtedy wzmożoną aktywność antyoksydacyjną. Geny kodujące enzymy szlaków antyoksydacyjnych stanowią największą grupę genów ulegających wzmożonej ekspresji pod wpływem działania metali ciężkich (Ovečka i Takač 2014; Singh et al. 2016). Podczas krótkiej ekspozycji na toksyczny pierwiastek ta pierwsza linia obrony umożliwia przetrwanie i dalszy wzrost organizmu, jednak przy dłuższej trwającej ekspozycji często okazuje się niewystarczająca (Ovečka i Takač 2014). Niektóre gatunki roślin rozwinęły mechanizmy warunkujące tolerancję na metale ciężkie, czyli zdolność do niezaburzonego wzrostu i rozwoju w ciągłej obecności ich toksycznego poziomu. Może być to tolerancja konstytutywna, obecna u przedstawicieli danego gatunku przez całe ich życie, niezależnie od tego, czy są poddane działaniu metalu ciężkiego, czy nie, lub też indukowana, ujawniająca się dopiero pod wpływem stresu. Podstawowe mechanizmy warunkujące tolerancję roślin na stres metaliczny obejmują 1) unikanie pobierania toksycznych jonów poprzez ich immobilizację w ryzosferze, 2) chelatowanie jonów prowadzące do ich unieczynnienia w przestrzeniach międzykomórkowych, 3) związanie w apoplacie, 4) detoksyfikację jonów metali w kompartmentach komórkowych (Sharma et al. 2016). Rośliny wykształciły różne strategie związane z pobieraniem metali ciężkich ze środowiska i ich dystrybucją w organizmie. W 1981 roku Baker zaproponował podział na gatunki wykluczające, które unikają pobierania jonów lub w przeważającej większości akumulują je w korzeniach, gatunki wskaźnikowe, u których część pobranych jonów metali ciężkich jest transportowana do części nadziemnej, a ich zawartość jest podobna w korzeniach i w pędzie, oraz gatunki akumulujące i hiperakumulujące, u których metale ciężkie deponowane są głównie w części nadziemnej. Z praktycznego punktu widzenia znajomość strategii pobierania i dystrybucji metali ciężkich pozwala wykorzystać konkretne gatunki w różnych technikach fitoremediacji i ocenie stanu zanieczyszczenia środowiska.

Tolerancja względem podwyższonych stężeń metali ciężkich wśród roślin uprawnych jest cechą rzadką, co prawdopodobnie wynika z ograniczenia zmienności podczas długotrwałej selekcji pod kątem pożądanых cech użytkowych. Gatunki i odmiany o walorach ozdobnych, których organy nie są spożywane ani w inny sposób przetwarzane

w celach konsumpcyjnych, można wykorzystać do nasadzeń na obszarach o podwyższonym stopniu zanieczyszczenia. Warunkiem jest ich tolerancja na metale ciężkie, umożliwiającą przetrwanie i wzrost w niekorzystnych warunkach. Cennym materiałem są metalo-tolerancyjne drzewa i krzewy, ze względu na trwałość pędów, duży przyrost biomasy i rozległy system korzeniowy (Radojčić-Radovniković et al. 2017). Z powodu długiego cyklu życiowego i słabo poznanymi mechanizmami reakcji na stres metaliczny u roślin drzewiastych, selekcja gatunków cechujących się ciekawymi cechami ozdobnymi i podwyższoną tolerancją na zanieczyszczenie metalami ciężkimi jest utrudniona (Luo et al. 2016).

Stosując nowoczesne techniki ogrodnictwa i biotechnologii można szybciej i wydajniej indukować tolerancję roślin na stres, co zwiększa możliwości ich dostosowania do zmieniających się warunków środowiska (Wiszniewska et al. 2016; Koźmińska et al. 2018). Jedną z metod indukcji tolerancji na stres metaliczny jest selekcja w kulturze *in vitro* na pożywkach zawierających czynnik selekcyjny, czyli podwyższone stężenie toksycznych jonów. Selekcja może być prowadzona na różnym poziomie organizacji, od pojedynczych komórek i protoplastów, poprzez agregaty komórek tkanki przyrannej (kalusa), do izolowanych organów i kompletnych mikroroślin. Stosując długi czas trwania selekcji możliwe jest wygenerowanie nowej puli zmienności. Rośliny o zmienionych cechach w świetle prawnych regulacji nie są uznawane za organizmy genetycznie modyfikowane, dzięki czemu nie ma ograniczeń ich wykorzystania (Ashrafzadeh and Leung 2015). Pod wpływem długotrwałej presji selekcyjnej intensyfikacji ulegają procesy chroniące rośliny przed szkodliwym wpływem metalu ciężkiego, głównie aktywność antyoksydacyjna. Kultura *in vitro* wysoko uorganizowanych organów lub całych mikroroślin pozwala także na przybliżenie strategii akumulacji toksycznych jonów i ich dystrybucji u badanego gatunku. Ponadto, namnożenie dużej liczby roślin/pędów w stosunkowo krótkim czasie umożliwia prowadzenie badań nad mechanizmami tolerancji i możliwością podwyższenia jej stopnia. Jednym ze sposobów stosowanych w celu poprawy warunków wzrostu roślin podczas ekspozycji na metale ciężkie, a także modulowania ich biodostępności, jest suplementacja podłoża związkami organicznymi o charakterze biostymulatorów (Wiszniewska et al. 2016). Należą tu zarówno konkretne substancje, takie jak fitohormony, związki fenolowe czy kwasy organiczne, jak również wieloskładnikowe ekstrakty pochodzenia roślinnego i eksudaty organizmów jednokomórkowych (glonów,

mikroflory glebowej). Substancje te dodatkowo wpływają na stan fizjologiczny roślin poddanych stresowi metalicznemu, chelatują jony metali zwiększając lub ograniczając ich pobieranie z gleby, dzięki czemu mogą zastępować syntetyczne chelatory w tzw. wspomaganej fitoremediacji (*assisted phytoremediation*) (Wiszniewska et al. 2016). Wzbogacanie pożywki do kultury *in vitro* dodatkami organicznymi ma długą tradycję, sięgającą początków tej techniki. Nie ma jednak zbyt licznych doniesień na temat wzbogacania pożywki podczas selekcji roślin pod kątem tolerancji na metale ciężkie i efekty takiego postępowania są jeszcze słabo poznane.

Warunki wzrostu rośliny w kulturze *in vitro* różnią się od warunków naturalnych, zatem stosując taki system przyjmuje się pewne ograniczenia w późniejszym wnioskowaniu, wynikające ze wzrostu organów na syntetycznym podłożu o dużej dostępności związków budulcowych, stymulacji fitohormonami, ograniczenia transpiracji i często także fotosyntezy. Ponadto w pożywce związki metali ciężkich mogą ulegać przemianom wpływającym na ich biodostępność, różniącą się od tej spotykanej w środowisku. Pomimo to, kultura *in vitro* stanowi praktyczny układ modelowy i jest wykorzystywana w selekcji roślin tolerancyjnych względem metali ciężkich (Wulff-Schuch et al. 2010; Bonet et al. 2016; Najeeb et al. 2017; Muszyńska et al. 2018a,b; Fourati et al. 2019). Uzyskanie w kulturze *in vitro* tolerancyjnych na metale ciężkie linii gatunków drzewiastych stwarza możliwość szybkiego namnożenia wartościowego materiału do nasadzeń na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi oraz pozwala lepiej poznać specyfikę biologii stresu metalicznego w tej grupie roślin.

### **Cel badań i szczegółowe cele badawcze**

Celem niniejszych badań było opracowanie warunków selekcji pozwalającej uzyskać w kulturze pędowej linii wawrzyńka jaśminowego (*Daphne jasminea* Sibthorp & Smith, Thymelaeaceae) o podwyższonej tolerancji na kadm, nikiel i ołów oraz poznanie mechanizmów reakcji morfogenetycznych, biochemicznych i fizjologicznych towarzyszących chronicznej i krótkotrwałej ekspozycji pędów tego gatunku na badane metale ciężkie.

Wawrzynek jaśminowy jest zimozielonym, niskim krzewem o płożącym typie wzrostu, który zasiedla wapienne i skaliste podłoża greckiej części wybrzeża Morza Śródziemnego. Podobnie jak inne wawrzynki, jest uprawianym jako roślina ozdobna. Zimotrwałe liście, kompaktowy pokrój, a przede wszystkim niezwykle przyjemny zapach towarzyszący obfitemu kwitnieniu, decydują o walorach dekoracyjnych tego krzewu. Wśród przedstawicieli rodzaju *Daphne* występują gatunki przystosowane do wzrostu na glebach zasobnych w metale ciężkie, szczególnie serpentynitowych, zawierających podwyższone zawartości niklu, chromu i kobaltu (Ater et al. 2000; Bani et al. 2013; Muhammad et al. 2013). Do tych gatunków należą *Daphne gnidium*, *D. oleoides* i *D. mucronata*, które tolerują podwyższone stężenia metali, wykazując także cechy adaptacyjne względem stresu suszy i niedoboru składników pokarmowych. Są to przy tym gatunki wykluczające (*excluders*), u których stwierdza się ograniczoną akumulację metali ciężkich (Ater et al. 2000). *Daphne gnidium* zasiedla zanieczyszczone metalami tereny pogórnice, a dzięki swemu pokrojowi i stosunkowo obfitej biomase jest polecany w celu rewitalizacji zdegradowanych obszarów (Anawar et al. 2011). Dane pochodzące z cytowanych powyżej prac wskazują na możliwość adaptacji wawrzynków do wzrostu w podłożu o podwyższonej zawartości metali ciężkich, jednak ze względu na swój fitosocjologiczny charakter doniesienia te nie tłumaczą fizjologiczno-biochemicznych uwarunkowań tolerancji. Jest to istotna luka poznawcza, mogąca wynikać z braku odpowiedniego systemu uprawy i modelu do prowadzenia badań w warunkach laboratoryjnych/szklarniowych, umożliwiających szersze spektrum analiz niż jest to możliwe przy użyciu materiału roślinnego pochodzącego jedynie z naturalnych stanowisk.

We współpracy z dr Andrew Risemanem z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu British Columbia w Vancouver (Kanada) pozyskano klony różnych gatunków wawrzynków. Dołączyłam do zespołu i rozpoczęłam ocenę potencjału regeneracyjnego oraz optymalizację warunków mikrorozmnażania i aklimatyzacji. W kulturze pędowej szczególnie dobrze mnożyły się m.in. wawrzynek jaśminowy (*D. jasminea*), kaukaski (*D. caucasica*) i tangucki (*D. tangutica*).

Biorąc powyższe pod uwagę przyjął, że wysokie zdolności regeneracyjne wawrzynków w kulturach pędowych można wykorzystać do stworzenia programu selekcji służącego uzyskaniu linii tolerancyjnych na metale ciężkie i namnożenia



odpowiedniej ilości materiału do badań skierowanych na poznanie mechanizmów reakcji morfogenetycznych, biochemicznych i fizjologicznych związanych z ekspozycją na toksyczne pierwiastki. Uzyskanie proliferujących pędów tolerancyjnych na metale ciężkie umożliwi intensyfikację badań mechanizmów reakcji na stres metaliczny u tych roślin drzewiastych. Z kolei zregenerowane i zaaklimatyzowane do warunków *ex vitro* rośliny pochodzące z określonych linii mogłyby znaleźć zastosowanie w nasadzeniach na potrzeby zieleni miejskiej, szczególnie w miejscach narażonych na zanieczyszczenie metalami ciężkimi, takich jak okolice ciągów komunikacyjnych, zakładów przemysłowych, tereny zdegradowane wymagające rewitalizacji, czy ogrody miejskie.

Realizując założony cel badań wyróżniłam następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Określenie wpływu różnych stężeń aplikowanych metali ciężkich: ołowiu, kadmu oraz niklu na wzrost, rozwój i potencjał regeneracyjny wawrzynka w kulturze pędowej oraz wybór stężeń subletalnych, pozwalających na utrzymanie proliferujących kultur w obecności czynnika selekcyjnego.
2. Ocena poziomu akumulacji jonów metali ciężkich w mnożonych pędach i zregenerowanych mikroroślinach w celu określenia strategii ich akumulacji i dystrybucji w organach i przydatności *D. jasminea* w fitoremediacji.
3. Porównanie reakcji morfogenetycznych, biochemicznych i fizjologicznych wawrzynka jaśminowego z reakcjami charakterystycznymi dla roślin tolerancyjnych na metale ciężkie.
4. Opracowanie modelowego układu doświadczalnego opartego na kulturze organów wawrzynka jaśminowego w celu prowadzenia badań nad mechanizmami reakcji tego gatunku na stres metaliczny i indukowania tolerancji na ten stres:
  - 4a) ocena możliwości przeciwdziałania toksycznemu wpływowi metali ciężkich poprzez wykorzystanie dodatków organicznych i egzogennych fitohormonów;
  - 4b) określenie roli długotrwałej ekspozycji na jony  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Ni^{2+}$  w indukcji tolerancji i wyodrębnienie czynników ją determinujących.

## Opis uzyskanych wyników

### Realizacja celu szczegółowego nr 1

#### **Ocena wzrostu, rozwoju i potencjału regeneracyjnego wawrzynka w kulturze pędowej na pożywkach zawierających sole metali ciężkich: ołowiu, kadmu i niklu w celu wyboru subletalnych stężeń metali umożliwiającą długotrwałą selekcję *in vitro***

Wyniki badań przedstawiono w pracach eksperymentalnych **P1, P3 i P4**.

Selekcję pod kątem tolerancji na metale ciężkie zainicjowano w kulturach pędów wawrzynka jaśminowego na pożywkę podstawową, której skład uprzednio zoptymalizowano (Hanus-Fajerska et al. 2012). Do tej pożywki dodano wybrane sole metali ciężkich w trzech stężeniach. W pierwszych doświadczeniach selekcję w kierunku tolerancji na **olów** na pożywkach zawierających odpowiednio 0,1; 0,5 i 1,0 mMPb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (azotanu (II) ołowiu) prowadzono w kulturach pędów dwóch gatunków: wawrzynka jaśminowego (*D. jasminea*) i wawrzynka tanguckiego (*D. tangutica*) (**praca P1**). Eksplantatami były wierzchołkowe części pędów. W trakcie ośmiu tygodni ekspozycji na ołów materiał roślinny pasażowano po 4 tygodniach trwania kultury, bez cięcia i rozdzielania mnożonych pędów.

Reakcję materiału na działanie różnych stężeń ołowiu oceniono na podstawie parametrów wzrostu, zawartości barwników, makro- i mikroelementów oraz bioakumulacji ołowiu. Stwierdzono, że obecność azotanu ołowiu w aplikowanych stężeniach nie obniża liczby formowanych nowych pędów przybyszowych u wawrzynka jaśminowego, natomiast powoduje ich skrócenie i wzrost suchej masy. Wyliczony na podstawie zawartości biomasy współczynnik tolerancji wzrostu (GTI) obniżył się pod wpływem ekspozycji na ołów. Spadek ten był zróżnicowany w zależności od zastosowanej dawki soli metalu – najniższy stwierdzono w pędach rosnących w obecności najwyższego stężenia, czyli 1,0 mMPb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Zaobserwowano także, że pod wpływem ołowiu później formują się korzenie przybyszowe. Pobieranie ołowiu z pożywki przez pędy wawrzynka jaśminowego było ograniczone, co zostało dokładniej omówione poniżej, w punkcie drugim tego rozdziału. W pędach traktowanych ołowiem nastąpił spadek zawartości większości mikroelementów i niektórych makroelementów, szczególnie P i S, lecz z drugiej strony został utrzymany

poziom Ca i Mg. Zawartość chlorofili i karotenoidów nie odbiegała od zawartości stwierdzonej w pędach kontrolnych.

Na podstawie wyników przedstawionych w **pracy P1** stwierdzono, że ekspozycja na testowane stężenia ołowiu wywołała umiarkowany efekt fitotoksyczny w pędach wawrzynka jaśminowego. Pomimo pewnych zaburzeń, szczególnie w składzie pierwiastkowym, zdolności regeneracyjne *in vitro* nie zostały znacząco upośledzone i pędy nadal namnażały się wydajnie. Ograniczona toksyczność ołowiu w badanym układzie doświadczalnym mogła wynikać z niskiej mobilności jonów tego pierwiastka, lub wiązania się jonów  $Pb^{2+}$  ze składnikami pożywki, co zmniejszało ich bezpośrednie szkodliwe oddziaływanie na pędy. Zaproponowany system umożliwia prowadzenie długotrwałej selekcji w obecności kationów ołowiu.

Część pędów mnożonych w obecności jonów ołowiu została przeznaczona do długotrwałej selekcji na pożywce z 1,0 mMPb  $(NO_3)_2$ , a część posłużyła do oceny potencjału regeneracyjnego kultur *D. jasminea* w trakcie ekspozycji na **kadm (praca P3)**. Przed wyłożeniem eksplantatów na pożywkę zawierającą 0,5, 2,5 lub 5,0  $\mu M$   $CdCl_2$  (chlorku kadmu), pędy namnożono na pożywce nie zawierającej jonów metali ciężkich. Wydłużono czas wstępnej selekcji do 16 tygodni, nadal pasażując materiał roślinny co 4 tygodnie. Pędów nie rozdzielano i nie cięto podczas pasaży, tylko w całości przenoszono na świeżą pożywkę, starając się nie uszkodzić rozwijających się korzeni przybyszowych.

Ocenie poddano parametry wzrostu mnożonych mikroroślin, zawartość barwników oraz makro- i mikroskładników oraz akumulację kadmu. Stwierdzono, że 16-tygodniowa ekspozycja na badane stężenia chlorku kadmu spowodowała zahamowanie formowania się nowych pędów, a współczynnik mikrorozmnażania spadł z 9,2 w kontroli do 6,2-4,4 na pożywkach z kadmem. Jedynie najniższe testowane stężenie nie miało wpływu na przyrost biomasy i długość pędów, w przypadku pozostałych stężeń nastąpił spadek biomasy i współczynnika tolerancji wzrostu, a najwyższa dawka kadmu skutkowałą skróceniem pędów. W odróżnieniu od traktowania ołowiem, pod wpływem kadmu spadła zawartość barwników fotosyntetycznych. Wydłużony do 16 tygodni czas ekspozycji pozwolił na regenerację korzeni przybyszowych u podstawy eksplantatów w każdym wariantcie pożywki, jednak w obecności  $Cd^{2+}$  korzenie były krótsze, a wraz ze wzrastającym stężeniem metalu malała liczba korzeni bocznych. Tym niemniej,

współczynnik tolerancji wyliczony na podstawie biomasy wzrósł prawie dwukrotnie w przypadku korzeni traktowanych kadmem.

Na podstawie wyników zaprezentowanych w **pracy P3** stwierdzono, że system korzeniowy wawrzynka jaśminowego, powstały na drodze organogenezy przybyszowej w kulturze *in vitro*, cechuje wyższa niż pędów tolerancja względem jonów  $\text{Cd}^{2+}$ . Reakcja tolerancji na poziomie korzeni ujawniła się pomimo zwiększonej akumulacji tego pierwiastka (aspekt akumulacji Cd został omówiony dokładniej w punkcie drugim tego rozdziału). Do długotrwałej selekcji wybrano początkowo dwa stężenia, to jest 2,5 i 5,0  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Po serii trzech pasażów pędy mnożone na pożywce z 2,5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wyłożono na pożywkę zawierającą wyższe stężenie. Nie zaobserwowano istotnych różnic w kondycji pędów po tej zmianie, poza ich skróceniem w porównaniu do kontroli (pędów nie traktowanych metalem ciężkim). Długotrwałą kulturę prowadzono już jedynie na pożywce z 5,0  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Aplikowane stężenie chlorku kadmu wywoływało pewne objawy toksyczności, lecz nie powodowało zamierania materiału roślinnego ani utraty jego zdolności regeneracyjnych.

Pędy wawrzynka jaśminowego poddano także selekcji pod kątem tolerancji na **nikiel (praca P4)**. Ze względu na fakt, iż na naturalnych stanowiskach niektóre gatunki z tego rodzaju rosną na glebach serpentynitowych zasobnych w Ni (Bani et al. 2013; Muhammad et al. 2013), było celowe sprawdzenie także reakcji wawrzynka jaśminowego na ten pierwiastek. Selekcję prowadzono na pożywkach zawierających 0,05; 0,1; 0,5 i 1,0  $\text{mM}$   $\text{NiSO}_4$  (siarczanu (II) niklu). Zaobserwowano silne fitotoksyczne działanie dwóch najwyższych stężeń  $\text{NiSO}_4$ , pod wpływem których nastąpiło zahamowanie proliferacji pędów (współczynnik mikrorozmnażania po 8 tygodniach kultury wyniósł 1,0) i ich elongacji. Współczynnik tolerancji wyniósł 48,4-41,7% a ryzogeneza była całkiem wstrzymana. W obecności 0,05 i 0,1  $\text{mM}$   $\text{NiSO}_4$  rozwój kultury był bardziej zaawansowany, choć pędy słabiej się namnażały niż pędy kontrolne (nie traktowane nikiem). Tym niemniej współczynnik tolerancji wzrostu wyniósł 83,4-81,7%. Ukorzeniono około 50% materiału. Ponadto jedynie najniższe testowane stężenie niklu nie wywoływało chlorozy pędów. Do dalszych badań nad działaniem subletalnego stężenia niklu, a także w celu prowadzenia długotrwałej selekcji pędów wawrzynka jaśminowego tolerancyjnych na ten pierwiastek wybrano więc stężenie 0,05  $\text{mM}$   $\text{NiSO}_4$ . W namnożonych pędach oznaczono zawartość endogennych regulatorów wzrostu, oceniono strukturę anatomiczną liści i podstawy pędu oraz ultrastrukturę ich

komórek. Na podstawie wyników zebranych w **pracy P4** stwierdzono, że to stosunkowo niskie stężenie Ni powoduje degradację błon komórki, prowadząc do utworzenia mikropęcherzyków i destrukcji błon chloroplastów. Wiązało się to z akumulacją endogennych jasmonianów. Nie stwierdzono natomiast wzmożonej syntezy kwasu abscysynowego (ABA) w wolnej postaci, a jedynie akumulację jego formy zapasowej i transportowej. W pędach traktowanych niskim stężeniem Ni utrzymany został niezaburzony poziom aktywnych form auksyn, cytokinin i giberelin, co mogło być skutkiem efektu dormezy (*hormesis*), czyli stymulującego działania niskich dawek substancji toksycznej, przy jednoczesnym hamującym działaniu dawek wysokich (Calabrese i Blain 2009).

Wszystkie trzy linie wawrzyńka jaśminowego tolerancyjne względem **Pb**, **Cd** i **Ni** utrzymywane były na odpowiedniej pożywce selekcyjnej przez minimum rok (52 tygodnie), zanim zostały uznane za **linie długoterminowe** (Lt). Na dzień dzisiejszy kultury pędów wawrzyńka jaśminowego rosnące w obecności metali ciężkich i stanowiące linie LtPb, LtCd i LtNi mają odpowiednio 6, 5 i 3 lata (Fot. 1).



Fot.1. Kultury pędów wawrzyńka jaśminowego. Od lewej: linia kontrolna, linia LtPb, linia LtCd, linia LtNi.

Realizacja celu szczegółowego nr 2**Identyfikacja strategii akumulacji metali ciężkich w mnożonych pędach i zregenerowanych mikroroślinach oraz potencjalna przydatność wawrzynka jaśminowego w fitoremediacji**

Wyniki badań przedstawiono w pracach eksperymentalnych **P1, P2, P3 i P4**.

Analizowano potencjał wawrzynka jaśminowego do akumulacji toksycznych pierwiastków: **ołowiu, kadmu i niklu** w warunkach kultury *in vitro* w celu określenia strategii pobierania i dystrybucji metali ciężkich u tego gatunku.

Po 8 tygodniach kultury na pożywce z  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  stwierdzono, że najintensywniejsza akumulacja **ołowiu** miała miejsce podczas ekspozycji na najniższe zastosowane stężenie  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (0,1 mM), gdzie pędy zawierały  $107 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m. Pb}$  (**praca P1**, w pracy zawartości podano w  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Przy wyższych stężeniach pobieranie ołowiu było obniżone, a w pędach wykryto  $25\text{-}55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}$  tego pierwiastka. Niski był również współczynnik biokoncentracji (BCF-*bioconcentration factor*). Współczynnik BCF wyniósł zaledwie 1,26% przy 0,1 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  i 0,06% w przypadku pozostałych badanych stężeń. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że potencjał pędów wawrzynka do usuwania jonów ołowiu z pożywki i ich koncentracji w pędach jest silnie ograniczony. Możliwą przyczyną słabej akumulacji jonów ołowiu była niska mobilność tego pierwiastka, ale także brak systemu korzeniowego. W celu dokładniejszej oceny tego zjawiska czas trwania kultury wydłużono do 16 tygodni, a pożywkę selekcyjną zawierającą 1,0 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  wzbogacono dodatkami organicznymi, mającymi na celu zwiększenie efektywności ukorzeniania się pędów (**praca P2**). Wykorzystano hydrolizat agaru i pulpę ananasową, których działanie promujące ukorzenianie *in vitro* wykazano we wcześniejszych badaniach (Wiszniewska et al. 2013, 2016). Charakterystyki składu analizowanych suplementów dokonali zaproszeni przeze mnie do współpracy dr inż. Kinga Dziurka i dr Michał Dziurka z Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie. Wpływ badanych dodatków na potencjał regeneracyjny w kulturze pędów wawrzynka omówiono szczegółowo w punkcie czwartym niniejszego rozdziału.

Dłuższy czas trwania kultury umożliwił rozwój korzeni przybyszowych, także w pędach eksponowanych na 1,0 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Efektywność ukorzeniania wyniosła 68,6%. Stwierdzono akumulację Pb zarówno w pędach, jak i w korzeniach, przy czym

zawartość tego pierwiastka w korzeniach była znacznie wyższa niż w pędach: 718,77 vs. 21,27  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ . Wiązała się z tym niska wartość współczynnika translokacji, wynosząca 0,03 (TF – *translocation factor*), świadcząca o tym, że Pb był głównie akumulowany w korzeniach i w bardzo ograniczonym stopniu transportowany do pędów. Współczynnik BCF wyniósł 0,07% i nie zmienił się w porównaniu do 8 tygodniowej ekspozycji (opisanej w **pracy P1**). Wykorzystanie suplementów do pożywek znacząco podniosło akumulację ołowiu w organach wawrzyńka. W korzeniach rosnących w obecności 1,0 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  pulpy ananasowej stwierdzono 3432,31  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Pb i wzrost współczynnika BCF do 0,35%. Z kolei na pożywce z hydrolizatem agaru zawartość Pb wzrosła do 1035,88  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$  w korzeniach i do 171,37  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$  w pędach. Współczynnika translokacji TF wzrósł w porównaniu do pożywki niewzbogaconej do 0,17.

Pomimo obserwowanego wzrostu parametrów związanych z pobieraniem i transportem Pb pod wpływem zastosowanych dodatków organicznych, uzyskane wartości współczynników biokoncentracji i translokacji należało uznać za niskie. Zdecydowana większość pobranego metalu była immobilizowana w systemie korzeniowym, co jest powszechną strategią obronną u roślin nie będących hiperakumulatorami metali ciężkich (Wierzbicka et al. 2007; Pourrut et al. 2013). Badania przedstawione w **pracy P2** wskazują jednak na możliwość manipulowania parametrami związanymi z pobieraniem i dystrybucją metali ciężkich w roślinie przy zastosowaniu suplementacji podłoża dodatkami organicznymi. Podwyższenie pobierania i translokacji ołowiu może być wynikiem działania fitohormonów lub związków fenolowych obecnych w aplikowanych suplementach.

W **pracy P3** analizowano pobieranie i dystrybucję **kadm** w mikroroślinach wawrzyńka jaśminowego. Stwierdzono, że zawartość Cd była wyższa w korzeniach niż w pędach. W korzeniach, w zależności od aplikowanego stężenia  $\text{CdCl}_2$ , stężenie metalu wyniosło 29,44 – 130,12  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ , natomiast w pędach 3,68 – 35,77  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ . Najwyższa akumulacja Cd w korzeniach miała miejsce pod wpływem 2,5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , a w pędach pod wpływem stężenia 5,0  $\mu\text{M}$ . W tym ostatnim przypadku współczynnik TF był najwyższy i wyniósł 0,25. W kulturach rosnących przy niższych stężeniach chlorku kadmu TF wyniósł 0,1. Uzyskane dane świadczą o tym, że wawrzynek jaśminowy akumuluje kadm w korzeniach, a translokacja tego pierwiastka do pędów jest ograniczona. Należy jednak podkreślić, że chociaż testowane w niniejszych badaniach



stężenia kadmu były mikro-, a ołowiu milimolowe, to współczynnik translokacji dla kadmu był znacznie wyższy niż dla ołowiu. Było to z pewnością związane z wyższą mobilnością Cd, a być może także z lepszą rozpuszczalnością chlorku kadmu w pożywce. Współczynnik translokacji wyższy od jedności świadczy o efektywnym transporcie pierwiastka do pędów i warunkuje przydatność gatunku do fitoekstrakcji, czyli oczyszczania zanieczyszczonego podłoża poprzez akumulowanie toksycznych związków w biomase części nadziemnej (Tang et al. 2009; Przedpeńska-Wąsowicz et al. 2012). Jest to cecha gatunków akumulujących i hiperakumulujących metale ciężkie. Wawrzynek jaśminowy prezentuje zarówno w przypadku ekspozycji na ołów, jak i na kadm, strategię charakterystyczną dla **gatunków wykluczających** (*excluders*), które unikają pobierania metali ciężkich, lub wiążą je w korzeniach (organach podziemnych). Reakcja wawrzyńka jaśminowego jest więc w tym aspekcie taka jaka sama, jak u innych gatunków z rodzaju *Daphne* (Ater et al. 2000, Bani et al. 2013, Muhammad et al. 2013). Zdolność do immobilizacji metali ciężkich w systemie korzeniowym/ryzosferze jest wykorzystywana w **fitostabilizacji** i badany gatunek mógłby stanowić interesujący materiał roślinny na tym polu.

Przeanalizowano również zdolność akumulacji **niklu** w całych mikroślinkach wawrzyńka jaśminowego po 8 tygodniach ekspozycji (**praca P4**). Brak analizy zawartości tego pierwiastka osobno w korzeniach i w pędach spowodowany było ograniczoną ryzogenezą i niską biomasą uzyskanych korzeni. W niektórych wariantach doświadczalnych dysponowano również ograniczoną biomasą pędów w związku z fitotoksycznym działaniem aplikowanych stężeń  $\text{NiSO}_4$ . Selekcję prowadzono w obecności  $0,05 \text{ mM NiSO}_4$  i po 8 tygodniach stwierdzono w mikroślinkach średnią zawartość Ni wynoszącą  $192,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ . W pędach kontrolnych nietraktowanych niklem stężenie tego pierwiastka wyniosło  $1,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ . Wykazano natomiast, że suplementacja pożywki dodatkowymi fitohormonami może mieć wpływ na akumulację niklu w tkankach roślinnych. Najwyższą zawartość niklu, wynoszącą  $300,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ , stwierdzono po aplikacji  $0,05 \text{ mM NiSO}_4$  i  $0,2 \mu\text{M}$  brassinolidu (BL). Dodatek kwasu jasmonowego (JA) obniżył pobieranie Ni do  $153,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$ , natomiast kwasu giberelinowego ( $\text{GA}_3$ ) nie spowodował zmiany zawartości Ni w mikroślinkach w porównaniu z pożywką nie zawierającą dodatkowych fitohormonów. Podwyższenie akumulacji Ni pod wpływem BL było zaskakujące, ponieważ pobieranie metali ciężkich jest zazwyczaj hamowane w wyniku ograniczenia transpiracji i zamknięcia aparatów



szparkowych pod wpływem działania fitohormonów stresowych (Bücker-Neto et al. 2017). Dane literaturowe sugerują, że BL może zarówno hamować, jak i promować translokację metali ciężkich, ale raczej nie należy do związków zaangażowanych w dalekodystansowy transport (Lacombe i Achard 2016). Wzmożona akumulacja Ni w kulturze pędów wawrzynka jaśminowego mogła zatem zachodzić w okolicy podstawy pędu, zanurzonej w pożywce. Z kolei niższa zawartość Ni pod wpływem działania JA mogła wiązać się z podwyższoną syntezą związków fenolowych. Wyniki omówione w **pracy P4** dowiodły, że za pomocą egzogennych regulatorów wzrostu pobieranie metali ciężkich może być zarówno ograniczane, jak i intensyfikowane, a fakt ten pozwala na głębsze poznanie mechanizmów tolerancji roślin na toksyczne pierwiastki.

W **pracy P4** nie identyfikowano strategii akumulacji i dystrybucji niklu ze względu na ograniczenia w dostępności biomasy. Doświadczenia uzupełniające, których wyniki nie są jeszcze opublikowane, wykazały, że po 8 tygodniach ekspozycji na 0,05 mM NiSO<sub>4</sub> same pędy wawrzynka jaśminowego, oddzielone od korzeni, akumulowały średnio 40–50 µg Ni·g<sup>-1</sup>s.m.. Można zatem przypuszczać, że z tych blisko 200 µg·g<sup>-1</sup>s.m. oznaczonych w całej mikroroślinie trzy czwarte stanowi Ni zakumulowany w korzeniach. Wiązałoby się z to ze stosunkowo wysokim współczynnikiem translokacji dla tego metalu u badanego gatunku (≈ 0,33). Ze względu jednak na fakt, że TF wciąż byłby niższy od jedności, wawrzynek jaśminowy zostałby uznany względem niklu za gatunek wykluczający, podobnie jak w przypadku ołowiu i kadmu.

### Realizacja celu szczegółowego nr 3

#### **Porównanie zdolności morfogenetycznych i wybranych parametrów biochemicznych wawrzynka jaśminowego i rośliny metalotolerancyjnej podczas kultury *in vitro* i aklimatyzacji**

Wyniki badań przedstawiono w pracy eksperymentalnej **P3**.

W **pracy P3** analizie porównawczej poddano reakcje wawrzynka jaśminowego i smagliczki pagórkowej (*Alyssum montanum*) na działanie chlorku kadmu w kulturze *in vitro*. Do badań wybrano rośliny przystosowane do wzrostu w obecności metali ciężkich: ustabilizowaną kulturę pędową naturalnego **metalofitu** – ekotypu galmanowego smagliczki (wyprowadzoną z siewek uzyskanych z nasion zebranych z terenów Olkuskiego Regionu Rudnego), oraz kulturę pędową wawrzynka, nie będącego

metalofitem, otrzymaną w pierwszych doświadczeniach nad selekcją pod kątem tolerancji na ołów.

Rozwój kultur obu gatunków podczas ekspozycji na badane stężenia  $\text{CdCl}_2$  był zróżnicowany. Jak opisano w pierwszej części tego podrozdziału, traktowanie kadmem spowodowało zahamowanie proliferacji i ukorzeniania pędów wawrzynka, a wyższe stężenia także ograniczyły ich wzrost. Z kolei namnażanie pędów smagliczki było albo na takim samym poziomie jak w kulturach kontrolnych (wyższe stężenia Cd), bądź też wzrosło, jak w przypadku najniższego stężenia  $0,5 \mu\text{M CdCl}_2$ . Ta niska dawka spowodowała wzrost biomasy pędów i korzeni, skutkujący znaczącym podwyższeniem współczynnika tolerancji, który wyniósł odpowiednio 215,19 i 202,22%. Dla smagliczki więc niski poziom Cd stanowił czynnik stymulujący wzrost i organogenezę, natomiast dla wawrzynka była to już zawartość wywołująca niekorzystne zmiany, szczególnie w pędach. Na pożywkach z  $\text{Cd}^{2+}$  nastąpił przyrost biomasy, jednak w przypadku smagliczki w pędach, a u wawrzynka w korzeniach. Reakcja wawrzynka przypominała reakcje opisane także u innych roślin drzewiastych i mogła wynikać z przyłączania się jonów Cd w specyficznych miejscach wiązania, obecnych w rozległym systemie korzeniowym (Gussarsson et al. 1996). Z kolei reakcja smagliczki, typowa dla innych metalofitów, jest uważana za ich strategię służącą przetrwaniu w niekorzystnych warunkach (Seregin et al. 2014, Meyer et al. 2015). Co ciekawe, mikroorganizmy *D. jasminea* akumulowały więcej jonów  $\text{Cd}^{2+}$  niż mikroorganizmy *A. montanum*. W zaproponowanym systemie kultury nie stwierdzono u smagliczki właściwości hiperakumulatora, a nawet akumulatora Cd, co mogło być wywołane niską dawką metalu lub jego precypitacją w formie fosforanów, zmniejszającą biodostępność tego pierwiastka.

Różnice między smagliczką a wawrzynkiem stwierdzono w składzie pierwiastkowym namnożonych organów. Wyjściowo, kontrolne pędy smagliczki miały wysoką zawartość Ca, P, K, S i Mg, co często jest związane z istnieniem konstytutywnej tolerancji na metale ciężkie (Sebastian and Prasad 2016). Pod wpływem Cd w pędach smagliczki wzrosła zawartość P, K, S i Na, natomiast w pędach wawrzynka właściwie nie zaszły żadne istotne zmiany składu analizowanych makroelementów. Ten sam efekt wystąpił w korzeniach smagliczki, podczas gdy w korzeniach wawrzynka stwierdzono spadek zawartości badanych pierwiastków. Wyniki te wskazują, że u smagliczki aktywne były mechanizmy utrzymujące homeostazę makroskładników, co jest

potwierdzeniem metalo-tolerancyjnej natury tego gatunku. Niedobory mineralne stwierdzone w korzeniach wawrzyńki mogły być spowodowane akumulacją Cd głównie w tych organach, wynikającą z wysokiej wyjściowej zawartości fosforu i możliwości tworzenia precypitatów na powierzchni korzeni.

Zawartość barwników fotosyntetycznych – chlorofilu i karotenoidów, także różniła porównywane gatunki. U smagliczki traktowanej kadmem nastąpił wzrost zawartości barwników, podczas gdy u wawrzyńki przy większości traktowań stwierdzono niższe stężenie tych związków. Wyjściowy poziom chlorofilu był taki sam w pędach kontrolnych obu gatunków, natomiast więcej karotenoidów zawierały pędy smagliczki. Zdolność do utrzymania stałej lub podwyższonej zawartości barwników fotosyntetycznych, warunkujących przyrost biomasy (chlorofile) i działających jako antyoksydanty (karotenoidy), jest uznawana za cechę towarzyszącą tolerancji roślin na metale ciężkie. Nie zaobserwowano tego efektu w kulturach wawrzyńki poddanych działaniu kadmu, toteż należy uznać, że części nadziemne są u tego gatunku bardziej wrażliwe na toksyczny wpływ kadmu, a tolerancja na Cd związana jest z systemem korzeniowym.

Interesujące wyniki uzyskano również porównując proces aklimatyzacji mikroślin smagliczki i wawrzyńki do warunków *ex vitro*. Aklimatyzację prowadzono w ziemi ogrodniczej lub na odpadach poflotacyjnych, w których wcześniej stwierdzono obecność metali ciężkich (Muszyńska et al. 2013). U smagliczki proces ten był stosunkowo wydajny, a przeżywalność roślin po 4 tygodniach wyniosła 83-85%. Mikrośliny pochodzące z kultur kontrolnych tak samo aklimatyzowały się zarówno w czystej ziemi, jak i na odpadach, natomiast te pochodzące z kultur traktowanych kadmem słabiej aklimatyzowały się na odpadach (spadek przeżywalności do 62,5%). Z kolei wawrzynek aklimatyzował się słabo, co potwierdziło wcześniejsze doniesienia o ograniczonej przeżywalności mikroślin tego gatunku w warunkach *ex vitro* (Wiszniewska et al. 2013). W czystej ziemi ogrodniczej 4 tygodnie przetrwało 50%, a na odpadach poflotacyjnych 25% wysadzonych mikroślin pochodzących z pożywek kontrolnych. Co ciekawe, przeżywalność mikroślin powstałych w obecności Cd była znacząco wyższa i wyniosła odpowiednio 80%, a na odpadach poflotacyjnych 60%. Po 20 tygodniach aklimatyzacji żywe pozostały jedynie rośliny wawrzyńki pochodzące z pożywki zawierającej najwyższe testowane stężenie 5,0  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ : 10% w ziemi ogrodniczej, a 6% na odpadach. Biorąc pod uwagę działanie toksycznego czynnika

selekcyjnego, toksyczność podłoża oraz sam stres towarzyszący przejściu między uprawą *in vitro* i *ex vitro*, zaobserwowany wzrost przeżywalności roślin wawrzynka traktowanych kadmem *in vitro* może sugerować istnienie u tego gatunku podwyższonej zdolności przystosowania się (aklimacji) do warunków stresowych.

#### Realizacja celu szczegółowego nr 4a

### **Ocena możliwości wzmocnienia potencjału regeneracyjnego wawrzynka i zmniejszenia fitotoksyczności metali ciężkich poprzez wzbogacanie pożywki dodatkami organicznymi i egzogennymi fitohormonami**

Wyniki badań przedstawiono w pracach eksperymentalnych **P2** i **P4**.

Wykorzystując kulturę *in vitro* wawrzynka jaśminowego jako modelowy układ doświadczalny, zbadano możliwość poprawy warunków wzrostu roślin w toksycznym środowisku poprzez wzbogacenie pożywki dodatkami organicznymi pochodzenia naturalnego oraz wybranymi fitohormonami.

Suplementacja pożywki podczas selekcji pod kątem tolerancji na ołów (**praca P2**) miała na celu podwyższenie współczynnika namnażania pędów i ich ukorzeniania się. Wykorzystano dwa dodatki organiczne, których działanie promujące formowanie się korzeni zostało wcześniej wykazane (Wiszniewska et al. 2013, 2016): hydrolizat agaru (AH) i pulpę ananasową (PP). Oba dodatki sporządzono wg przepisów Bois (1992) i Kitsaki et al. (2004), a ich optymalne stężenie w pożywce ustalono na  $10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ . W otrzymanych produktach oznaczono zawartość cukrów rozpuszczalnych, kwasów fenolowych i endogennych regulatorów wzrostu metodami HPLC i UHPLC. Wykazano, że pulpa otrzymana z owocostanu ananasa była mieszaniną bardzo bogatą w analizowane związki. Zawierała  $36 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  cukrów, głównie fruktozę,  $0,026 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  kwasów fenolowych, wśród których dominowały kwas homowanilinowy, wanilinowy i cynamonowy. Wśród fitohormonów 82% ich całkowitej ilości ( $0,01 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) stanowił kwas abscysynowy (ABA), ale testowany dodatek zawierał również znaczne ilości auksyny – kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Hydrolizat agaru był dodatkiem znacznie uboższym w analizowane związki, lecz mimo to stwierdzono w nim obecność  $588,1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  cukrów, głównie sacharozy,  $0,7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  kwasów fenolowych, głównie kwasu ferulowego, chlorogenowego i benzoowego, a także pewne ilości cytokinin, z dominującym rybozydem cis-zeatyny, oraz auksyn, z dominującym kwasem indolilo-3-

masłowym (IBA). Informacja o obecności regulatorów wzrostu w preparatach z agaru, stosowanego powszechnie do zestawiania pożywek w kulturach *in vitro* może mieć istotne znaczenie dla optymalizacji składu pożywek, gdyż nie można wykluczyć wpływu tych związków na rozwój eksplantatów i całej kultury. W badanym tu hydrolizacie agaru „Oxoid” dominowały cytokininy, z kolei Arthur et al. (2004) donosili o obecności auksyn w wodnych ekstraktach sporządzonych z innych typów agarów. Warto dodać, że analiza składu substancji zestalających pożywki produkowanych przez różnych producentów ujawniła obecność regulatorów wzrostu w każdym z testowanych preparatów (dane własne nieopublikowane).

W części drugiej tego rozdziału przedstawiono zmiany akumulacji ołowiu i jego dystrybucji w organach wawrzynka jaśminowego pod wpływem badanych dodatków. Obserwowano także poprawę parametrów wzrostowych w badanych kulturach prowadzonych w obecności 1,0 mM  $Pb(NO_3)_2$ . Współczynnik tolerancji GTI dla pędów i korzeni uległ podwyższeniu z odpowiednio 74 i 77% do 91 i 123% na pożywce z PP oraz do 97 i 141% na pożywce z AH. Ukorzenianie notowano w 87,1 – 91,8% pędów, w porównaniu do 68,6% na pożywce bez suplementów, wzrósł także współczynnik mikrorozmnażania. Stwierdzono, że wzbogacenie pożywki badanymi substancjami stymulowało wzrost eksplantatów i organogenezę w obecności ołowiu. Efekt taki mógł być wynikiem dostarczenia dodatkowej puli związków odżywczych, szczególnie źródła węgla, oraz regulatorów wzrostu. Wysoka zawartość ABA w PP, będącego hormonem stresu, mogła powodować aktywację systemu obronnego rośliny w niekorzystnych warunkach środowiska (Wang et al. 2013). Co ciekawe, gdy badanymi dodatkami wzbogacono pożywkę nie zawierającą Pb, zaobserwowano silne zahamowanie wzrostu i proliferacji pędów oraz ukorzeniania. Można to tłumaczyć zachwianiem równowagi hormonalnej w takiej pożywce, co w przypadku braku czynnika stresowego w postaci metalu ciężkiego działało niekorzystnie na prowadzone kultury.

Prowadząc kultury *in vitro* wawrzynka w obecności niklu (**praca P4**) oceniano wzrost i rozwój eksplantatów pod wpływem wzbogacenia pożywki dodatkowymi egzogennymi fitohormonami. Zastosowano roztwory komercyjnie dostępnych związków: kwasu giberelinowego ( $GA_3$ ), kwasu jasmonowego (JA) i brassinolidu (BL). Zwrócono przy tym uwagę na fakt, że pomimo iż traktowanie egzogennymi fitohormonami jest stosowane w celu podwyższenia tolerancji roślin na działanie metali ciężkich (Saeidisar et al. 2007; Kaur et al. 2017), niewiele uwagi poświęca się problemowi

rozregulowania homeostazy endogennych regulatorów wzrostu, co może wiązać się z intensyfikacją stresu. W niniejszych badaniach stwierdzono, że aplikacja GA<sub>3</sub> i JA do pożywki zawierającej NiSO<sub>4</sub> poprawia proliferację i parametry wzrostu pędów, chociaż ogranicza formowanie się korzeni. Zanotowano podwyższenie współczynnika tolerancji wzrostu (GTI) pędów odpowiednio do 161,5 i 123,1%. W obecności GA<sub>3</sub> pędów przybyszowych tworzyło się więcej i były one dłuższe niż na pożywce z samym niklem. Poprawie zdolności regeneracyjnych towarzyszyły zmiany metaboliczne i strukturalne w mnożonych mikro roślinach. Kwas giberelinowy spowodował podwyższenie poziomu endogennych auksyn, zwłaszcza w formie konjugatów z aminokwasami, giberelin, kwasu salicylowego i jasmonianów. Stwierdzono ponadto ograniczenie inaktywacji auksyn. W komórkach obserwowano liczne peroksyksomy, co prawdopodobnie wiązało się z podwyższoną syntezą endogennych jasmonianów. Egzogenny kwas jasmonowy spowodował podwyższenie zawartości auksyn i wzrost aktywności merystematycznej w komórkach podstawy pędu. Nastąpił również wzrost aktywności przeciwrodnikowej i akumulacji związków fenolowych. Z drugiej strony, na poziomie komórkowych obserwowano niekorzystne zmiany w systemie błon wewnętrznych, szczególnie dezintegrację błon chloroplastów i formowanie się mikropęcherzyków. Było to prawdopodobnie skutkiem podwyższonej akumulacji ABA i obniżonej syntezy endogennych giberelin w kulturach traktowanych niklem i JA.

Hamujący wpływ na rozwój kultury miał dodatek brassinolidu. Pomimo, że wzrosła liczba namnożonych pędów, to nastąpiło znaczne ich skrócenie i spadek zawartości suchej masy, skutkujący obniżeniem współczynnika tolerancji do 69%. Wysoka zawartość ABA, podwyższony poziom oksydacji auksyn i spadek aktywności przeciwrodnikowej świadczyły o wzmożonej reakcji stresowej w kulturach rosnących w obecności niklu i BL. Wynikać to mogło z podwyższonej akumulacji Ni pod wpływem BL (co omówiono powyżej w części drugiej rozdziału). Na poziomie ultrastruktury komórek pędu dostrzegalne były zmiany w budowie ścian komórkowych, takie jak obecność strąków metalu, tworzenie się kanalików oraz wydzielanie substancji lipidowych i pektynowych na powierzchnię ściany, będące reakcją obronną służącą ograniczeniu wnikania niklu do protoplastu (Krzyszowska et al. 2016; Meychik et al. 2014).

Na podstawie wyników przedstawionych w **pracy P4** wykazano, że poprzez suplementację pożywki odpowiednimi egzogennymi fitohormonami możliwa jest

modulacja poziomu akumulacji niklu w pędach wawrzynka jaśminowego, a także poprawa parametrów wzrostu tego gatunku podczas ekspozycji na toksyczne pierwiastki.

#### Realizacja celu szczegółowego nr 4b

#### **Preekspozycja na metale ciężkie jako strategia aklimacji pędów do stresu metalicznego oparta na modulacji działania systemu antyoksydacyjnego**

Wyniki badań przedstawiono w pracy eksperymentalnej **P2** oraz w manuskrypcie złożonym do redakcji BMC Plant Biology dn. 26.03.2019 (obecnie w recenzji od 20.04.19)

Po wyprowadzeniu linii pędów zdolnych do wzrostu w obecności metali ciężkich, podjęto próbę identyfikacji procesów zachodzących podczas długotrwałej selekcji, związanych z tolerancją na stres metaliczny. Utrzymywanie długoterminowych kultur na pożywkach zawierających metale ciężkie potraktowano jako tzw. preekspozycję na te pierwiastki, mającą na celu przystosowanie pędów do wzrostu w zanieczyszczonym podłożu. W niniejszych badaniach skupiono się na jednym z najbardziej uniwersalnych mechanizmów obronnych podczas stresu abiotycznego, czyli na funkcjonowaniu systemu obrony antyoksydacyjnej podczas długotrwałej i krótkotrwałej ekspozycji na badane pierwiastki. Nie podjęto szczegółowych studiów nad porównaniem dystrybucji metali ciężkich w mikrośrodkach ze względu na niski poziom ich translokacji do pędów.

W pierwszych doświadczeniach (**praca P2**), porównano wpływ dodatków AH i PP na akumulację związków fenolowych i aktywność przeciwrodnikową w organach wawrzynka powstałych podczas kultury długoterminowej Lt Pb oraz po krótkiej ekspozycji na ołów. Stwierdzono, że zawartość związków fenolowych w korzeniach i pędach oraz aktywność przeciwrodnikowa uzyskanych z nich ekstraktów była zdecydowanie wyższa w kulturach długoterminowych niż w pędach wcześniej nie traktowanych ołowiem. Były to przesłanki świadczące o tym, że rośliny przystosowane do wzrostu w obecności metalu ciężkiego podczas długotrwałej selekcji rozwinęły skuteczniej działający aparat antyoksydacyjny. Wzmoczona akumulacja związków fenolowych jest uważana za metaboliczną adaptację spotykaną u roślin narażonych na działanie podwyższonych stężeń toksycznych pierwiastków (Wang et al. 2011).

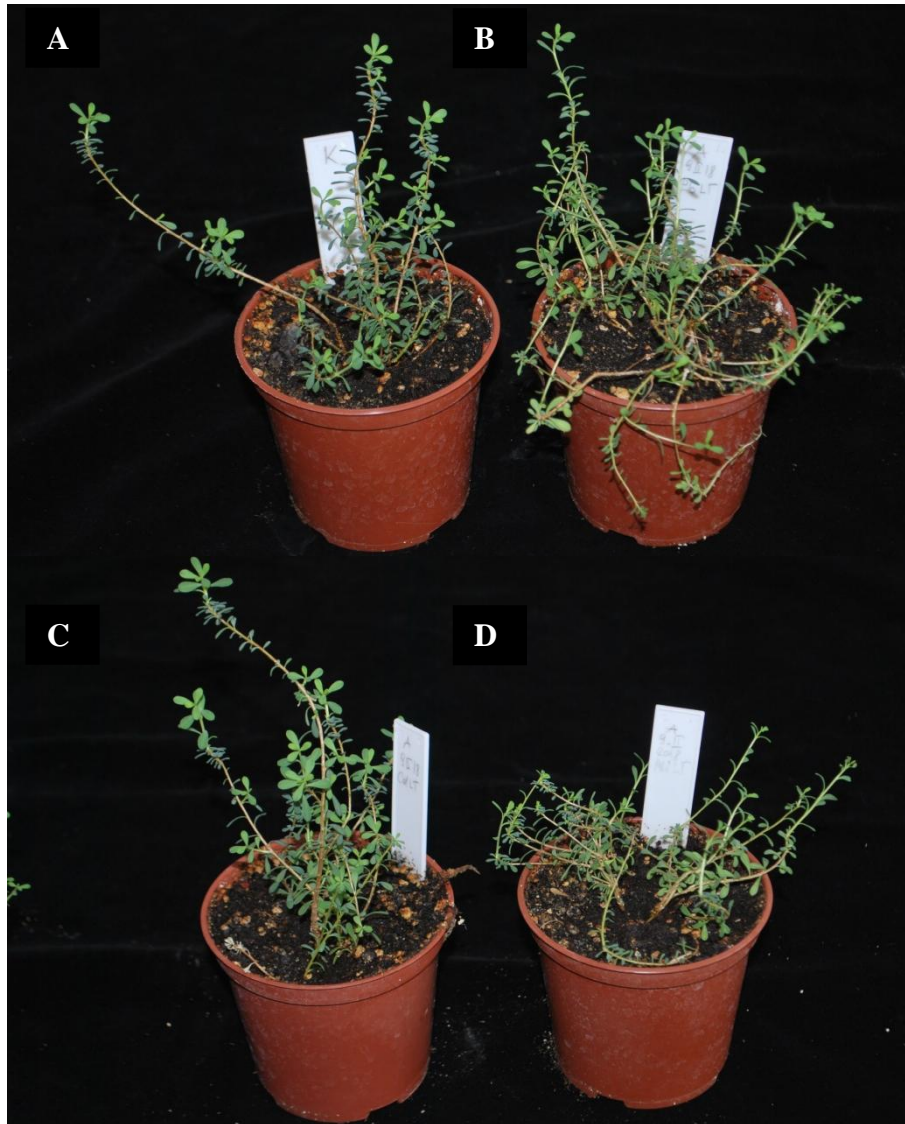


W **dalszych badaniach** (praca w recenzji w BMC Plant Biology) kompleksowo przeanalizowano funkcjonowanie aparatu antyoksydacyjnego pędów pochodzących z trzech wyprowadzonych linii długoterminowych (long-term) Lt Cd, Lt Ni i Lt Pb z ich odpowiednikami St Cd, St Ni i St Pb (short-term), krótko eksponowanymi na badane metale. Wykazano, że w liniach długoterminowych wawrzynka, niezależnie od rodzaju metalu ciężkiego, nastąpiło trwałe podwyższenie aktywności peroksydazy oraz wzrost zawartości karotenoidów i antocyjanów. Tolerancja ujawniona podczas preekspozycji na toksyczne pierwiastki wynikać mogła ze współdziałania składników systemu antyoksydacyjnego w różnych kompartmentach komórkowych: peroksydaz zmiatających wolne rodniki na terenie cytozolu, karotenoidów zabezpieczających przed uszkodzeniem błony chloroplastów i antocyjanów chelatujących jony metali w soku komórkowym. Ustalono również, które antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne związane są z odpowiedzią pędów wawrzynka na konkretne metale. Należała tu katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, glutation i askorbinian. Na podstawie otrzymanych wyników uznano, że preekspozycja na metale ciężkie może być wykorzystana jako strategia zwiększenia tolerancji roślin poprzez rodzaj aklimacji zwany *primed acclimation*, w którym następuje pobudzenie metabolizmu przez działanie stresora, w celu zwiększenia szans osobnika na przeżycie i lepszy rozwój w warunkach stresowych.

### **Podsumowanie najważniejszych osiągnięć prezentowanych badań**

- Dla badanego gatunku ustalono optymalne stężenia związków kadmu, ołowiu i niklu, pozwalające na prowadzenie długotrwałej selekcję linii tolerancyjnych, przy zachowaniu satysfakcjonującej żywotności, zdolności morfogenetycznej kultur oraz odpowiedniego poziomu fitotoksyczności.
- W wyniku długotrwałej presji selekcyjnej w kulturze *in vitro* wyprowadzono trzy ustabilizowane linie kultur pędów wawrzynka jaśminowego tolerancyjne względem umiarkowanych stężeń kadmu, niklu i ołowiu. Wszystkie linie charakteryzowały się niezaburzoną zdolnością do tworzenia pędów przybyszowych i spontanicznego ukorzeniania się, w związku z czym uzyskano w pełni wykształcone mikrorośliny, które zostały skutecznie przystosowane do warunków wzrostu *ex vitro* (Fot. 2).





Fot.2. Zaaklimatyzowane rośliny *D. jasminea* pochodzące z kultur *in vitro*: A) linia kontrolna, B) linia Lt Pb, C) linia Lt Cd, D) linia Lt Ni

- Poznano strategię akumulacji i dystrybucji metali ciężkich w organach wawrzynka jaśminowego. W przypadku wszystkich trzech analizowanych metali *D. jasminea* wykazuje cechy gatunków wykluczających, które większość pobranego pierwiastka gromadzą w korzeniach, co umożliwia wykorzystanie badanego gatunku do fitostabilizacji metali ciężkich w podłożu. Walory ozdobne oraz ograniczone pobieranie i translokacja toksycznych jonów do części nadziemnej sprawiają, że wawrzynek jaśminowy może być stosowany w nasadzeniach na terenie zieleni miejskiej, w miejscach narażonych na zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi. Porównując reakcje *D. jasminea* oraz metalotolerancyjnej krzewinki *A. montanum* potwierdzono, że

podwyższona tolerancja wawrzynka na kadm związana jest z fizjologicznymi funkcjami systemu korzeniowego.

- Wykazano, że poprzez suplementację pożywki dodatkami organicznymi i egzogennymi fitohormonami można skutecznie modulować stopień akumulacji metali ciężkich i ich dystrybucję w roślinie. Zastosowanie suplementów organicznych poprawiło warunki wzrostu i spowodowało wzrost tolerancji roślin na toksyczne działanie jonów ołowiu. Uzyskano również podwyższenie współczynników biokoncentracji i translokacji, co jest wynikiem istotnym ze względu na niską mobilność tego pierwiastka. W niwelacji niekorzystnych skutków działania niklu na wzrost i proliferację pędów najskuteczniejsza była aplikacja egzogennej gibereliny, natomiast działanie brassinolidem i kwasem jasmonowym powodowało odpowiednio wyższą i niższą akumulację niklu w pędach. Wyniki te mają znaczącą wartość praktyczną i mogą być wykorzystane we wspomaganej fitoremediacji w celu 1) regulacji poziomu bioakumulacji metali ciężkich w roślinach, 2) wykorzystania niskokosztowych substancji organicznych jako alternatywy dla syntetycznych związków chelatujących metale ciężkie.

- Zwrócono uwagę na fakt, iż agary różnego pochodzenia, powszechnie stosowane do zestawiania pożywek do kultur *in vitro* zawierają pewne ilości fitohormonów. Ma to znaczenie podczas optymalizacji składu pożywek, ponieważ zastąpienie jednego typu agaru innym może powodować odmienne reakcje morfogenetyczne mnożonego materiału.

- Wykazano, że mikrorośliny *D. jasminea* powstałe w trakcie kultury *in vitro* w obecności czynnika selekcyjnego w postaci jonów  $Cd^{2+}$  lepiej aklimatyzują się do warunków uprawy niż mikrorośliny kontrolne, nie poddane wcześniej działaniu stresu. Rośliny zregenerowane na pożywce selekcyjnej przeżywały okres aklimatyzacji zarówno w podłożu niezanieczyszczonym, jak i na odpadach poflotacyjnych zawierających metale ciężkie. Wynika z tego, że ekspozycja *D. jasminea* na stres w czasie rozwoju mikropędów w kulturze *in vitro* zapewnia podwyższoną zdolność materiału (linii) do przetrwania w warunkach stresowych (stres towarzyszący aklimatyzacji oraz stres związany z zanieczyszczeniem podłoża metalami ciężkimi).

- Stwierdzono, że długotrwała ekspozycja na badane metale ciężkie skutkuje zmianami w aktywności i zawartości związków należących do systemu antyoksydacyjnego. Aktywność przeciwrodnikowa i stężenie nieenzymatycznych antyoksydantów są podwyższone w pędach preekspozowanych na metale ciężkie w porównaniu z pędami

poddanymi krótko trwającej ekspozycji. Indukcja tolerancji na badane metale ciężkie u *D. jasminea* związana jest z podwyższeniem aktywności antyoksydacyjnej w najważniejszych kompartmentach komórkowych.

### **Kierunki i kontynuacja badań**

W przeprowadzonych badaniach nad indukcją tolerancji na metale ciężkie w kulturze *in vitro* wawrzynka jaśminowego uzyskano wyniki o znaczeniu praktycznym, które mogą być wykorzystane dla celów rewitalizacji terenów miejskich, umiarkowanie zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Postawiono również szereg nowych pytań dotyczących mechanizmów tolerancji na metale ciężkie u badanego gatunku, toteż w najbliższym czasie badania będą kontynuowane. Prowadzone obecnie doświadczenie ma na celu porównanie statusu odżywienia mineralnego oraz dystrybucji jonów metali ciężkich, a także makro- i mikroskładników w ukorzenionych pędach pochodzących z linii długoterminowych oraz krótko traktowanych metalami ciężkimi. Zamierzam także ocenić efektywność aklimatyzacji mikro roślin powstałych podczas długotrwałej selekcji i ich tolerancję na metale ciężkie w warunkach *ex vitro*. Dalsze badania będą dotyczyły struktury anatomicznej i funkcjonowania systemu korzeniowego, w szczególności syntezy związków chelatujących metale ciężkie, w celu identyfikacji mechanizmów związanych z akumulacją metali ciężkich w korzeniach i/lub jej unikaniem, jak również z ograniczeniem translokacji toksycznych jonów do pędów. Istotnym zagadnieniem badawczym będzie również sprawdzenie czy z indukowaną u *D. jasminea* tolerancją na kadm, ołów i nikiel związane są zmiany epigenetyczne przekazywane kolejnym pokoleniom regenerowanych klonów i czy cechy te są trwałe, czy ujawniają się tylko podczas ekspozycji na metale ciężkie.

### **Literatura**

- Anawar HM, Freitas MC, Canha N, Regina IS (2011) Arsenic, antimony, and other trace element contamination in a mine tailings affected area and uptake by tolerant plant species. *Environ Geochem Health* 33:353–362.
- Arthur G D, Stirk WA, Van Staden J, Thomas TH (2004) Screening of aqueous extracts from gelling agents (Agar and Gelrite) for root-stimulating activity. *S Afr J Bot*70(4): 595–601
- Ashrafzadeh S, Leung DMW (2015) In vitro breeding of heavy metal-resistant plants: A review. *Hortic Environ Biotechnol* 56:131–136.
- Ater M, Lefèbvre C, Gruber W, Meerts P (2000) A phytogeochemical survey of the flora of ultramafic and adjacent normal soils in North Morocco. *Plant Soil* 218:127–135
- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutrit* 3(1-4), 643-654
- Bani A, Imeri A, Echevarria G, et al (2013) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. *Fresenius Environ Bull* 22:1792–1801.

- Bois F (1992) The influence of some natural cell-wall derived precursors on organogenesis and differentiation of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) callus cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 28(1): 91–96.
- Bonet A, Lelu-Walter M-A, Faugeton C, et al (2016) Physiological responses of the hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets. *Environ Sci Pollut Res* 23:8617–8626.
- Bücker-Neto L, Paiva ALS, Machado RD, et al (2017) Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genet Mol Biol* 40:373–386.
- Calabrese EJ, Blain RB (2009) Hormesis and plant biology. *Environ Pollut* 157:42–48.
- Fourati E, Vogel-Mikuš K, Bettaieb T, et al (2019) Physiological response and mineral elements accumulation pattern in *Sesuvium portulacastrum* L. subjected in vitro to nickel. *Chemosphere* 219:463–471.
- Gussarsson M, Asp H, Adalsteinsson S, Jensén P (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO). *J Exp Bot* 47(2):211–215.
- Hanus-Fajerska E, Wiszniewska A, Czaicki P (2012) Effectiveness of *Daphne* L. (Thymelaeaceae) in vitro propagation, rooting and acclimatization of microshoots. *Acta Agrobotanica* 65:21–28
- Hasan MK, Cheng Y, Kanwar MK, et al (2017) Responses of plant proteins to heavy metal stress— a review. *Front Plant Sci* 8:1492.
- Kaur R, Yadav P, Thukral AK, et al (2017) Castasterone and citric acid supplementation alleviates cadmium toxicity by modifying antioxidants and organic acids in *Brassica juncea*. *J Plant Growth Regul* 0:1–14.
- Kitsaki CK, Zygouraki S, Ziobora M, Kintzios S (2004) *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (*Orchidaceae*). *Plant Cell Rep* 23:284–290
- Koźmińska A, Wiszniewska A, Hanus-Fajerska E, Muszyńska E (2018) Recent strategies of increasing metal tolerance and phytoremediation potential using genetic transformation of plants. *Plant Biotechnol Rep*. 12: 1-14
- Krzyszowska M, Rabęda I, Basińska A, et al (2016) Pectinous cell wall thickenings formation - a common defense strategy of plants to cope with Pb. *Environ Pollut* 214:354–361.
- Lacombe B, Achard P (2016) Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr Opin Plant Biol* 34:1–8.
- Luo Z-B, He J, Polle A, Rennenberg H (2016) Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnol Adv* 34:1131–1148.
- Meychik N, Nikolaeva Y, Kushunina M, Yermakov I (2014) Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal-binding sites in plant cell walls? *Plant Soil* 381:25–34.
- Meyer CL, Juraniec M, Huguet S, et al (2015) Intraspecific variability of cadmium tolerance and accumulation, and cadmium-induced cell wall modifications in the metal hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *J Exp Bot* 66(11): 3215–3227
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J Environ Stud* 15:523–530.
- Muhammad S, Shah MT, Khan S, et al (2013) Wild plant assessment for heavy metal phytoremediation potential along the mafic and ultramafic terrain in Northern Pakistan. *Biomed Res Int* 2013:. doi: 10.1155/2013/194765
- Muszyńska E, Hanus-Fajerska E, Ciarkowska K (2013) Evaluation of seed germination ability of native calamine plant species on different substrata. *Pol J Environ Stud* 22 (6): 1775– 1780.
- Muszyńska E, Hanus-Fajerska E, Ciarkowska K (2018a) Studies on lead and cadmium toxicity in *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype cultivated *in vitro*. *Plant Biol* 20:474–482.
- Muszyńska E, Hanus-Fajerska E, Koźmińska A (2018b) Differential tolerance to lead and cadmium of micropropagated *Gypsophila fastigiata* ecotype. *Water, Air, Soil Pollut* 229:42. doi: 10.1007/s11270-018-3702-8
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8:199–216. doi: 10.1007/s10311-010-0297-8
- Najeeb U, Ahmad W, Zia MH, et al (2017) Enhancing the lead phytostabilization in wetland plant *Juncus effusus* L. through somaclonal manipulation and EDTA enrichment. *Arab J Chem* 10:S3310–S3317
- Ovečka M, Takáč T (2014) Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnol Adv* 32:73–86.
- Pourrut B, Shahid M, Douay F, et al (2013) Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants. In: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 121–147

- Przedpeńska-Wąsowicz E, Polatajko A, Wierzbicka M (2012) The influence of cadmium stress on the content of mineral nutrients and metal-binding proteins in *Arabidopsis halleri*. *Water Air Soil Pollut* 223(8): 5445–5458.
- Radojčić Redovniković I, De Marco A, Proietti C, et al (2017) Poplar response to cadmium and lead soil contamination. *Ecotoxicol Environ Saf* 144:482–489.
- Saeidi-sar S, Khavari-nejad RA, Fahimi H, et al (2007) Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in *Glycine max* seedlings under nickel stress 1. *Russ J Plant Physiol* 54:74–79.
- Sebastian A, Prasad MNV (2016) Modulatory role of mineral nutrients on cadmium accumulation and stress tolerance in *Oryza sativa* L. seedlings. *Environ Sci Pollut Res* 23(2): 1224–1233.
- Seregin IV, Erlikh NT, Kozhevnikova AD (2014) Nickel and zinc accumulation capacities and tolerance to these metals in the excluder *Thlaspi arvense* and the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Russ J Plant Physiol* 61(2):204–214.
- Sharma SS, Dietz K-J, Mimura T (2016) Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell Environ* 39:1112–1126.
- Singh S, Parihar P, Singh R, et al (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front Plant Sci* 6:1143.
- Tang YT, Qiu RL, Zeng XW, Ying RR, Yu F M, Zhou XY (2009) Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environ Exp Bot* 66(1): 126–134.
- Wang C, Lu J, Zhang S, Wang P, Hou J, Qian J (2011) Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisnerianatans*. *Ecotox Environ Safe* 74(5): 1297–1303
- Wang J, Chen J, Pan K (2013) Effect of exogenous abscisic acid on the level of antioxidants in *Atractylodes macrocephala* Koidz under lead stress. *Environ Sci Pollut Res* 20(3): 1441–1449
- Wierzbicka M, Przedpeńska E, Ruzik R, Querdane L, Polec-Pawlak K, Jarosz M, Szponar J, Szakiel A (2007) Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma* 231:99–111.
- Wiszniewska A, Hanus-Fajerska E, Grabski K, Tukaj Z (2013) Promoting effects of organic medium supplements on the micropropagation of promising ornamental *Daphne* species (Thymelaeaceae). *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 49:51–59.
- Wiszniewska A, Hanus-Fajerska E, Muszyńska E, Ciarkowska K (2016) Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: areview of recent progress. *Pedosphere* 26:1–12. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60017-0
- Wolff-Schuch MW, Cellini A, Masia A, Marino G (2010) Aluminium-induced effects on growth, morphogenesis and oxidative stress reactions in in vitro cultures of quince. *Sci Hortic (Amsterdam)* 125:151–158.

### **III. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Wszystkie cytowane prace zostały opisane w „Wykazie prac”, załącznik 4, p. II (część dotycząca prac spoza osiągnięcia habilitacyjnego). Symbole prac odnoszą się do ich oznaczeń w ww. wykazie.

#### **Praca naukowa przed uzyskaniem doktoratu**

##### **Badania nad optymalizacją kultur *in vitro*, w szczególności kultur kalusa i protoplastów, łubinu żółtego**

prace B1, M1

doniesienia D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8

Badania w ramach pracy doktorskiej dotyczyły opracowania metodyki prowadzenia kultur *in vitro* komórek i protoplastów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). Ta wartościowa roślina motylkowata jest gatunkiem silnie wrażliwym na manipulacje *in vitro* i cechuje się niskim potencjałem morfogenetycznym. Badania obejmowały ocenę przydatności różnych eksplantatów oraz optymalizację składu pożywki do indukcji i proliferacji tkanki kalusowej. Ze względu na silne ciemnienie i zamieranie eksplantatów, testowano związki ograniczające nadprodukcję związków fenolowych, m.in. azotan srebra i poliwinylpirolidon. Tkanka kalusowa stanowiła materiał do wyprowadzenia kultur zawiesinowych oraz do izolacji protoplastów.

Głównym celem badań w ramach pracy doktorskiej było podwyższenie efektywności izolacji protoplastów z różnych tkanek i organów łubinu żółtego, pochodzących zarówno z siewek rosnących *in vitro*, jak i materiału szklarniowego, a także opracowanie warunków kultury protoplastów i zregenerowanych z nich komórek. Oceniano efektywność izolacji przy użyciu mieszanin enzymatycznych o różnym składzie oraz późniejszy rozwój kultury w pierwszych dniach po izolacji.

#### **Praca naukowa po doktoracie**

##### **Komórkowe aspekty regeneracji w kulturach protoplastów - kontynuacja badań nad kulturami protoplastów łubinu i innych roślin wrażliwych *in vitro***

prace: A2, A3, A6, B3, B6, B7, B9, B11

doniesienia: D9, D10, D11, D13, D14, D17, D19, D21, D23, D25, D35

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania służące opracowaniu warunków efektywnej izolacji i regeneracji w kulturach protoplastów łubinu żółtego. W wyniku testowania różnych form kultywacji protoplastów uzyskano kilkukomórkowe protokolonie z protoplastów hypokotylowych, liścieniowych oraz pojedyncze podziały w kulturach protoplastów mezofilowych, a także stwierdzono, że najlepsze efekty przynosi kultura w pożywce zestalonej agarozą i zawierającej węgiel aktywowany (**praca A2**). Jako główną przyczynę niepowodzeń w utrzymaniu zdolności podziałowych protoplastów łubinu żółtego uznano zaburzenia w odtwarzaniu ściany komórkowej (**prace B3, B9**). Struktura nowopowstałej ściany nie była jednolita, obserwowano dziury na jej powierzchni lub odstające fragmenty włókien celulozowych. Stwierdzono także obecność depozytów kalozy, mogących świadczyć o uszkodzeniu zewnętrznej powierzchni protoplastów.

Badania rozszerzono na inne gatunki roślin trudno regenerujących z protoplastów: lędźwian siewny, a także przedstawiciele jednoliściennych: hiacynta wschodniego i szparaga ozdobnego (**praca B7**). Celem była identyfikacja zaburzeń powstających w pierwszych dniach kultury. Ustalono, że poziom stresu oksydacyjnego w protoplastach różni się w zależności od składu mieszaniny enzymatycznej (**praca B11**). Optymalny jej skład pozwala uzyskać protoplasty o podwyższonych zdolnościach regeneracji ściany komórkowej, co może przyczynić się do bardziej zaawansowanego rozwoju kultury. W zregenerowanej ścianie komórkowej analizowano też rozmieszczenie białek arabinogalaktanowych (AGP), glikoprotein kotwiczących zarówno w ścianie, jak i w plazmo lemmie (**praca A6**). Rozmieszczenie AGP różniło się w protoplastach żywotnych, podejmujących podziały, oraz w protoplastach zamierających. W dzielących się komórkach powstałych z protoplastów mezofilowych lędźwianu udowodniono występowanie AGP w przegrodzie pierwotnej, łączącej komórki potomne. W protoplastach zamierających białka AGP były obecne w różnych obszarach ściany komórkowej, będąc prawdopodobnie znacznikiem wejścia komórki w fazę programowanej śmierci.

**Optymalizacja warunków prowadzenia kultur *in vitro* różnych gatunków roślin - badania nad zastosowaniem dodatków organicznych do pożywek w celu intensyfikacji organogenezy eksplantatów**



Ten szeroki temat badawczy realizowano na kilku gatunkach roślin w celu podniesienia efektywności mikrorozmnażania i ukorzenia. Zapoczątkowały go badania prowadzone w kulturach protoplastów, gdzie suplementacja pożywki związkami organicznymi miała podwyższyć przeżywalność protoplastów i ich zdolności regeneracyjne. Wzięto pod uwagę możliwość redukcji stężenia dodawanych do pożywki komercyjnych regulatorów wzrostu dzięki wykorzystaniu biologicznie aktywnych suplementów. Zagadnienie to poruszono także w badaniach prowadzonych w ramach przygotowania cyklu publikacji stanowiących prezentowane osiągnięcie habilitacyjne (prace **P2** i **P4**). Doświadczeniami spoza osiągnięcia objęto głównie rośliny drzewiaste i ozdobne oraz gatunki metalolubne.

### **Kultury *in vitro* roślin drzewiastych i ozdobnych**

**prace:**A4, A5, A9, B5, B10

**doniesienia:**D12, D15, D16, D18, D28, D29, D30, D34, D38, D39

W kulturach pędów oceniano zdolności regeneracyjne wawrzynków pochodzących z różnych rejonów świata, a także gatunku rodzimego *D. mezereum*. W pierwszych badaniach (**praca B5**) opracowano skład pożywki, na której mnożono pędy, jednak kolejne etapy produkcji roślin zachodziły z różną efektywnością u poszczególnych gatunków. W celu poprawy warunków kultury zastosowano suplementację pożywki wodą kokosową, chitozanem, arabinogalaktanem lub pulpą ananasową. Dla niektórych gatunków zastosowano również dodatek pożywki kondycjonowanej po hodowli zielenicy *Desmodemus subspicatus*, którą pozyskano w ramach współpracy z prof. Zbigniewem Tukajem i dr Krzysztofem Grabskim z ówczesnej Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego (**praca A4**). Wzbogacenie pożywki spowodowało rozwój pędów przybyszowych w kulturach *D. caucasica*, a u *D. tangutica* formowanie się korzeni. Stwierdzono ponadto, że przy odpowiednim stężeniu pożywki kondycjonowanej można wyeliminować użycie komercyjnych regulatorów wzrostu, bez pogorszenia się parametrów namnażania pędów, lub też utrzymywać przez dłuższy czas kultury w formie juvenilnej, bez konieczności częstych pasaży.

Kultury *in vitro* wykorzystano także jako modelowy układ doświadczalny służący wstępnej ocenie odporności różnych gatunków wawrzynków na porażenie patogenem



grzybowym *Thielaviopsis basicola* (**praca A5**). Pracę tę zainicjowały badania dr Andrew Risemana z UBC British Columbia w Kanadzie nad podatnością wawrzynek na chorobę systemu korzeniowego, znaną jako zespół nagłej śmierci wawrzyńka (*Daphne Sudden Death Syndrome*). Opracowano warunki wzrostu *in vitro* izolowanych korzeni czterech gatunków *Daphne* na pożywkach stałych i płynnych. Następnie korzenie inokulowano zawiesiną zarodników patogena i oceniano stopień ich porażenia u poszczególnych gatunków. Najmniej zmian chorobowych obserwowano u *D. jasminea* i *D. caucasica*, co sugerowało ich podwyższoną odporność na infekcję *T. basicola*.

Badano również efektywność ukorzenia pędów dwóch odmian śliwy domowej (*Prunus domestica*) w warunkach *in vitro* na pożywkach wzbogaconych pożywką kondycjonowaną lub frakcją niskocząsteczkową (dializatem) uzyskaną z owocostanu ananasa (**praca A9**). Istotnym osiągnięciem była możliwość obniżenia stężenia auksyn dodawanych do pożywki, przy zachowaniu podobnej efektywności ryzogenezy. U słabo ukorzeniającej się ‘Węgierki Zwykłej’ zredukowano stężenie auksyn o połowę, a u ‘Węgierki Dąbrowickiej’ wydajnie ukorzeniano pędy na wzbogaconych pożywkach bez aplikacji egzogennych fitohormonów. Stwierdzono, że badane dodatki powodują zmiany akumulacji związków fenolowych w podstawach pędu, będących miejscem regeneracji korzeni przybyszowych. Ponadto na różnych testowanych wariantach pożywek procesy dedyferencji komórek podstawy pędu zachodziły w odmiennym tempie i w innych strefach łodygi.

Podczas namnażania ozdobnej pelargonii (*Pelargonium x domesticum*) w kulturze *in vitro* wykazano skuteczność suplementacji pożywki peptonem i adeniną (**praca B10**). W ostatnim czasie przetestowano również możliwość zastąpienia w pożywece komercyjnego węgla aktywowanego produktem powstałym podczas pirolizy biomasy, czyli tzw. biowęgłem. Badane rodzaje biowęgla otrzymano z International Institute for Sustainability w Rio de Janeiro w Brazylii dzięki współpracy z dr hab. inż. Agnieszką Latawiec. Zaobserwowano znaczące zmiany potencjału regeneracyjnego eksplantatów rosnących na pożywkach zawierających różne typy biowęgla, co wiąże się z fluktuacjami endogennych fitohormonów i zmianami metabolicznymi w mnożonych organach. Wyniki doświadczenia są obecnie przygotowywane do druku, a wstępne rezultaty przedstawiono w formie doniesień konferencyjnych (**D39, D49**).

### **Kultury *in vitro* roślin metalolubnych**

**prace: A1, B2, B3, M2**

**doniesienia: D23, D26, D27, D31, D32, D33, D36, D37, D44**

W trakcie pracy naukowej byłam członkiem zespołu prowadzącego badania nad optymalizacją warunków kultur *in vitro* dla metalolubnych ekotypów różnych gatunków roślin pochodzących z obszarów pogórnicznych na terenie Olkuskiego Rejonu Rudnego. Z tego zakresu opublikowano prace dotyczące galmanowych ekotypów lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*) (**prace A1, B2**) i pleszczotki górskiej (*Biscutella laevigata*) (**praca B3**), a także doniesienia przedstawiające wyniki badań prowadzonych w kulturach *in vitro* smagliczki pagórkowej (*Alyssum montanum*) i goździka kartuzka (*Dianthus carthusianorum*). Analizę stanu zachowania bioróżnorodności metalofitów w Polsce i zasadność tworzenia ich kolekcji dla celów praktycznych, poznawczych i edukacyjnych omówiono w rozdziale monografii (**praca M2**) oraz przedstawiono podczas doniesień konferencyjnych (**D27, D37**). Badania na tym polu są nadal kontynuowane we współpracy z dr inż. Ewą Muszyńską z SGGW w Warszawie.

### **Perspektywy poprawy efektywności fitoremediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi**

**prace: A8, A10**

W dwóch pracach przeglądowych przedyskutowano możliwości poprawy efektywności biologicznego oczyszczania gleb z pierwiastków balastowych i innych zanieczyszczeń przy użyciu roślin. W **pracy A8** omówiono działanie powszechnie stosowanych naturalnych dodatków nieorganicznych i organicznych, służące bądź stabilizacji metali ciężkich w glebie, bądź podwyższeniu ich biodostępności i translokacji do części nadziemnych. Przedstawiono m.in. potencjalne mechanizmy działania, zalety oraz wady wykorzystania biowęgli, odpadów rolniczych i przemysłowych, substancji humusowych, syntetycznych chelatorów, niskocząsteczkowych kwasów organicznych. Ponadto przedyskutowano możliwości wykorzystania naturalnych dodatków pochodzenia roślinnego, szczególnie preparatów zawierających związki fenolowe i fitohormony, oraz biostymulatorów izolowanych z biomasy roślinnej.

W **pracy A10** przedstawiono przegląd aktualnego stanu wiedzy oraz perspektywy badawcze na temat transformacji roślin w kierunku tworzenia genotypów o podwyższonej zdolności do fitoremediacji. Omówiono najnowsze osiągnięcia uzyskane dzięki podwyższeniu ekspresji genów kodujących transportery i chelatory metali, transformacji genomu chloroplastowego i wyciszania genów. Przedstawiono również potencjał cisgenety i intragenety, podczas których genom roślinny jest transformowany kopiami naturalnie występujących u danego gatunku genów, bez wprowadzania obcych genetycznie sekwencji.

### **Badania nad skutecznością biofortyfikacji owoców pomidora w jod**

**prace:** A7, B4

**doniesienia:** D20, D24

W trakcie pracy naukowej byłam członkiem zespołu pracującego nad metodami biofortyfikacji pomidora w jod. Badania te realizowałam jako wykonawca grantu MNiSWN N310 080238 „Efektywność biofortyfikacji pomidora w jod w uprawie hydroponicznej z recyrkulacją pożywki”, którym kierował prof. dr hab. inż. Włodzimierz Sady przy aktywnym udziale dr hab. inż. Sylwestra Smolenia z mojego macierzystego Wydziału. Owoce pomidora zawierające podwyższone stężenie jodu mogą stanowić istotne źródło tego pierwiastka, niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Stwierdzono, że uprawa pomidora w systemie hydroponicznym z wykorzystaniem pożywki zawierającej KI i KIO<sub>3</sub> skutkuje podwyższoną zawartością jodu w owocach, a dodatkowa suplementacja kwasem salicylowym przyczynia się do intensywniejszej akumulacji tego pierwiastka (**praca A7**). Wykazano także, że nawożenie roślin pomidora solami jodu powoduje zmiany metabolizmu azotu, lecz nie ma wpływu na wzrost organów wegetatywnych (**praca B4**).

### **Badania porównawcze zmierzające do wyodrębnienia parametrów wskaźnikowych charakterystycznych dla podatności i tolerancji na stresy abiotyczne**

**prace:** A11, A12

**doniesienia:** D40, D41, D45, D46

Jako promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim mgr inż. Aleksandry Koźmińskiej brałam udział w doświadczeniach realizowanych we współpracy z pracownikami Polytechnic University of Valencia z Hiszpanii, prof. Oscarem Vicente i dr Monicą Boscaiu. Badania miały na celu identyfikację parametrów wskaźnikowych związanych z podatnością lub tolerancją wybranych roślin na stresy suszy i zasolenia. W **pracy A11** przeanalizowano parametry biochemiczne towarzyszące tolerancji czterech gatunków rozchodnika (*Sedum* sp.) na stres suszy. Ustalono, że w obrębie rodzaju *Sedum* gatunki różnią się stopniem wrażliwości na ten stres, co ujawnia się m. in. zróżnicowaniem zawartości barwników fotosyntetycznych oraz akumulacji osmolitów i nieenzymatycznych antyoksydantów. Z kolei w **pracy A12** badano reakcję ekotypów lepnicy rozdętej (*S. vulgaris*) pochodzących ze stanowisk polskich i hiszpańskich, na stresy suszy i zasolenia. Ekotypy charakteryzowały się odmienną tolerancją na aplikowane stresory, związaną ze zdolnością utrzymania równowagi jonowej. W ostatnim czasie współpracowałam z dr inż. Anną Kołton z macierzystego Wydziału w badaniach nad regulacją aktywności białek fosfatazowych w organach pomidora podczas stresu hipoksji aplikowanego w strefie korzeniowej (**D41, D45**).

### **Ko-tolerancja roślin względem różnych stresów abiotycznych i jej mechanizmy**

**praca: M3, A13**

**doniesienie: D48**

Tematem badawczym, którym zainteresowałam się w ostatnich latach są mechanizmy ko-tolerancji roślin na działanie kilku stresów abiotycznych. Reakcje warunkujące ko-tolerancję są powszechne u ekstremofitów, przystosowanych do wzrostu w warunkach stresowych, na przykład w podłożu zasolonym, zanieczyszczonym metalami ciężkimi czy na stanowiskach suchych. W **pracy M3** przedyskutowano mechanizmy warunkujące tolerancję halofitów na działanie metali ciężkich. Zaprojektowano doświadczenie mające na celu ocenę reakcji obligatoryjnego halofita astra solnego (*Aster tripolium*, *Tripolium panonicum*) podczas ekspozycji na sole chlorkowe kadmu i ołowiu (**praca A13**). Dzięki profilowaniu metabolom wykazano wzajemne zależności zawartości endogennego kwasu salicylowego i aktywnych form giberelin podczas ekspozycji na stres, różne dla zasolenia i stresu metalicznego. Wyniki wskazały także na współdziałanie etylenu i jasmonianów w reakcji na stres abiotyczny u astra solnego.

Na tle licznych publikacji na temat tolerancji halofitów na stres metaliczny postawiono pytanie odwrotne: czy metalofity wykazują tolerancję względem stresu zasolenia? Wstępne badania zrealizowano dzięki finansowaniu w ramach konkursu Miniatura 1 NCN zadania badawczego pt. „Mechanizmy ko-tolerancji względem podwyższonych stężeń kadmu i zasolenia w kulturach *in vitro* ekotypu galmanowego i niegalmanowego lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*)” (DEC-2017/01/X/NZ8/00929). Wyniki zostały przedstawione w sprawozdaniu z realizacji zadania badawczego. Wykazano, że reakcje wzrostowe podczas ekspozycji na aplikowane pojedynczo i łącznie stresory, czyli 5  $\mu\text{M}$  chlorku kadmu i dwa poziomy zasolenia (10 i 100 mM NaCl), były odmienne u badanych ekotypów lepnicy. Ekotyp galmanowy był tolerancyjny względem jonów  $\text{Cd}^{2+}$ , lecz wrażliwy na wysokie zasolenie. Stwierdzono, że u metalolubnych osobników lepnicy nie aktywują się wydajne mechanizmy obronne w odpowiedzi na stres zasolenia (D48). Świadczyć to może o odmiennych mechanizmach tolerancji na zasolenie i stres kadmowy u metalolubnych roślin. Badania na ten będą nadal realizowane.

### **Genotoksyczność metali ciężkich i efektywność mechanizmów naprawy DNA w trakcie stresu metalicznego**

#### **doniesienie: D47**

Porównanie genotoksyczności metali ciężkich u roślin blisko spokrewnionych, należących do tego samego taksonu, lecz różniących się tolerancją na stres metaliczny, pozwoli na lepsze poznanie mechanizmów adaptacji ekotypów do stresu metalicznego. Pierwsze doświadczenia wykazały, że ekspozycja na kadmu powoduje mniejszą fragmentację materiału genetycznego u roślin ekotypu galmanowego lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*) niż u roślin należących do populacji referencyjnej, nie pochodzącej z zanieczyszczonego metalami ciężkimi terenu (D47). Przyszłe badania obejmą również ocenę działania toksycznych metali u innych gatunków oraz efektywność mechanizmów naprawy DNA w trakcie stresu metalicznego.

### Zestawienie informacji nt. dorobku naukowego:

	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	Liczba	Pkt	IF	Liczba	Pkt	IF	Liczba	Pkt	IF
1. Oryginalne prace twórcze									
- wchodzące w skład osiągnięcia									
habilitacyjnego			4	110	8,401	4	110	8,401	
a) z bazy JCR									
- spoza osiągnięcia habilitacyjnego									
a) z bazy JCR			13*	280	16,147	13*	280	16,147	
b) w innych recenzowanych czasopismach	1	2	10	72		11	74		
2. Pozostałe prace naukowe									
a) recenzowane rozdziały w monografiach	1		2			3			
b) doniesienia z konferencji									
- międzynarodowych	5		15			20			
- krajowych	3		26			29			
c) prace popularnonaukowe	1					1			
Łącznie:	11	2	70	462	24,548	81	464	24,548	

\* ostatnia zaakceptowana do druku publikacja, A13, została ujęta w liczbie publikacji, lecz nie policzono za nią punktów ani IF ze względu na brak DOI na dzień sporządzenia wniosku

#### Informacja o cytowaniach wg Web of Science (stan na dzień: 25.04.2019):

Liczba prac w bazie: 16 publikacji (2 doniesień konferencyjnych nie wzięto pod uwagę)

Liczba cytowań bez autocytowań: 74

Indeks H: 5

Kraków, 25 kwietnia 2019

*Elżbieta Winiarska*