

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

**przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy
oraz osiągnięcie naukowe, zgłaszane jako przedmiot
postępowania habilitacyjnego, a także pozostałe osiągnięcia
naukowe**

Dr Małgorzata Wójcik

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Lublin 2015

Dr Małgorzata Wójcik
Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Biologii i Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
email: mwojcik@umcs.pl
Tel.: 81 5375064

AUTOREFERAT

I. Imię i Nazwisko: Małgorzata Wójcik

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1997 Tytuł magistra biologii, specjalność biologia środowiskowa

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi;
Praca magisterska pt. „Analiza jakościowa i ilościowa endogennych peptydów tiolowych oraz ich pochodnych akumulowanych w siewkach kukurydzy, pszenicy i żyta pod wpływem kadmu”; promotor – dr hab. Anna Tukiendorf

2001 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność fizjologia roślin

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi;
Rozprawa doktorska pt. „Tolerancja na kadm *Arabidopsis thaliana*, *Thlaspi caerulescens* i *Zea mays* oraz ich użyteczność w fitoremediacji”; promotor – dr hab. Anna Tukiendorf

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.10.1997 – 30.04.2002 – asystent - Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Od 01.05.2002 roku do chwili obecnej – adiunkt - Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (od września 2011 roku Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Od czasu zatrudnienia w Zakładzie Fizjologii Roślin UMCS 1 października 1997 r., moje zainteresowania badawcze skupiały się wokół zagadnień związanych z mechanizmami tolerancji roślin wyższych na kadm (Cd). Stanowiły one kontynuację problematyki badawczej, podjętej przeze mnie w pracy magisterskiej pt. „Analiza jakościowa i ilościowa endogennych peptydów tiolowych oraz ich pochodnych akumulowanych w siewkach kukurydzy, pszenicy i żyta pod wpływem kadmu”, wykonanej w tej samej jednostce. Wyniki uzyskane w tej pracy zostały opublikowane w artykule: **Wójcik M., Tukendorf A., 1999. Cd-tolerance of maize, wheat and rye seedlings, Acta Physiol. Plant. 21, 99-107.** Zagadnienia te wpisywały się w wieloletnią problematykę badawczą Zakładu Fizjologii Roślin, która dotyczyła wielu aspektów odpowiedzi roślin wyższych na stres metali ciężkich.

Badania, jakie wykonałam w ramach pracy doktorskiej w latach 1997-2001, dotyczyły oceny tolerancji na Cd trzech gatunków roślin:

- *Arabidopsis thaliana* – roślina o typowym poziomie tolerancji na metale i jednocześnie obiekt modelowy w badaniach biochemii, fizjologii i genetyki roślin,
- *Thlaspi caerulescens* - jedyny zidentyfikowany wówczas hiperakumulator Cd, wykazujący bardzo wysoki poziom tolerancji na metale,
- *Zea mays* – gatunek mało efektywnie gromadzący Cd, lecz ze względu na duży przyrost biomasy i stosunkowo niską wrażliwość na Cd, potencjalnie użyteczny w oczyszczaniu środowisk zanieczyszczonych metalami.

Szczególny nacisk położyłam w tych badaniach na określenie roli fitochelatyn (PC) (adaptacyjnych peptydów tiolowych zaangażowanych w detoksyfikację metali) w tolerancji tych gatunków na Cd. Uzyskane wyniki złożyły się na moją rozprawę doktorską zatytułowaną: „Tolerancja na kadm *Arabidopsis thaliana*, *Thlaspi caerulescens* i *Zea mays* oraz ich użyteczność w fitoremediacji”, którą obroniłam 12.12.2001 roku. Zostały one również opublikowane w następujących artykułach naukowych:

- **Wójcik M., Tukendorf A., 1999. The effect of EDTA on maize seedlings response to Cd-induced stress. Z. Naturforsch. C, 54c, 754-758;**
- **Wójcik M., Tukiendorf A. 2004. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Reg. 44 (1), 71-80;**

- **Wójcik M.**, Vangronsveld J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 53, 151-161;
- **Wójcik M.**, Vangronsveld J., D'Haen J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens* *Environ. Exp. Bot.* 53, 163-171;
- **Wójcik M.**, Tukiendorf A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biol. Plant.* 49 (2), 237-245.

Moje zainteresowania problematyką zanieczyszczenia środowiska i możliwościami wykorzystania roślin w procesach oczyszczania terenów skażonych głównie metalami ciężkimi, zapoczątkowały wyjazdy na staże naukowe do Limburgs Universitair Centrum, Department of Environmental Biology (obecnie Hasselt University, Centrum for Environmental Sciences), Diepenbeek, Belgia (luty 1999, czerwiec 2000, listopad-grudzień 2000). Zaowocowały one przygotowaniem i realizacją 3-letniego międzynarodowego projektu badawczego, w którym byłam głównym wykonawcą (Bilateral Scientific and Technological Cooperation with Flanders, Poland - Flanders project BIL 99/003, „Mechanisms of detoxification and adaptation of the photosynthetic apparatus of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* to Cd and Zn”, 2000-2002) oraz wieloletnią współpracą naukową, trwającą do dnia dzisiejszego. Wynikiem tych zainteresowań był również artykuł przeglądowy: **Wójcik M.** 2000. *Fitoremediacja - sposób oczyszczania środowiska*. *Kosmos* 49, 135-147, a zagadnienia różnorodności mechanizmów tolerancji roślin na metale zostały opisane w artykule przeglądowym, stanowiącym rozdział w monografii zagranicznej: *Siedlecka A., Tukiendorf A., Skórzyńska-Polit E., Maksymiec W., Wójcik M., Baszyński T., Krupa Z.* 2001. *Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae)*. In: *Prasad M.N.V. (Ed.) Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity, Marcel Dekker, Inc., pp. 171-217*. Wyniki badań były również prezentowane na 4 krajowych i 4 międzynarodowych konferencyjnych naukowych. Mechanizmy tolerancji roślin *A. thaliana* na metale ciężkie były przedmiotem badań w ramach projektu badawczego, w którym byłam głównym wykonawcą (Grant KBN, 6 P04C 064 15 „Molekularne mechanizmy oddziaływania metali ciężkich na aparat fotosyntetyczny roślin wyższych – badania modelowe nad wpływem Cd i Cu na *Arabidopsis thaliana* L.”, lata 1998-2001).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, moją główną problematykę badawczą rozszerzyłam o zagadnienia adaptacji roślin do zasiedlania terenów

zanieczyszczonych w ekstremalnie wysokim stopniu metalami ciężkimi, a oprócz Cd, do badań laboratoryjnych włączyłam również cynk (Zn) i ołów (Pb), metale występujące w największych ilościach w składowiskach odpadów pogórnictwa i hutniczych, skąd pozyskiwałam materiał roślinny do badań.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 18 oryginalnych prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie z bazy JCR (łączny IF, zgodny z rokiem opublikowania – **34,396**; IF₂₀₁₄ – **41,091**; sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW - **540**) oraz jeden rozdział w monografii zagranicznej (**7** punktów MNiSW). Ponadto, wyniki badań zostały przedstawione w 53 komunikatach prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz w raporcie końcowym z realizacji projektu badawczego własnego, którego byłam kierownikiem (grant MNiSW nr N N305 185737, lata 2009-2012).

Spośród artykułów naukowych, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, 7 prac eksperymentalnych oraz artykuł przeglądowy, stanowiący rozdział w monografii zagranicznej, weszły w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego

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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Mechanizmy adaptacji wybranych gatunków roślin do wzrostu na hałdach cynkowo-ołowiowych”

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

(Przy każdej pozycji podano Impact Factor zgodnie z rokiem opublikowania oraz za rok 2014, a także punktację MNiSW wg wykazu czasopism z dn. 31.12.2014)

1. **Wójcik M.**, Sugier P., Siebielec G. 2014. Metal accumulation strategies in plants spontaneously inhabiting Zn-Pb waste deposits. *Sci. Tot. Environ.* 487, 313-322
IF₂₀₁₄ **3,163**; MNiSW - **35 pkt**, *autor korespondencyjny*

2. **Wójcik M.**, Dresler S., Jawor E., Kowalczyk K., Tukiendorf A. 2013. Morphological, physiological, and genetic variation between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Dianthus carthusianorum*. *Chemosphere* 90, 1249-1257
IF₂₀₁₃ **3,137**; IF₂₀₁₄ **3,499**; MNiSW - **35 pkt**, *autor korespondencyjny*
3. **Wójcik M.**, Tukiendorf A. 2014. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*. *Phytochemistry* 100, 60-65
IF₂₀₁₄ **3,350**; MNiSW - **35 pkt**, *autor korespondencyjny*
4. Wójcik M., Dresler S., Plak A., Tukiendorf A. 2015a. Naturally evolved enhanced Cd-tolerance of *Dianthus carthusianorum* L. is not related to accumulation of thiol peptides and organic acids. *Environ. Sci. Poll. Res.* (DOI: 10.1007/s11356-014-3963-8) (dostępny online: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3963-8>)
IF₂₀₁₄ **2,757**; MNiSW - **30 pkt**, *autor korespondencyjny*
5. Wójcik M., Dresler S., Tukiendorf A. 2015b. Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit – the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. *Plant Soil* (DOI: 10.1007/s11104-015-2396-6) (dostępny online: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11104-015-2396-6.pdf>)
IF₂₀₁₄ **3,235**; MNiSW - **45 pkt**, *autor korespondencyjny*
6. **Wójcik M.**, Skórzyńska-Polit. E., Tukiendorf A. 2006. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. *Plant Growth Reg.* 48 (2), 145-155
IF₂₀₀₆ **0,903**; IF₂₀₁₄ **1,625**; MNiSW - **30 pkt**
7. **Wójcik M.**, Tukiendorf A. 2011. Glutathione in *Arabidopsis thaliana* adaptation to cadmium stress. *Biol. Plant.* 55 (1), 125-132
IF₂₀₁₁ **1,974**; IF₂₀₁₄ **1,74**; MNiSW - **25 pkt**, *autor korespondencyjny*
8. **Wójcik M.** 2009. Vacuole as a multifunctional compartment in plant responses to stress factors, W: “Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False”, Maksymiec W. (Red.), Transworld Research Network, Kerala, India, 91-123
MNiSW - **7 pkt**, *autor korespondencyjny*

Sumaryczny Impact Factor wymienionych wyżej publikacji, zgodny z rokiem opublikowania wynosi **18,519** (IF₂₀₁₄ **19,369**). Sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi **242**.

Informacje na temat wkładu pracy wszystkich autorów podczas przygotowywania publikacji są zawarte w załączniku nr 5 (Oświadczenia dotyczące indywidualnego wkładu habilitanta w autorstwo prac oraz oświadczenia współautorów publikacji).

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

Wprowadzenie

Podwyższone zawartości metali ciężkich w środowisku występują w wyniku procesów naturalnych (aktywność wulkaniczna, spontaniczne odkrytki na terenach rudonośnych), ale przede wszystkim w wyniku działalności antropogenicznej, a zwłaszcza procesów wydobywania i przetwórstwa rud metali (Kabata-Pendias i Mukherjee 2007). Problem ten jest szczególnie istotny w południowych rejonach naszego kraju, głównie w okolicach Bytomia-Tarnogóry, Olkusza-Siewierska oraz Chrzanowa-Trzebini. Wielowiekowe wydobywanie i przetwórstwo rud cynku i ołowiu na tych terenach przyczyniło się do szczególnie wysokiego, nawet w skali europejskiej, skażenia środowiska związkami Pb, Cd i Zn (Krzaklewski i Pietrzykowski 2002). Charakterystycznym elementem tych środowisk są składowiska odpadów górniczo-hutniczych (ze względu na wysokie stężenia Zn i Pb nazywane **hałdami galmanowymi**), często zdeponowane w sąsiedztwie zabudowań mieszkalnych, ogródków działkowych lub wśród użytków rolnych. Nieustabilizowane i pozbawione okrywy roślinnej składowiska odpadów są źródłem wtórnego zanieczyszczenia otaczających je terenów na skutek migracji metali poprzez erozję wietrzną, zmywy powierzchniowe oraz przesiąkanie wód opadowych przez profil hałdy i przenoszenie zanieczyszczeń do wód gruntowych. Stanowią zatem realne zagrożenie dla zdrowia mieszkańców i funkcjonowania ekosystemów.

Wysokie stężenia metali w podłożu są głównym, ale nie jedynym czynnikiem utrudniającym lub wręcz uniemożliwiającym osiedlanie roślinności na składowiskach odpadów. Panuje tam również silne nasłonecznienie, niska wilgotność, deficyt niezbędnych makro- i mikroelementów, zasolenie, zakwaszenie, nietypowe fizyczne właściwości podłoża, co stwarza ekstremalnie niekorzystne warunki dla rozwoju wegetacji (Wierzbicka i Rostański 2002, Wong 2003). Mimo to, niektóre gatunki roślin, przystosowały się do wzrostu w takich środowiskach na drodze ewolucji i naturalnej selekcji. Są to tzw. **pseudometalofity**, czyli rośliny zdolne do zasiedlania zarówno środowisk zanieczyszczonych jak i

niezanieczyszczonych metalami ciężkimi, w odróżnieniu od **metalofitów**, występujących wyłącznie na terenach wzbogaconych w metale. Rośliny zasiedlające składowiska odpadów metalonośnych tworzą zazwyczaj charakterystyczne zbiorowiska lub grupy roślin, złożone głównie z gatunków siedlisk ubogich i termofilnych, a także ruderalnych, segetalnych i łąkowych, o różnym stopniu tolerancji metali w podłożu (Grodzińska i in. 2000). Dominującymi gatunkami roślin wyższych, uznawanych za metalolubne lub metalotolerancyjne, spontanicznie zasiedlających jedno z najstarszych i najlepiej przebadanych pod względem florystycznym składowisk odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu k. Olkusza, są: *Dianthus carthusianorum*, *Silene vulgaris*, *Armeria maritima*, *Arabidopsis arenosa*, *Galium album*, *Thymus pullegioides* i *Festuca ovina* (Grodzińska i in. 2000, Szarek-Lukaszewska 2009). W przypadku niektórych gatunków, a mianowicie: *D. carthusianorum*, *S. vulgaris*, *A. maritima*, *A. arenosa* i *Biscutella laevigata* stwierdzono wyraźne morfologiczne i fizjologiczne różnice pomiędzy populacjami zasiedlającymi hałdy metalonośne i tereny niezanieczyszczone (Wierzbicka i Rostański 2002, Załęcka i Wierzbicka 2002, Wierzbicka i Słysz 2005, Fiałkiewicz i Rostański 2006, Przedpeńska i Wierzbicka 2007). Rośliny populacji hałdowych cechowała karłowatość i kseromorfizm, redukcja biomasy części nadziemnych w stosunku do korzeni, przyspieszenie stadium rozwoju generatywnego, wytwarzanie większej ilości kwiatów i przedłużenie okresu kwitnienia (tzw. strategia życiowa typu „r”). Większość tych cech, podobnie jak zwiększona tolerancja na Zn czy Pb dodawane do środowiska wzrostu, utrzymywała się przez kolejne 2-3 pokolenia roślin uprawianych w optymalnych, kontrolowanych warunkach. Takie wyniki sugerowały wytworzenie odrębnych ekotypów w obrębie tych gatunków, tzw. **ekotypów galmanowych** (Wierzbicka i Rostański 2002). Jednak jedynie badania genetyczne, z zastosowaniem markerów molekularnych, mogą potwierdzić zasadność wyodrębnienia do rangi ekotypu populacji hałdowych występujących tam gatunków, co wykazano do chwili obecnej w przypadku *A. maritima* (Abratowska i in. 2012), *B. laevigata* (Babst-Kostecka i in. 2014, Wąsowicz i in. 2014), *Viola tricolor* (Słomka i in. 2011) i w przeprowadzonych przeze mnie badaniach *D. carthusianorum* (Wójcik i in. 2013).

Wykształcenie mechanizmów tolerancji w roślinach zasiedlających gleby o naturalnie wysokich zawartościach metali, zachodzi w ciągu 40-150 lat, a nawet 1000 lat (Bone i Farres 2001, Ernst 2006). Jednak na obszarach zanieczyszczonych w ekstremalnym stopniu metalami, np. w rejonach wydobywania i przetwórstwa rud metali, silna presja selekcyjna może doprowadzić do powstania ekotypów tolerancyjnych już w czasie 4-10 lat (Whitting i in. 2004, Ernst 2006). Występowanie ekotypów metalo-tolerancyjnych nie jest cechą

taksonomiczną, obserwuje się duże zróżnicowanie w tolerancji między gatunkami, a nawet populacjami/ekotypami tego samego gatunku, czy nawet osobnikami w obrębie tej samej populacji. Dlatego uważa się, że kolonizowanie przez rośliny terenów w znacznym stopniu zanieczyszczonych metalami jest możliwe przez ewolucję tolerancji zachodzącej *de novo* i *in situ*, a roślinność takich terenów jest znakomitym obiektem do badania mechanizmów tolerancji na metale i ich mikroewolucji oraz poszukiwania ekotypów/form najlepiej przystosowanych do niekorzystnych warunków środowiska, a zatem potencjalnie użytecznych w fitoremediacji czy rekultywacji zdegradowanych terenów.

Adaptacja roślin do wzrostu na podłożach wzbogaconych w metale ciężkie jest możliwa dzięki występowaniu różnorodnych mechanizmów unikania pobierania i translokacji metali w roślinach oraz tolerancji podwyższonych stężeń metali w tkankach.

Ze względu na pobieranie i dystrybucję pobranych metali wyróżnia się 3 grupy roślin: tzw. „**excluders**”, „**indicators**” i „**accumulators**” (Baker 1981). Do pierwszej grupy należą rośliny, które unikają pobierania lub zatrzymują większość pobranego metalu w korzeniach i ograniczają jego translokację do organów nadziemnych (stosunek zawartości metalu w liściach i glebie jest mniejszy od 1). Rośliny wskaźnikowe („**indicators**”) pobierają metale proporcjonalnie do ich zawartości w podłożu i gromadzą je dość równomiernie w tkankach korzeni i części nadziemnych. Natomiast tzw. akumulatory pobierają duże ilości metali z podłoża i transportują je do organów nadziemnych (stosunek zawartości metalu w liściach i glebie jest większy od 1). Bardzo ciekawą grupę roślin wśród akumulatorów (ok. 515 zidentyfikowanych dotąd gatunków) stanowią tzw. hiperakumulatory, które rosnąc w warunkach naturalnych, akumulują ekstremalnie wysokie stężenia metali w organach nadziemnych (ponad 1% Zn lub Mn; 0,1% Ni, Pb, Cu, Co, Cr; 0,01% Cd w suchej masie liści) bez widocznych objawów toksyczności (Baker i Brooks 1989, Capa i Pilon-Smits 2014, Krzciuk i Gałuszka 2014). Poznanie strategii akumulacji metali w roślinach zasiedlających składowiska odpadów jest bardzo istotne ze względów praktycznych - „**excluders**” lub „**accumulators**” mogą być wykorzystane odpowiednio do fitostabilizacji i fitoekstrakcji zanieczyszczonych terenów, natomiast rośliny wskaźnikowe mogą posłużyć jako biogeochemiczne indykatory poziomu zanieczyszczenia środowiska.

Niezależnie jednak od strategii pobierania i sposobu dystrybucji metali, rośliny zasiedlające tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi wykształcają na drodze ewolucji mechanizmy detoksyfikacji, a więc tolerancji nadmiaru metali w tkankach. Do najważniejszych **mechanizmów tolerancji** należy eliminacja wolnych jonów metali z protoplastu poprzez ich wiązanie w ścianie komórkowej, chelatowanie w cytoplazmie oraz

sekwestrację w specyficznych przedziałach komórkowych, głównie w wakuoli (Siedlecka i in. 2001, Wójcik 2009, Maestri i in. 2010; Viehweger 2014). Mechanizmy te wzajemnie uzupełniają się, a znaczenie poszczególnych mechanizmów zależy od gatunku rośliny, jej stadium rozwojowego (wieku), rodzaju i stężenia metalu oraz czasu jego działania. Wśród ligandów cytoplazmatycznych, zaangażowanych w chelatowanie i detoksyfikację metali ciężkich, najważniejszą rolę przypisuje się adaptacyjnym peptydom tiolowym (tzw. γ -Glu-Cys peptydom), glutationowi (GSH), kwasom organicznym, a w mniejszym stopniu aminokwasom (głównie prolinie oraz histydynie) i fitynie (Rauser 1999). Spośród sześciu zidentyfikowanych dotychczas rodzin niskocząsteczkowych γ -Glu-Cys peptydów, najważniejszą rolę w detoksyfikacji metali pełnią **fitochelatyny** (PC), o wzorze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=2\text{-}11$, syntetyzowane enzymatycznie z GSH. Peptydy te kompleksują metale przez grupy tiolowe cysteiny, a następnie uczestniczą w transporcie metali do wakuoli (Yadav 2010). Uważa się, że fitochelatyny pełnią ważną rolę w detoksyfikacji Cd i arsenu (As) w roślinach, jednak ich rola w tolerancji roślin na inne metale, np. Zn czy Pb nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Również **glutation** ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) może uczestniczyć w chelatowaniu metali (Cd, Zn, Pb) w cytoplazmie i transporcie takich kompleksów do wakuoli. Jego rolę w tolerancji na metale sugerują badania ekotypów roślin o podstawowym poziomie tolerancji, np. *A. thaliana* (Wójcik i Tukiendorf 2011, Jozefczak i in. 2014), jednak nie ma jednoznacznych danych odnośnie jego roli w adaptacji roślin do środowisk skażonych metalami. **Kwasy organiczne**, głównie cytrynowy i jabłkowy, stanowią ważne ligandy cytoplazmatyczne i wakuolarne dla Zn, Cd i Ni, pośredniczą również w długodystansowym transporcie metali w roślinach (López-Bucio i in. 2000, Rascio i Navari-Izzo 2011). Wykazano ich konstytutywnie wysoki poziom w roślinach hiperakumulujących te metale, nie znana jest natomiast ich rola w tolerancji na Pb, jak również niejednoznaczne są wyniki badań dotyczących ich zaangażowania w tolerancję Cd i Zn w roślinach z terenów zanieczyszczonych ale nie będących hiperakumulatorami.

Cel badań

Celem niniejszych badań było poznanie mechanizmów adaptacji roślin do środowisk zanieczyszczonych w ekstremalnie wysokim stopniu metalami ciężkimi.

Badaniami objęłam roślinność zasiedlającą w wyniku naturalnej sukcesji trzy składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych zlokalizowane w południowej Polsce, zróżnicowane wiekowo (ok. 30-130 lat) oraz zawierające różne typy odpadów (poflotacyjne z procesów wydobywania rud Zn i Pb oraz żużlowe z procesów hutniczych) (opisane szczegółowo w pracach Wójcik 2012, Wójcik i in. 2014). W szeroko zakrojonych interdyscyplinarnych badaniach, zidentyfikowano gatunki roślin występujące na badanych składowiskach odpadów oraz określono zależności między zawartością i biodostępnością metali w podłożach hałd a akumulacją metali w roślinach. Dokładne badania morfologicznych, genetycznych i fizjologicznych przystosowań do podwyższonej zawartości metali ciężkich w środowisku wzrostu, przeprowadziłam dla wybranego gatunku – *Dianthus carthusianorum* L. (**goździk kartuzek**) (*Caryophyllaceae*). Jest to jeden z dominujących gatunków porastających najstarszą z badanych hałd odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu k. Olkusza, a wcześniejsze doniesienia wskazywały na interesujące przystosowania morfologiczne i anatomiczne roślin populacji hałdowej *D. carthusianorum* do kserotermicznych warunków panujących na hałdzie, co odróżniało populację hałdową od populacji referencyjnych (Załęcka i Wierzbicka 2002). Wyraźne różnice morfologiczne, utrzymujące się przez 3 kolejne pokolenia w uprawach laboratoryjnych, sugerowały wykształcenie odrębnego ekotypu galmanowego (Wierzbicka i Rostański 2002), brak jednak było rzetelnych badań genetycznych, które potwierdziłyby zasadność takiego stwierdzenia. Wstępne badania laboratoryjne wskazywały również na zwiększoną tolerancję populacji hałdowych na Zn i Pb (Załęcka i Wierzbicka 2002, Baranowska-Morek i Wierzbicka 2004). Nie badano jednak wewnątrzkomórkowych mechanizmów leżących u podstaw tej tolerancji, podobnie jak wrażliwości roślin *D. carthusianorum* na Cd czy mechanizmów detoksyfikacji tego pierwiastka, stanowiącego istotną domieszkę rud Zn i Pb.

Interesującym zagadnieniem było również porównanie poziomu oraz mechanizmów tolerancji *D. carthusianorum* z mechanizmami tolerancji występującymi w modelowej roślinie o podstawowym poziomie tolerancji – *Arabidopsis thaliana* oraz w roślinie o bardzo wysokim poziomie tolerancji – *Thlaspi caerulescens*, będącej jednocześnie hiperakumulatorem Zn i Cd, a przy tym gatunkiem modelowym w badaniach hiperakumulacji metali. Ponieważ uważa się, że GSH i PC pełnią ważną rolę w podstawowym poziomie

tolerancji na Cd, celem moich badań było określenie roli GSH w tolerancji kadmu w roślinach *A. thaliana*, uprawianych hydroponicznie w warunkach z indukowanym niedoborem GSH (przez zastosowanie inhibitora syntezy GSH) lub jego nadmiarem (po dodaniu egzogenego GSH do środowiska wzrostu). Ponadto, celem badań było zbadanie roli kwasów organicznych, uważanych za główny mechanizm detoksyfikacji Zn oraz peptydów tiolowych, pełniących główną rolę w detoksyfikacji Cd, w tolerancji tych metali w roślinach *T. caerulescens*, zaadaptowanych do wzrostu na składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych w Plombières (Belgia).

Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

- 1) Zbadanie akumulacji metali ciężkich (głównie Zn, Pb i Cd) w roślinach spontanicznie zasiedlających składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych oraz klasyfikację gatunków roślin w oparciu o strategie pobierania i dystrybucji metali oraz ich użyteczność w fitoremediacji, biomonitoringu i ocenie ryzyka ekologicznego;
- 2) Określenie morfologicznego, fizjologicznego i genetycznego zróżnicowania między populacjami *D. carthusianorum* pochodzącymi z hałdy cynkowo-ołowiowej i z terenów niezanieczyszczonych metalami;
- 3) Porównanie wrażliwości na toksyczność Zn, Pb, Cd roślin *D. carthusianorum* pochodzących z hałdy metalonośnej i z terenów referencyjnych oraz charakterystyka wewnątrzkomórkowych mechanizmów tolerancji metali w roślinach, ze szczególnym uwzględnieniem roli peptydów tiolowych (GSH, PC) oraz kwasów organicznych;
- 4) Porównanie mechanizmów tolerancji na metale roślin *D. carthusianorum* uprawianych w warunkach stresu ostrego (hydroponiki, krótkoterminowa ekspozycja na stosunkowo wysokie, w porównaniu do zazwyczaj spotykanych w środowisku, stężenia Zn, Pb i Cd) oraz stresu chronicznego (uprawa na glebie pochodzącej z hałdy cynkowo-ołowiowej w Bolesławiu, długoterminowa ekspozycja na subletalne, spotykane w środowiskach metalonośnych, stężenia metali);
- 5) Określenie roli peptydów tiolowych w tolerancji na Cd roślin *A. thaliana* (roślina modelowa o podstawowym poziomie tolerancji) oraz roli kwasów organicznych i peptydów tiolowych w tolerancji na Zn i Cd roślin *T. caerulescens* (roślina modelowa - hiperakumulator Zn i Cd).

Wyniki

Ad. 1

Strategie akumulacji metali w roślinach spontanicznie zasiedlających hałdy Zn-Pb oraz ich użyteczność w fitoremediacji, biomonitoringu i ocenie ryzyka ekologicznego

Wyniki badań przedstawiono w pracy: *Wójcik M., Sugier P., Siebielec G. 2014. Metal accumulation strategies in plants spontaneously inhabiting Zn-Pb waste deposits. Sci. Tot. Environ. 487, 313-322*, która powstała w ramach realizacji projektu badawczego MNiSW nr N N305 185737 (lata 2009-2012).

Analizowano całkowite i potencjalnie biodostępne zawartości metali (Zn, Pb, Cd, Cu, Ni, Cr) w podłożach 3 składowisk odpadów cynkowo-ołowiowych oraz akumulację tych metali w organach nadziemnych 38 gatunków roślin spontanicznie zasiedlających badane składowiska.

Wykazano, że zawartość metali w górnych warstwach hałd metalonośnych była bardzo wysoka i silnie zróżnicowana w obrębie danej hałdy oraz między hałdami. Całkowite stężenia Zn wahały się w granicach 7300-171 790 mg kg⁻¹, Pb – 1390-22 265 mg kg⁻¹, a Cd – 66-1464 mg kg⁻¹. Są to wartości przekraczające kilka-kilkaset razy dopuszczalne normy dla terenów przemysłowych (1000 mg kg⁻¹ Zn, 600 mg kg⁻¹ Pb oraz 15 mg kg⁻¹ Cd), ustanowione Rozporządzeniem Ministra Środowiska (2002). Jednak ze względu na lekko zasadowe pH badanych hałd (7,2-7,6), frakcje metali potencjalnie biodostępnych dla roślin (ekstrakcja CaCl₂) były stosunkowo niskie i wynosiły odpowiednio: 0,034-0,11%, 0,005-0,03% i 0,28-0,62% całkowitej puli Zn, Pb i Cd. Stężenia Cu, Ni i Cr w podłożach hałd oraz w roślinach były niskie i podobne jak na terenach niezanieczyszczonych metalami. W większości badanych przypadków nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy zawartością metali (zarówno form całkowitych jak i potencjalnie biodostępnych) w podłożu i w roślinach, co wskazuje na niewielką użyteczność analizy zawartości metali w silnie zanieczyszczonych glebach do oceny ich potencjalnej toksyczności.

Zawartość metali w nadziemnych częściach roślin była bardzo zróżnicowana, zarówno pomiędzy gatunkami, jak również pomiędzy osobnikami danego gatunku. Spośród 38 przebadanych gatunków roślin, 33 akumulowały w częściach nadziemnych podwyższone stężenia Zn, 15 - podwyższone stężenia Cd, a 6 - podwyższone stężenia Pb (podwyższone, tzn. uznawane za nadmierne lub toksyczne dla większości roślin, tj. mieszczące się w zakresie lub wyższe niż 100-400 mg Zn, 30-300 mg Pb lub 5-30 mg Cd kg⁻¹ suchej masy materiału roślinnego, wg Kabata-Pendias i Mukherjee 2007). Zawartość metali stwierdzana w roślinach

nie była jednak ekstremalnie wysoka, zatem rośliny te nie stanowią istotnego ryzyka przenikania metali do łańcucha troficznego.

W większości badanych przypadków (68%), średnie stężenie metali w częściach nadziemnych nie różniło się istotnie między roślinami tego samego gatunku występującymi na trzech badanych hałdach, mimo istotnych różnic w zawartości metali w ich podłożach (brak istotnych korelacji między zawartością metali w roślinie i glebie). Wskazuje to na niewielką użyteczność poszczególnych gatunków roślin w biomonitoringu zanieczyszczenia środowiska na podstawie analizy ich składu pierwiastkowego. Natomiast analiza zawartości metali w zbiorowiskach roślinnych poszczególnych hałd (średnie stężenie metali w organach nadziemnych wszystkich roślin analizowanych na danym terenie), bardzo dobrze odzwierciedlała zawartość metali w podłożu, niezależnie od wieku i rodzaju odpadu, dlatego może być wykorzystywana do oceny stanu zanieczyszczenia środowiska metalami i oceny ryzyka ekologicznego.

Współczynniki bioakumulacji metali w roślinach, w odniesieniu do całkowitej puli metali w glebie, były bardzo niskie. Wahały się one w granicach 0,002-0,013 dla Zn; 0,002-0,075 dla Cd, a dla Pb przeważnie nie przekraczały wartości 0,002. W połączeniu z brakiem lub niskimi współczynnikami korelacji zawartości metali w roślinach i w podłożu, świadczy to o wykształceniu strategii unikania pobierania i/lub translokacji metali z korzeni do części nadziemnych we wszystkich badanych roślinach zasiedlających składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych. Określenie współczynników bioakumulacji metali w roślinach, w odniesieniu do potencjalnie biodostępnej puli metali w glebie (ekstrahowanej CaCl₂), dało odmienne wyniki – w większości przypadków współczynniki te były większe od jedności, a nawet dochodziły do 144 (w przypadku bioakumulacji Zn przez *Solidago gigantea* i *Echium vulgare*), 154 (akumulacja Cd przez *Hieracium piloselloides*) czy 505 (współczynnik bioakumulacji Pb w *E. vulgare*). Jednak ten ostatni parametr nie powinien być brany pod uwagę w ocenie możliwości bioakumulacji metali w roślinie, wskazuje on jedynie na poziom tolerancji danej rośliny/gatunku na toksyczność metali. W przypadku braku objawów fitotoksyczności przy współczynniku bioakumulacji większym od jedności, można mówić o wysokiej tolerancji rośliny na dany metal (Abreu i in. 2008). Zatem, większość roślin zasiedlających w wyniku naturalnej sukcesji hałdy cynkowo-ołowiowe, wykształciła w toku mikroewolucji wysoką tolerancję na toksyczne stężenia metali obecne w środowisku.

Ze względu na stosunkowo niską zawartość metali w częściach nadziemnych roślin, niewielką produkcję biomasy oraz niskie współczynniki bioakumulacji i korelacji, żaden gatunek roślinny występujący na składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych nie może

być wykorzystany/użyteczny w procesie fitoekstrakcji. Jednak wymienione powyżej cechy roślin są pożądane w przypadku fitostabilizacji, dlatego gatunki charakteryzujące się najniższą akumulacją metali w częściach nadziemnych i dodatkowo tworzące zwartą pokrywę roślinną, np. *Calamagrostis epigejos*, *Carex hirta*, *Thymus pulegioides* czy *Dianthus carthusianorum*, mogą być potencjalnie użyteczne do rekultywacji (fitostabilizacji) obszarów zanieczyszczonych metalami.

Ad. 2

Morfologiczne, fizjologiczne i genetyczne zróżnicowanie między populacjami *D. carthusianorum* pochodzącymi z hałdy Zn-Pb i z gleb niezanieczyszczonych metalami

Wyniki badań przedstawiono w pracy: *Wójcik M., Dresler S., Jawor E., Kowalczyk K., Tukiendorf A. 2013. Morphological, physiological, and genetic variation between metallicolous and nonmetallicolous populations of Dianthus carthusianorum. Chemosphere 90, 1249-1257.*

Analizowano cechy morfologiczne (wygląd i wielkość organów nadziemnych oraz parametry morfometryczne liści i łodygi kwiatonośnej), fizjologiczne (zawartość chlorofilu, karotenoidów, antocyjanów, proliny) i markery genetyczne (RAPD – random amplified polymorphic DNA, ISSR – inter simple sequence repeat) w dwóch populacjach roślin *D. carthusianorum* - pochodzącej z hałdy cynkowo-ołowiowej w Bolesławiu oraz z gleby niezanieczyszczonej metalami w Pliszczynie k. Lublina. Parametry morfologiczne i fizjologiczne były oznaczane w roślinach występujących w ich naturalnych środowiskach, jak również w pierwszym pokoleniu tych roślin uprawianych na glebie ogrodniczej w jednakowych kontrolowanych warunkach. Takie badania miały wykazać, czy obserwowane różnice morfologiczne są wynikiem jedynie przystosowania do niekorzystnych warunków środowiska, czy jednak utrzymują się w kolejnym pokoleniu niezależnie od warunków wzrostu.

Wykazano, że rośliny zasiedlające hałdę były mniejsze od roślin z terenów referencyjnych, miały mniej liści w rozecie, ich liście były węższe i krótsze, a pędy kwiatowe znacznie krótsze; większość tych różnic była zachowana w roślinach pierwszego pokolenia, uprawianych w optymalnych jednakowych warunkach wzrostu. Parametry fizjologiczne nie wykazywały zróżnicowania między badanymi populacjami, nie zmieniały się również istotnie w zależności od warunków wzrostu, nie mogą być zatem uważane ani za markery specyficzne dla populacji, ani za wskaźniki abiotycznego stresu środowiskowego. Analiza markerów molekularnych wykazała istotne zróżnicowanie genotypowe między hałdową i referencyjną

populacją *D. carthusianorum*, co jednoznacznie potwierdziło wcześniejsze sugestie odnośnie wytworzenia odrębnego ekotypu, nazwanego ekotypem galmanowym. Wyniki analizy wariancji (AMOVA) wskazały jednak, że tylko 24% całkowitej wariancji określało zróżnicowanie między populacjami, a większość całkowitej wariancji (76%) była zlokalizowana wewnątrz poszczególnych populacji. Uważa się, że adaptacja roślin do ekstremalnie niekorzystnych warunków środowiska wiąże się z obniżeniem poziomu zmienności genetycznej wśród osobników kolonizujących daną niszę środowiskową, ze względu na silną selekcję genotypów najlepiej przystosowanych i eliminację alleli rzadziej występujących w populacji i nieistotnych z punktu widzenia przetrwania (tzw. „efekt szyjki butelki”, ang. bottleneck effect) (Deng i in. 2007). Uzyskane wyniki nie potwierdzają jednak powyższej prawidłowości, ponieważ obie populacje charakteryzowała podobna wartość wskaźnika H_j , określającego wewnątrzpopulacyjną zmienność genetyczną.

Ad. 3

Porównanie wrażliwości na toksyczność Zn, Pb i Cd roślin *D. carthusianorum* pochodzących z hałdy metalonośnej i z terenów referencyjnych oraz charakterystyka wewnątrzkomórkowych mechanizmów tolerancji metali

Wyniki badań przedstawiono w 3 pracach eksperymentalnych:

- Wójcik M., Tukiendorf A. 2014. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*. *Phytochemistry* 100, 60-65;

- Wójcik M., Dresler S., Plak A., Tukiendorf A. 2015a. Naturally evolved enhanced Cd-tolerance of *Dianthus carthusianorum* L. is not related to accumulation of thiol peptides and organic acids. *Environ. Sci. Poll. Res.* (DOI: 10.1007/s11356-014-3963-8);

- Wójcik M., Dresler S., Tukiendorf A. 2015b. Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit – the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. *Plant Soil* (DOI: 10.1007/s11104-015-2396-6)

Rośliny ekotypu hałdowego oraz referencyjnego *D. carthusianorum*, wyhodowane z nasion pozyskiwanych z roślin rosnących w ich naturalnych stanowiskach, uprawiano hydroponicznie w kontrolowanych warunkach fotoperiodu i temperatury, na pożywce kontrolnej oraz z dodatkiem różnych stężeń Zn (250, 500, 1000 μM), Pb (15, 30 μM) lub Cd (5, 15, 50 μM). Stosowane stężenia metali zostały dobrane na podstawie doświadczeń wstępnych oraz danych literaturowych, wskazujących potencjalną dostępność metali w podłożu hałdy odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu (Godzik 1993). Analizowano parametry wzrostu roślin (elongację korzeni, świeżą masę korzeni i części nadziemnych,

żywołność korzeni), stężenia metali w tkankach roślin oraz akumulację peptydów tiolowych (GSH, PC) i kwasów organicznych (jabłkowego i cytrynowego) w korzeniach i liściach.

Na podstawie analizy parametrów wzrostu stwierdzono, że rośliny pochodzące z hałd odpadów cynkowo-ołowiowych wykazywały mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie wszystkich badanych metali w porównaniu z roślinami referencyjnymi. Najniższe stężenia metali całkowicie hamujące elongację korzeni (tzw. wskaźnik EC100 – ang. effect of concentration) wynosiły odpowiednio dla roślin hałdowych i referencyjnych: 3750 i 2000 μM Zn, 850 i 600 μM Pb oraz 800 i 450 μM Cd. Również przyrosty świeżej masy korzeni i liści oraz żywołność korzeni (a w przypadku Cd również liści) były mniej obniżone w roślinach hałdowych ekspozowanych na Zn, Pb i Cd, szczególnie ich najwyższe stężenia, niż w roślinach referencyjnych. Jednocześnie, rośliny pochodzące z terenów metalonośnych akumulowały blisko dwukrotnie wyższe stężenia Pb, Zn i zbliżone stężenia Cd (zarówno w korzeniach jak i liściach) w porównaniu do roślin pochodzących z gleb niezanieczyszczonych. We wszystkich jednak przypadkach, korzenie akumulowały znacznie wyższe stężenia metali niż organy nadziemne, a współczynnik translokacji metali z korzeni do liści był podobny w roślinach obu ekotypów. Mniej nasilone objawy toksyczności, mimo wyższej (Zn i Pb) lub takiej samej (Cd) zawartości metali w tkankach roślin hałdowych, wskazują na ich większą tolerancję na metale, a zatem na sprawniej działające mechanizmy detoksyfikacji metali, utrwalone genetycznie w wyniku mikroewolucji.

Stężenie GSH w korzeniach roślin kontrolnych (nie traktowanych metalami) było wyższe w ekotypie hałdowym, jednak w liściach nie stwierdzono różnic między ekotypami. Podanie metali (Zn, Pb, Cd) do środowiska wzrostu w większości przypadków nie zmieniło stężenia GSH po 14 dniowej ekspozycji, ponadto akumulacja GSH była zbliżona (brak statystycznie istotnych różnic) w obu ekotypach, zarówno w ich korzeniach jak i częściach nadziemnych. Nie stwierdzono indukcji syntezy PC pod wpływem Zn, nie są one zatem zaangażowane w detoksyfikację tego metalu w roślinach. Kadm indukował, rosnącą wraz ze wzrostem stężenia metalu w pożywce, syntezę PC w korzeniach i liściach, natomiast Pb tylko w korzeniach roślin *D. carthusianorum*. W obu przypadkach jednak, akumulacja tych peptydów była wyższa w roślinach pochodzących z terenów niezanieczyszczonych, co wskazuje, że nie pełnią one istotnej roli we wzmożonej tolerancji na Cd i Pb obserwowanej w roślinach hałdowych.

Rośliny hałdowe uprawiane w warunkach kontrolnych, miały konstytutywnie wyższy poziom akumulacji kwasów organicznych (jabłkowego i cytrynowego) w częściach nadziemnych, w korzeniach kwasy te występowały na tym samym poziomie w obu

ekotypach. Akumulacja kwasów organicznych właściwie nie zmieniała się w roślinach traktowanych rosnącymi stężeniami Zn, Pb i Cd, mimo istotnego wzrostu stężenia tych metali w tkankach roślin. Poziom akumulacji kwasów był zbliżony w obu ekotypach, jedynie w organach nadziemnych roślin traktowanych Pb, wyższe stężenia kwasów organicznych wciąż stwierdzano w ekotypie hałdowym. Wyniki tych badań wskazują, że kwasy organiczne nie pełnią ważnej funkcji w detoksyfikacji metali w badanych roślinach, jak również nie są odpowiedzialne za utrwaloną genetycznie wysoką tolerancję roślin hałdowych, zwłaszcza w odniesieniu do Zn i Cd.

Ad. 4

Mechanizmy tolerancji na metale roślin *D. carthusianorum* uprawianych w warunkach stresu ostrego oraz stresu chronicznego

Wyniki badań przedstawiono głównie w pracy: *Wójcik M., Dresler S., Tukiendorf A. 2015b. Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit – the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. Plant Soil (DOI: 10.1007/s11104-015-2396-6) oraz w pracach: *Wójcik i Tukiendorf (2014), Wójcik i in. (2015a) wymienionych w punkcie 3.**

Rośliny ekotypu hałdowego oraz referencyjnego *D. carthusianorum* uprawiano przez 5 tygodni w warunkach kontrolowanych, na glebach pozyskanych ze stanowisk naturalnego występowania tych ekotypów (niezanieczyszczonej z Pliszczyna oraz zanieczyszczonej metalami z hałdy w Bolesławiu). Analizowano ogólny wygląd oraz biomasę części nadziemnych, stężenia metali (Zn, Pb, Cd) oraz akumulację peptydów tiolowych (GSH, PC) i kwasów organicznych (jabłkowego i cytrynowego) w liściach. Wyniki tych analiz porównano z wynikami uzyskanymi w badaniach roślin uprawianych hydroponicznie w obecności Zn, Pb lub Cd.

Rośliny rosnące na terenach zanieczyszczonych metalami, są narażone na tzw. **stres chroniczny**, definiowany jako długoterminowa (trwająca przez okres kilku tygodni-miesięcy lub całej ontogenezy) ekspozycja na stosunkowo niskie (subletalne) stężenia metali. Biorąc pod uwagę bardzo niską biodostępność metali w podłożu składowisk odpadów cynkowo-ołowiowych, uważa się, że taki rodzaj stresu występuje również na hałdach metalonośnych. Natomiast **stres ostry** występuje wówczas, gdy rośliny są poddawane działaniu wysokich, tzn. rzadko spotykanych lub niespotykanych w warunkach naturalnych, stężeń metali przez stosunkowo krótki okres (kilka-kilkanaście dni), jak to ma miejsce w uprawach hydroponicznych. Badania roślin uprawianych hydroponicznie, w kontrolowanych warunkach

rodzaju i natężenia czynnika stresowego, są niezwykle istotne ze względu na możliwość poznania molekularnych mechanizmów tolerancji na poszczególne metale i szybkiej selekcji gatunków/ekotypów/populacji tolerancyjnych. Ich wyniki nie mogą być jednak bezpośrednio odnoszone do roślin występujących na zanieczyszczonych terenach, gdzie działa zazwyczaj kilka czynników stresowych, np. obecność podwyższonego stężenia kilku metali w glebie. Dlatego, aby w pełni zrozumieć mechanizmy adaptacji roślin do środowisk skażonych metalami, ważne jest, aby prowadzić badania na roślinach w ich naturalnych środowiskach, lub w warunkach imitujących w pewnym stopniu takie warunki (np. uprawy na glebach pozyskiwanych z zanieczyszczonych terenów).

Wzrost zarówno roślin referencyjnych, jak i hałdowych był silnie zahamowany na glebie zanieczyszczonej metalami, w porównaniu do roślin tych ekotypów uprawianych na glebie niezanieczyszczonej. Wykazano, że rośliny ekotypu referencyjnego, uprawiane na glebie zanieczyszczonej metalami, wykazywały większe objawy toksyczności metali (takie jak chloroza i nekroza liści) niż rośliny hałdowe. Jednocześnie stwierdzono, że rośliny te akumulowały blisko dwukrotnie wyższe stężenia Zn, Pb i Cd w liściach oraz nieco wyższe stężenia GSH, ale zawartość kwasów organicznych była niższa w porównaniu do roślin hałdowych uprawianych w tych samych warunkach. Nie stwierdzono akumulacji PC w roślinach obu ekotypów uprawianych na zanieczyszczonej bądź niezanieczyszczonej glebie.

Zarówno doświadczenia glebowe, jak i hydroponicznie jednoznacznie wykazały większą tolerancję na metale roślin pochodzących z hałdy galmanowej, co dowodzi, że tolerancja ta rozwinęła się w wyniku wieloletniej adaptacji do wysokich zawartości metali w podłożu i jest utrwalona genetycznie - tzw. **tolerancja adaptacyjna**. Ciekawym jest jednak fakt, że w roślinach referencyjnych, nasilone objawy toksyczności metali obserwowano dopiero po 3 tygodniach wzrostu na zanieczyszczonej glebie, a w uprawach hydroponicznych, dopiero najwyższe lub umiarkowanie wysokie stężenia metali indukowały istotne obniżenie parametrów wzrostu w porównaniu do roślin hałdowych. Wskazuje to na konstytutywnie wysoki poziom tolerancji w tych roślinach - tzw. **tolerancję konstytutywną**. Tolerancja konstytutywna, występująca we wszystkich populacjach danego gatunku, niezależnie od obecności czynnika stresowego w ich środowisku wzrostu, była do tej pory opisana w niewielu gatunkach roślin i wskazuje na wysoki potencjał danego gatunku do zasiedlania obszarów o bardzo niekorzystnych warunkach dla rozwoju wegetacji.

Uzyskane wyniki wykazały również, że mechanizmy tolerancji w roślinach *D. carthusianorum* eksponowanych na stres chroniczny i ostry są różne. W warunkach stresu chronicznego, zwiększona tolerancja roślin hałdowych na metale (tolerancja adaptacyjna)

była uwarunkowana ograniczeniem pobierania metali z podłoża i/lub ich translokacji do organów nadziemnych, gdzie ważną rolę w detoksyfikacji metali odgrywała prawdopodobnie podwyższona zawartość kwasów organicznych. W roślinach pochodzących z terenów niezanieczyszczonych, bariery/mechanizmy ograniczające pobieranie i translokację metali nie były tak efektywne, co skutkowało większą akumulacją metali w liściach i nasilonymi objawami toksyczności. W przeciwieństwie do stresu chronicznego, w warunkach stresu ostrego, rośliny hałdowe pobierały i transportowały do liści większe ilości metali niż rośliny referencyjne, mimo to wciąż wykazywały mniejszą wrażliwość na toksyczność metali, a ich większa tolerancja nie wynikała z podwyższonej akumulacji kwasów organicznych.

Akumulacja peptydów tiolowych, a zwłaszcza PC, odgrywała rolę w detoksyfikacji Cd i w mniejszym stopniu Pb jedynie w warunkach stresu ostrego, kiedy występowała konieczność szybkiej eliminacji z protoplastu wnikających tam dużych ilości jonów metali z pożywki. Mechanizm ten miał większe znaczenie w roślinach ekotypu referencyjnego (wyższa akumulacja PC, znacznie nasilone objawy toksyczności Cd w warunkach deficytu PC po zastosowaniu inhibitora ich syntezy), co potwierdza wcześniejsze doniesienia (Wójcik i Tukiendorf 2011) o ważnej roli PC jedynie w podstawowym poziomie tolerancji. Brak akumulacji PC w roślinach w warunkach stresu chronicznego (uprawianych w warunkach laboratoryjnych na zanieczyszczonej glebie – Wójcik i in. 2015b oraz w osobnikach pozyskiwanych ze stanowisk na hałdzie w Bolesławiu – Wójcik 2012) wskazuje, że PC nie są zaangażowane w adaptację roślin do wzrostu w środowiskach zanieczyszczonych metalami (nie odgrywają istotnej roli w tolerancji adaptacyjnej).

Ad. 5

Określenie roli peptydów tiolowych w tolerancji na Cd roślin *Arabidopsis thaliana* oraz roli kwasów organicznych i peptydów tiolowych w tolerancji na Zn i Cd roślin *Thlaspi caerulescens*

Wyniki badań przedstawiono w 2 pracach eksperymentalnych:

- **Wójcik M., Tukiendorf A. 2011. *Glutathione in Arabidopsis thaliana adaptation to cadmium stress. Biol. Plant. 55 (1), 125-132.***

- **Wójcik M., Skórzyńska-Polit. E., Tukiendorf A. 2006. *Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in Thlaspi caerulescens under Zn and Cd stress. Plant Growth Reg. 48 (2), 145-155.***

Rośliny *A. thaliana* (typ dziki, odm. Columbia, roślina modelowa o podstawowym poziomie tolerancji) uprawiano hydroponicznie na pożywce kontrolnej lub w obecności Cd

oraz z dodatkiem BSO (butionina sulfoksyminy, inhibitor syntezy GSH – aby obniżyć poziom GSH w roślinach) lub egzogenne GSH (aby podnieść poziom GSH w roślinach).

Dodatek BSO do pożywki roślin kontrolnych (nie traktowanych Cd) nie wpływał na wzrost roślin, podczas gdy egzogenne GSH powodował obniżenie biomasy korzeni. Wykazano, że obecność BSO zwiększała fitotoksyczność Cd, prawdopodobnie wskutek redukcji akumulacji GSH i syntezy PC (o ponad 96%). Wskazuje to na ważną rolę tych peptydów w detoksyfikacji Cd u *A. thaliana* i w podstawowym poziomie tolerancji na Cd, jaki występuje również w referencyjnym ekotypie *D. carthusianorum*. Jednak, indukowane obecnością egzogenne GSH zwiększenie (2,7-krotne) stężenia GSH i PC w roślinach, nie tylko nie obniżyło toksyczności Cd, lecz nawet nasiliło jej objawy, prawdopodobnie na skutek zaburzenia równowagi redox i wywołanego tym stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki sugerują, że poziom GSH naturalnie występujący w tkankach *A. thaliana* jest wystarczający do zapewnienia optymalnego poziomu tolerancji na Cd. Zmiany tego poziomu (deficyt albo nadwyżka GSH w roślinach) prowadzą do zaburzenia metabolizmu i zwiększenia wrażliwości na Cd.

Rośliny *T. caerulescens* (populacja z Plombières, Belgia, hiperakumulator Zn i Cd, roślina modelowa w badaniu hiperakumulacji i wysokiej tolerancji na metale) uprawiano hydroponicznie na pożywce kontrolnej lub w obecności Cd lub nadmiaru Zn.

Obecność Cd wpływała toksycznie na wzrost roślin, natomiast obecność Zn miała korzystny wpływ na przyrost biomasy roślin *T. caerulescens*. Rosnące stężenia Zn w środowisku wzrostu i w tkankach stymulowały wzmożoną akumulację kwasu jabłkowego i cytrynowego w liściach, nie indukowały natomiast syntezy PC. W przypadku Cd stwierdzono podwyższoną akumulację jabłczanu w liściach oraz rosnącą, zależnie od stężenia metalu, akumulację PC, która jednak malała w miarę przedłużania ekspozycji roślin na Cd, zwłaszcza w liściach. *Thlaspi caerulescens* jest rośliną o zwiększonym zapotrzebowaniu na Zn i o bardzo wysokiej tolerancji na Zn w porównaniu do innych roślin, dlatego nawet duży nadmiar Zn w tkankach nie powodował objawów toksyczności, co było prawdopodobnie związane ze zwiększoną syntezą kwasów organicznych, zaangażowanych w detoksyfikację nadmiaru metalu. Na rolę kwasów organicznych w adaptacji do wzrostu w obecności wysokich zawartości metali w podłożu wskazują również wyniki badań roślin *Thlaspi caerulescens* z ich naturalnych stanowisk w Plombières w Belgii, które akumulowały ponad 2 razy więcej jabłczanu i cytrynianu w liściach, w porównaniu do roślin blisko spokrewnionego gatunku *Thlaspi arvense* z terenów niezanieczyszczonych (artykuł w przygotowaniu do druku).

Zwiększona synteza PC w pierwszych dniach po podaniu Cd do środowiska wzrostu wskazuje na ich rolę w detoksyfikacji Cd jako pierwotnej reakcji obronnej. Jednak w miarę wydłużania czasu działania metalu i postępującego wzrostu poziomu Cd w tkankach, zostały uruchamiane inne i bardziej skuteczne mechanizmy detoksyfikacji Cd, co doprowadziło do eliminacji wolnych jonów metalu z cytoplazmy i zahamowania syntezy PC. Zatem peptydy te nie są odpowiedzialne za wzmożoną tolerancję *T. caerulea* ani na Zn, ani na Cd. Nie pełnią one również roli w adaptacji *T. caerulea* do wzrostu na terenach silnie zanieczyszczonych metalami, co potwierdziły badania roślin ze stanowisk naturalnych (artykuł w przygotowaniu do druku).

Wielofunkcyjna rola wakuoli w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe

W pracy przeglądowej Wójcik M. 2009. Vacuole as a multifunctional compartment in plant responses to stress factors, W: "Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False", Maksymiec W. (Red.), Transworld Research Network, Kerala, India, 91-123 zebrano i podsumowano stan wiedzy odnośnie specyficznych i wspólnych mechanizmów obronnych roślin w warunkach różnych stresów środowiskowych, takich jak: uszkodzenia przez zwierzęta roślinożerne, atak patogenów, stres solny, ksenobiotyki, promieniowanie UV, nadmiar światła i ozonu, a także metale ciężkie.

Wakuola może zajmować 80-90% objętości dojrzałej komórki roślinnej, co sprawia, że jest ona głównym przedziałem magazynującym różnorodne substancje (jony nieorganiczne, produkty metabolizmu pierwotnego i wtórnego, niektóre enzymy), które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki w warunkach normalnych i w sytuacjach stresowych. W wakuoli są również odkładane substancje toksyczne pobrane z otoczenia (nadmiar soli, ksenobiotyki i ich metabolity, metale ciężkie). W funkcjach tych istotną rolę pełnią białkowe transportery (kanały, przenośniki, pompy) zlokalizowane w błonie wakuolarnej – tonoplaście, które pośredniczą w odkładaniu substancji w wakuoli lub ich uwalnianiu z wakuoli do cytoplazmy.

Zarówno nadmiar metali niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin (mikroelementy: Fe, Zn, Mn, Cu, Co), jak i już niewielkie stężenia metali nie pełniących żadnych funkcji w metabolizmie roślin (Cd, Pb, Hg), powodują poważne zakłócenia procesów metabolicznych. Toksyczność metali wynika głównie z ich wiązania z grupami funkcyjnymi białek strukturalnych i enzymatycznych (-SH, -COOH), zastępowania innych niezbędnych metali w centrach katalitycznych enzymów i generowania reaktywnych form tlenu. Dlatego niezwykle istotne dla rośliny jest wyeliminowanie wolnych jonów metali z

cytoplazmy, co odbywa się poprzez ich wiązanie z różnymi ligandami w cytoplazmie a następnie transport takich kompleksów, jak również wolnych jonów do wakuoli. Zidentyfikowano szereg transporterów uczestniczących w przenoszeniu do wnętrza wakuoli wolnych jonów metali (np. CAX2 - $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ antyporter, MTP – Zn, Cd, Ni, Co, Mn), kompleksów metali z ligandami (np. AtMRP3 - dla kompleksów Cd z GSH i PC, ZIF1 – dla kompleksów Zn prawdopodobnie z kw. organicznymi), jak również wolnych ligandów (np. specyficzny anionowy kanał dla jabłczanu, AtDT – jabłczan). W kwaśnym pH wakuoli, metale tworzą trwałe kompleksy z fitochelatynami (tzw. HMW – ang. high molecular weight complex - Cd), kwasami organicznymi (gł. cytrynowym i jabłkowym – Zn, Ni, Cd), fityną (Zn, Cd), nikotianaminą (Fe) czy ferrytyną (Fe, Cd, Cu, Zn). Nie zawsze wakuola jest docelowym miejscem odkładania metali. W przypadku zapotrzebowania na mikroelementy, takie jak: Fe, Mn, czy Zn, mogą one być przenoszone z powrotem do cytoplazmy, np. poprzez funkcjonowanie przenośnika AtNRAMP3, który może również pośredniczyć w transporcie jonów Cd z wakuoli.

Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

- Adaptacja roślin, spontanicznie kolonizujących składowiska odpadów z wydobycia i przetwórstwa rud Zn i Pb, do wzrostu w środowiskach zawierających ekstremalnie wysokie stężenia Zn, Pb i Cd, wynika z wykształcenia w nich strategii unikania pobierania i/lub translokacji metali do części nadziemnych („metal excluders”). Świadczą o tym bardzo niskie współczynniki bioakumulacji metali w roślinach oraz brak istotnych korelacji między zawartością metali w roślinach i glebie.
- Stosunkowo niewielkie ilości metali, akumulowane w organach nadziemnych roślin zasiedlających hałdy metalonośne wskazują, że rośliny te nie stanowią istotnego źródła przenikania metali do łańcucha pokarmowego, dlatego mogą być użyteczne w rekultywacji terenów zdegradowanych w wyniku działalności górniczo-hutniczej.
- Analiza całkowitej bądź ekstrahowalnej puli metalu w podłożu nie odzwierciedla biodostępności tego metalu dla roślin i może mieć tylko drugorzędne znaczenie w ocenie ryzyka ekologicznego. Dużo bardziej miarodajne jest określenie stężenia metali w organach nadziemnych roślin tworzących zbiorowiska na danym terenie.
- Żaden z gatunków, zidentyfikowanych na składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych, nie wykazywał cech użytecznych w fitoekstrakcji. Natomiast kilka gatunków roślin, charakteryzujących się niską bioakumulacją metali i tworzących zwarta pokrywą roślinną,

może mieć znaczenie dla fitostabilizacji terenów zanieczyszczonych w ekstremalnie wysokim stopniu metalami, w tym składowisk odpadów górnico-hutniczych, niezależnie od rodzaju czy wieku odpadu.

- Rośliny *Dianthus carthusianorum* wykazywały genetycznie utrwalone morfologiczne przystosowania do wzrostu na hałdzie odpadów cynkowo-ołowiowych, wyraźnie odróżniające je od roślin z terenów niezanieczyszczonych metalami. Analiza zróżnicowania genetycznego między populacjami potwierdziła wykształcenie odrębnego ekotypu roślin hałdowych, nazwanego ekotypem galmanowym.

- Zmienność genetyczna wśród osobników hałdowej i referencyjnej populacji *D. carthusianorum* była na podobnym poziomie, co wyklucza wystąpienie zjawiska „bottleneck effect”, czyli ograniczenia różnorodności genetycznej podczas adaptacji do skrajnie niekorzystnych warunków wzrostu na hałdzie.

- Rośliny hałdowe *D. carthusianorum* wykazywały większą niż rośliny populacji referencyjnej tolerancję na obecność toksycznych stężeń Zn, Pb i Cd w kulturach hydroponicznych i w glebie. Wskazuje to na wykształcenie utrwalonych genetycznie przystosowań do wzrostu w środowiskach zanieczyszczonych metalami (tolerancja adaptacyjna). Wysoki poziom tolerancji konstytutywnej, stwierdzony w tym gatunku, a zwłaszcza wysoka tolerancja adaptacyjna ekotypu galmanowego, czyni go potencjalnie użytecznym w rekultywacji terenów zanieczyszczonych metami.

- Doświadczenia hydroponiczne wykazały, że ani fitochelatyny, ani kwasy organiczne nie są odpowiedzialne za zwiększoną tolerancję na Zn, Pb i Cd roślin hałdowych, zaadaptowanych do podwyższonych zawartości metali w środowisku wzrostu.

- Fitochelatyony pełnią rolę w detoksyfikacji Cd i tolerancji na Cd w roślinach o podstawowym poziomie tolerancji (*A. thaliana*, *D. carthusianorum* ekotyp z terenów niezanieczyszczonych). W roślinach zaadoptowanych do wzrostu na podłożach zawierających wysokie stężenia metali (*T. caerulea*, *D. carthusianorum* ekotyp galmanowy), inne mechanizmy odpowiadają za ich zwiększoną tolerancję na ten cytotoksyczny pierwiastek.

- Wysoki poziom kwasów organicznych w roślinach *T. caerulea* zasiedlających tereny metalonośne oraz w roślinach *D. carthusianorum* uprawianych na glebie hałdowej wskazuje na ich udział w adaptacji do wysokich stężeń metali w podłożu w warunkach stresu chronicznego.

- Badania mechanizmów tolerancji w roślinach uprawianych w warunkach stresu ostrego i chronicznego dają odmienne wyniki, dlatego, aby w pełni poznać i zrozumieć mechanizmy

adaptacji roślin to podwyższonych stężeń metali w środowisku, niezbędne jest prowadzenie badań na roślinach w ich naturalnych stanowiskach (*in situ*).

Literatura

- Aburatowska A., Wasowicz P., Bednarek P., Telka J., Wierzbicka M. 2012. Morphological and genetic distinctiveness of the metallicolous and non-metallicolous populations of *Armeria maritime* s.l. (*Plumbaginaceae*) in Poland. *Plant Biol.* 14:586–95.
- Abreu M.M., Tavres M.T., Batista M.J. 2008. Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: São Domingos, Portugal. *J. Geochem. Explor.* 96:210-222.
- Babst-Kostecka A.A., Parisod C., Godé C., Vollenweider P., Pauwels M. 2014. Patterns of genetic divergence among populations of the pseudometallophyte *Biscutella laevigata* from southern Poland. *Plant Soil* 383:245-256.
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643-654.
- Baker A.J.M., Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1:81-126.
- Baranowska-Morek A., Wierzbicka M., 2004. Localization of lead in root tip of *Dianthus carthusianorum*. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 46: 45-56.
- Bone E., Farres A. 2001. Trends and rates of microevolution in plants. *Genetica* 112-113:165-182.
- Capa J.J., Pilon-Smits E.A.H. 2014. Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. *Planta* 239:267-275.
- Deng J., Liao B., Ye M., Deng D., Lan C., Shu W. 2007. The effects of heavy metal pollution on genetic diversity in zinc/cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* populations. *Plant Soil* 297, 83-92.
- Ernst W.H.O. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow Landsc. Res.* 80:251-274.
- Fiałkiewicz B., Rostański A. 2006. Morphological variability of *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek from selected habitats in the Silesian Upland (Southern Poland). *Biodiv. Res. Conserv.* 1-2:37-44.
- Godzik B. 1993. Heavy metals content in plants from zinc dump and reference areas. *Polish Bot. Stud.* 5:113-132.
- Grodzińska K., Korzeniak U., Szarek-Lukaszewska G., Godzik B. 2000. Colonization of zinc mine spoils in southern Poland – preliminary studies on vegetation, seed rain and seed bank. *Fragm. Flor. Geobot.* 45:123-145.
- Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 13:3145-3175.
- Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. 2007. Trace elements from soil to human. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Krzaklewski W., Pietrzykowski M. 2002. Selected physico-chemical properties of zinc and lead ore tailings and their biological stabilisation. *Water Air Soil Pollut.* 141:125-142.
- Krziuk K., Gałuszka A. 2014. Prospecting for hyperaccumulators of trace elements: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18:1-11.
- López-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramírez-Rodríguez V., Herrere-Estrella L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* 160:1-13.
- Maestri E., Marmiroli M., Visioli G., Marmiroli N. 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* 68:1-13.

- Przedpelska E., Wierzbicka M. 2007. *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from a lead-zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil* 299:43-53.
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180:169-181.
- Rausser W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell. Biochem. Biophys.* 31:19-48.
- Siedlecka A., Tukendorf A., Skórzyńska-Polit E., Maksymiec W., Wójcik M., Baszyński T., Krupa Z. 2001. *Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae)*. In: Prasad M.N.V. (Ed.) *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*, Marcel Dekker, Inc., pp. 171-217.
- Słomka A., Sutkowska A., Szczepaniak M., Malec P., Mitka J., Kuta E. 2011. Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. (Violaceae) in metal-polluted environments. *Chemosphere* 83:435-442.
- Szarek-Lukaszewska G. 2009. Vegetation of reclaimed and spontaneously vegetated Zn-Pb mine wastes in southern Poland. *Polish J. Environ. Stud.* 18:717-733.
- Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.* 55:35.
- Wąsowicz P., Pielichowska M., Przedpelska-Wasowicz E., Bednarek P., Szarek-Lukaszewska G., Abratowska A., Wierzbicka M. 2014. Physiological and genetic differentiation between metallicolous and non-metallicolous diploid populations of an alpine species *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) from the Tatra Mts. and the Northern Carpathian Foreland. *Ann. Bot. Fenn.* 51:227-239.
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J., Baker A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restor. Ecol.* 12:106-116.
- Wierzbicka M., Rostański A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biol. Crac. Bot.* 44:7-19.
- Wierzbicka M., Słysz A. 2005. Does *Armeria maritima* subsp. *halleri* an endemic metallophyte of calamine spoils, occur in Poland? *Pol. Bot. Stud.* 19:105-117.
- Wong M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50:775-780.
- Wójcik M. 2009. Vacuole as a multifunctional compartment in plant responses to stress factors, In: Maksymiec W. (Ed.), *Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 91-123.
- Wójcik M. 2012. Sprawozdanie merytoryczne do raportu końcowego z realizacji projektu badawczego własnego nr N N305 185737 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mechanizmy adaptacji u roślin zasiedlających składowiska odpadów z przetwórstwa rud cynku i ołowiu - badania ekologiczne, florystyczne i fizjologiczne”, okres realizacji 2009-2012.
- Wójcik M., Dresler S., Jawor E., Kowalczyk K., Tukiendorf A. 2013. Morphological, physiological, and genetic variation between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Dianthus carthusianorum*. *Chemosphere* 90:1249-1257.
- Wójcik M., Tukiendorf A. 2011. Glutathione in *Arabidopsis thaliana* adaptation to cadmium stress. *Biol. Plant.* 55:125-132.
- Yadav S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 76:167-179.
- Załęcka R., Wierzbicka M. 2002. The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland. *Plant Soil* 246:249-257.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi z dn. 9.09.2002, Dz.U. Nr 165, poz. 1359, Warszawa, 2002.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Równoległe do badań przedstawionych powyżej, które stanowiły podstawę osiągnięcia naukowego, prowadziłam lub uczestniczyłam w różnorodnych innych badaniach naukowych, dotyczących następujących problemów badawczych:

- Mechanizmy tolerancji roślin *Arabidopsis thaliana* w stresie indukowanym miedzią

Miedź (Cu) jest ważnym mikroelementem niezbędnym w metabolizmie roślin, jednak ze względu na jej dużą reaktywność, już niewielki nadmiar tego pierwiastka prowadzi do poważnych zaburzeń procesów fizjologicznych. W roślinach *Arabidopsis thaliana* objawiały się one zahamowaniem wzrostu, chlorozą i nekrozą liści, zmianami w morfologii i anatomii korzeni oraz wyraźnymi zmianami w strukturze i ultrastrukturze chloroplastów. Objawy te było bezpośrednio lub pośrednio związane ze stwierdzonymi zakłóceniami jasnej i ciemnej fazy fotosyntezy, nasiloną peroksydacją lipidów i generowaniem stresu oksydacyjnego w roślinach. Fitochelatyny nie były zaangażowane w detoksyfikację nadmiaru Cu w roślinach, prawdopodobnie na skutek utlenienia GSH do GSSG (dwusiarczek glutationu) i niewystarczającego poziomu GSH do syntezy PC. Zmiany poziomu GSH w roślinach, indukowane zastosowaniem BSO (inhibitor syntezy GSH), egzogenego GSH (zwiększenie poziomu GSH) lub jasmonianu metylu (cząsteczka sygnałowa, m.in. stymulująca ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę GSH) wskazywały, że GSH nie jest bezpośrednio zaangażowany w detoksyfikację jonów Cu, natomiast może pełnić ważną rolę w neutralizacji wywołanych Cu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego, np. poprzez sprawne działanie cyklu askorbinianowo-glutationowego.

Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w następujących publikacjach:

- **Wójcik M.**, Tukiendorf A. 2003. *Response of wild type of Arabidopsis thaliana to copper stress. Biol. Plant.* 46, 79-84;
- Maksymiec W., **Wójcik M.**, Krupa Z. 2007. *Variation in oxidative stress and photochemical activity in Arabidopsis thaliana leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. Chemosphere* 66, 421-427;
- **Wójcik M.**, Pawlikowska-Pawłęga B., Tukiendorf A. 2009. *Physiological and ultrastructural changes in Arabidopsis thaliana as affected by changed GSH level and excess Cu. Russ. J. Plant Physiol.* 56 (6), 820-829.

- Wpływ selenu i krzemu na toksyczność metali w roślinach

Toksyczność Pb lub Cd w roślinach może być modyfikowana obecnością innych pierwiastków, np. selenu (Se) lub krzemu (Si) w środowisku wzrostu, przy czym, w zależności od stężenia tych pierwiastków, mogą one wywierać pozytywny bądź negatywny wpływ na rośliny. Niskie stężenia Se ($1,5 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$) znosiły toksyczność Pb w roślinach *Vicia faba L. minor* (czemu towarzyszyła obniżona produkcja anionorodnika nadtlenkowego i zwiększona synteza związków tiolowych), natomiast wyższe stężenia Se ($6 \mu\text{M}$) nasilały stres oksydacyjny w roślinach traktowanych Pb (poprzez zwiększenie peroksydacji lipidów i produkcji anionorodnika nadtlenkowego). Obecność Se łagodziła również negatywne skutki działania Cd na rośliny *Cucumis sativus L.*, w tym przypadku również obserwowano antyoksydacyjne działanie Se, przejawiające się obniżeniem peroksydacji lipidów i zwiększeniem stabilności błon biologicznych. Ponadto, w badaniach tych po raz pierwszy wykazano, że obecność Se obniża syntezę PC w roślinach traktowanych Cd. Prawdopodobnie było to spowodowane podstawieniem selenu w miejsce siarki w grupach funkcyjnych cysteiny, a zastąpienie cysteiny selenocysteina, np. w centrum katalitycznym syntazy fitochelatynowej, obniżyło produkcję PC. Obecność Si w pożywce wywierała korzystny wpływ na wzrost roślin *Zea mays L.*, natomiast nie wpływała w istotny sposób na toksyczność Cd w roślinach. Obserwowano przy tym hamujące działanie Si na pobieranie i akumulację Cd w korzeniach, co było również przyczyną obniżonej akumulacji PC w korzeniach roślin traktowanych Cd.

Wyniki powyższych badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- Mroczek-Zdyrska M., **Wójcik M.** 2012. *The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in Vicia faba L. minor plants. Biol. Trace Elem. Res.* 147, 320–328;
- Hawrylak-Nowak G., Dresler S., **Wójcik M.** 2014. *Selenium affects physiological parameters and phytochelatin accumulation in cucumber (Cucumis sativus L.) plants grown under cadmium exposure. Sci. Hortic.* 172, 10-18;
- Dresler S., **Wójcik M.**, Bednarek W., Hanaka A., Tukiendorf A. 2015. *The effect of various silicon concentrations on maize growth and the response to cadmium stress, Russ. J. Plant Physiol.* 62 (1), 86-92.

- Tolerancja na Cd roślin *Echium vulgare L.* pochodzących ze składowisk odpadów cynkowo-olowiowych i z terenów niezanieczyszczonych

Dwie populacje *Echium vulgare*, pochodzące z terenów metalonośnych, wykazywały mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie Cd niż populacja referencyjna. Zawartość kwasów organicznych (winowego, jabłkowego, cytrynowego, bursztynowego) zazwyczaj nie zmieniała się pod wpływem akumulacji Cd w roślinach i była podobna w roślinach hałdowych i referencyjnych, co sugeruje, że nie są one zaangażowane w detoksyfikację jonów Cd ani w tolerancję na Cd. Akumulacja PC była większa w korzeniach roślin pochodzących ze składowisk odpadów, co może wskazywać na ich rolę w zróżnicowanej tolerancji na Cd wśród badanych populacji.

Wyniki badań zostały opisane w artykule:

- Dresler S., Bednarek W., **Wójcik M.** 2014. *Effect of cadmium on selected physiological and morphological parameters in metallicolous and non-metallicolous populations of Echium vulgare. Ecotoxicol. Environ. Safe. 104, 332-338.*

- **Akumulacja peptydów tiolowych i kwasów organicznych w roślinach spontanicznie zasiedlających składowiska odpadów cynkowo-olowiowych**

Analizowano kilka gatunków roślin (*Daucus carota*, *Reseda lutea*, *Silene vulgaris*, *Echium vulgare*, *Dianthus carthusianorum*, *Armeria maritima*), występujących w wyniku naturalnej sukcesji na trzech składowiskach odpadów Zn-Pb w południowej Polsce oraz dodatkowo kilka gatunków roślin (*Thlaspi caerulescens*, *A. maritima*, *S. vulgaris*) z terenów o podobnym stopniu zanieczyszczenia metalami w Plombières w Belgii, jak również populacje tych gatunków z terenów niezanieczyszczonych w okolicach Lublina. Wykazano brak istotnych różnic w akumulacji kwasów organicznych (jabłkowego i cytrynowego) pomiędzy hałdowymi i referencyjnymi populacjami *D. carota*, *R. lutea*, *S. vulgaris*, *E. vulgare* i *D. carthusianorum* lub nawet większą zawartość tych związków w roślinach populacji referencyjnych, szczególnie w przypadku *A. maritima*. Wyniki te sugerują, że kwasy organiczne nie są zaangażowane w adaptację tych gatunków do zasiedlania składowisk odpadów cynkowo-olowiowych. Natomiast istotnie większe stężenia kwasów organicznych występowały w hałdowej populacji *T. caerulescens* z Plombières w porównaniu z populacją referencyjną *Thlaspi arvense* (ponieważ *T. caerulescens* nie występuje na terenach niezanieczyszczonych metalami, blisko spokrewniony z nim gatunek *T. arvense* uznawany jest w wielu badaniach jako gatunek referencyjny), co wskazuje, że w tym gatunku kwasy organiczne mogą pełnić pewną rolę w przystosowaniu do wzrostu w środowisku wzbogaconym w metale. W częściach nadziemnych żadnego spośród badanych gatunków nie stwierdzono akumulacji PC, zatem peptydy te nie pełnią roli w adaptacji tych roślin do

wzrostu i rozwoju na składowiskach odpadów. Natomiast istotnie wyższa zawartość GSH w populacjach hałdowych wskazuje na jego potencjalną rolę w przystosowaniu roślin do wzrostu w obecności ekstremalnie wysokich zawartości metali w środowisku, albo przez bezpośrednie wiązanie jonów metali, albo przez udział w łagodzeniu stresu oksydacyjnego.

Wyniki tych badań zostały opisane w raporcie merytorycznym z realizacji grantu MNiSW (**Wójcik 2012**), zostały przedstawione w 4 doniesieniach konferencyjnych, a w chwili obecnej są przygotowywane do druku.

Sumaryczny Impact Factor przedstawionych powyżej publikacji, w których opisano pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, nie włączane do osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, wynosi **15,877** (IF zgodny z rokiem publikacji; IF₂₀₁₄ – **21,722**). Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją z dnia 31.12.2014) wynosi **305**.

VI. Inne realizowane obecnie zadania badawcze

Poniżej przedstawiłam realizowane obecnie przeze mnie zagadnienia badawcze, będące na różnym stopniu zaawansowania prowadzonych badań:

- Określenie sprawności aparatu fotosyntetycznego oraz wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w roślinach *Dianthus carthusianorum*, pochodzących z hałd metalonośnych i terenów niezanieczyszczonych metalami, poddanych działaniu Zn, Pb lub Cd (wyniki badań są przygotowywane do publikacji).
- Lokalizacja Cd (oraz Pb i Zn) w korzeniach i liściach roślin *Dianthus carthusianorum* i innych roślin hałdowych z wykorzystaniem metod histochemicznych, ablacji laserowej oraz mikroanalizy rentgenowskiej (EDX).
- Morfologiczny, fizjologiczny i genetyczny polimorfizm w hałdowych i referencyjnych populacjach roślin *Echium vulgare* i *Daucus carota* oraz wewnątrzkomórkowe mechanizmy tolerancji Zn, Pb i Cd w tych populacjach (jeden artykuł naukowy wysłany do druku).
- Akumulacja peptydów tiolowych i kwasów organicznych w wybranych gatunkach roślin hałdowych (*Biscutella laevigata*, *Silene vulgaris*) uprawianych hydroponicznie w obecności Cd.

- Porównanie wrażliwości na Cd, wewnątrzkomórkowych mechanizmów detoksyfikacji Cd oraz sprawności aparatu fotosyntetycznego w roślinach *Thlaspi caerulescens* i *Thlaspi arvense* (wyniki badań są przygotowywane do druku).
- Ocena skażenia metalami ciężkimi gleb i roślin uprawnych w najbliższym otoczeniu składowisk odpadów z wydobycia rud cynku i ołowiu na Górnym Śląsku (zadanie badawcze realizowane we współpracy z Zakładem Botaniki Systematycznej Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, Zakładem Gleboznawstwa i Ochrony Gleb UMCS w Lublinie oraz Hasselt University, Belgia).
- Analiza akumulacji peptydów tiolowych w roślinach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantach z zaburzoną syntezą GSH lub askorbinianu (badania realizowane we współpracy z Hasselt University, Belgia).

VII. Dalsze perspektywy badawcze

W przyszłości zamierzam kontynuować interdyscyplinarne badania dotyczące roślinności spontanicznie zasiedlającej składowiska odpadów metalonośnych.

Przeprowadzone do tej pory badania wskazują, że wewnątrzkomórkowe ligandy nie są odpowiedzialne za adaptację roślin do wysokich stężeń metali w środowisku wzrostu, dlatego w dalszych badaniach planuję poszukiwanie alternatywnych mechanizmów detoksyfikacji i tolerancji metali, takich jak depozycja w ścianie komórkowej, sekwestracja w wakuoli czy ekskrecja lub depozycja w trichomach. W badaniach tych zamierzam wykorzystać nowoczesne metody określania wewnątrzkomórkowej lokalizacji oraz specjacji metali. Interesującym zagadnieniem, które również zamierzam realizować, jest badanie zmian anatomicznych, utrudniających migrację metali w apoplacie i ich przenikanie do wnętrza komórki, takich jak tworzenie dodatkowej warstwy endodermy oraz wzmożone odkładanie ligniny, pektyn lub suberyny w ścianach komórkowych w odpowiedzi na obecność metali. Badania te będą prowadzone na gatunkach roślin hałdowych analizowanych dotychczas oraz na innych gatunkach, które okażą się interesujące pod kątem ich przystosowań, w tym jedynym występującym w Polsce hiperakumulatorze Zn i Cd – *Arabidopsis halleri*.

Trudne warunki siedliskowe, takie jak występujące na hałdach metalonośnych, wpływają na inicjację alternatywnych szlaków metabolicznych, prowadzących do akumulacji wtórnych metabolitów roślinnych, korzystnych dla roślin w ich adaptacji do środowiska. Planuję zatem poszerzyć swoje zainteresowania badawcze o zagadnienia akumulacji w

roślinach substancji biologicznie czynnych, istotnych pod względem przystosowań do wysokich zawartości metali w podłożu, jak również o potencjalnym znaczeniu użytkowym w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Analiza wybranych gatunków roślin, występujących na składowiskach odpadów cynkowo-ołowiowych, pozwoli być może na selekcję ekotypów cennych z punktu widzenia składu fitochemicznego.

Małgorzata Wójcik