

**Załącznik 2**

**Autoreferat**  
**dotyczący działalności naukowo-badawczej**

**Dr inż. Sławomir Dresler**

Zakład Fizjologii Roślin  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Lublin 2017**

---

---

**Dr inż. Sławomir Dresler**

Zakład Fizjologii Roślin

Instytut Biologii i Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

email: slawomir.dresler@poczta.umcs.lublin.pl

**1. Imię i Nazwisko:** Sławomir Dresler

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

2005	<b>Tytuł zawodowy magister inżynier rolnictwa</b> Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Rolniczy – kierunek rolnictwo, Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej. Praca magisterska pt. „Azot mineralny w glebach Lubelszczyzny”, promotor – prof. dr hab. Wiesław Bednarek
2009	<b>Stopień doktora nauk rolniczych w zakresie kształtowania środowiska – chemia środowiska</b> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej. Praca doktorska pt. „Oddziaływanie czynników przyrodniczych i antropogenicznych na występowanie mineralnych form azotu w glebie”, promotor – prof. dr hab. Wiesław Bednarek
Studia podyplomowe	
2009 - 2010	Studia podyplomowe „Biologia molekularna”, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Kraków
2011 - 2012	Studia podyplomowe „Menadżer dla nauki i biznesu”, Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie, Lublin
2012 - 2013	Studia podyplomowe „Kształcenie kadry akademickiej do roli wykładowców przedmiotu <i>Ochrona własności intelektualnej</i> ” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Lublin

---

---

2015 - 2016                      Studia podyplomowe „Ziołoznawstwo”, Uniwersytet Rzeszowski, Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego w Weryni, Werynia

#### Ważniejsze kursy i szkolenia

2010                              Kurs podstawowy nowoczesnej chromatografii cieczowej. Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Komisja Analizy Chromatograficznej Komitetu Chemii Analitycznej PAN, 15-19.02.2010, Lublin

2011                              Training included operation, data processing and maintenance of scanning electron microscope VEGA LMU and microanalysis EDS system INCA, 12.-13.05.2011, Lublin

2011                              Kurs – Podstawy techniki real-time PCR, AA Biotechnology, 12-13.09.2011, Gdynia

2011                              Kurs – Wykrywanie mutacji punktowych, AA Biotechnology, 14-15.09.2011, Gdynia

2012                              Kurs – Ekologia molekularna. „MBS” Serwis dla biologii molekularnej, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, 24-25.02.2012, Warszawa

2012                              Seminarium Perlan Technologies, LCMS i GCMS, 26-27.09.2012, Warszawa

2014                              Seminarium Perlan Technologies LCMS i GCMS, 21-22.10.2014, Jachranka

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 01.10.2009 roku do chwili obecnej – adiunkt

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii (do września 2011 roku Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

#### 4. Wskazanie osiągnięcia naukowego

##### a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Mechanizmy adaptacyjne populacji *Echium vulgare* L. zasiedlających składowiska odpadów z wydobycia i przerobu rud galmanowych**

##### b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (przy każdej pozycji podano punktację MNiSW wg ujednoliconego wykazu czasopism z dn. 26.01.2017, średni pięcioletni wskaźnik IF z roku 2015 oraz liczbę cytowań wg bazy WoS z dnia 24.05.2017)

1. **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* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 332-338 (MNiSW: 30; IF: 3,246; liczba cytowań: 10).
2. **Dresler S.**, Kubrak T., Bogucka-Kocka A., Szymczak G. 2015. Determination of shikonin and rosmarinic acid in *Echium vulgare* L. and *Echium russicum* J.F. Gmel. by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38: 698-701 (MNiSW: 15; IF: 0,755; liczba cytowań: 6).
3. **Dresler S.**, Tyrka M., Szeliga M., Ciura J., Wielbo J., Wójcik M., Tukiendorf A. 2015. Increased genetic diversity in the population of *Echium vulgare* L. colonising Zn-Pb waste heaps. *Biochemical Systematics and Ecology*, 60: 28-36 (MNiSW: 15; IF: 1,199; liczba cytowań: 5).
4. **Dresler S.**, Kubrak T., Rutkowska E., Gagoś M., Bogucka-Kocka A., Świeboda R., Wójcik M. 2016. Comparison of analytical methods in chemometric fingerprinting of metallicolous and non-metallicolous populations of *Echium vulgare* L. *Phytochemical Analysis*, 27: 239-248 (MNiSW: 30; IF: 2,480; liczba cytowań: 2).
5. **Dresler S.**, Rutkowska E., Bednarek W., Stanisławski G., Kubrak T., Bogucka-Kocka A., Wójcik M. 2017. Selected secondary metabolites in *Echium vulgare* L. populations from nonmetalliferous and metalliferous areas. *Phytochemistry*, 133: 4-14 (MNiSW: 35; IF: 3,218; liczba cytowań: 1).
6. **Dresler S.**, Szymczak G., Wójcik M. 2017. Comparison of some secondary metabolites content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharmaceutical Biology*, 55: 691-695 (MNiSW: 20; IF: 1,242).

7. **Dresler S.**, Bednarek W., Hawrylak-Nowak B., Wójcik M. 2017. Morphometric and phytochemical profile of seeds of metallicolous and nonmetallicolous *Echium vulgare* populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70: 304-310 (MNiSW: 15, IF: 1,199).
8. **Dresler S.**, Wójciak-Kosior M., Sowa I., Stanisławski G., Bany I., Wójcik M. 2017. Effect of short-term Zn/Pb or long-term multi-metal stress on physiological and morphological parameters of metallicolous and nonmetallicolous *Echium vulgare* L. populations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 380-389 (MNiSW: 35, IF: 3,434)

Wszystkie prace, składające się na osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane w czasopismach z bazy JCR, ich sumaryczny średni 5- letni Impact Factor (IF) wynosi **16,773** (suma IF zgodnie z rokiem opublikowania 15,157), sumaryczna liczba punktów MNiSW – **195**, a liczba cytowań **24** (na dzień 24.05.2017). We wszystkich wyżej wymienionych publikacjach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a mój wkład w ich powstanie wynosi od 65 do 90%, co potwierdzają oświadczenia współautorów (załącznik nr 4). Byłem autorem koncepcji badań, pełniłem wiodącą rolę w planowaniu, organizacji i wykonaniu doświadczeń, przystosowaniu aparatury naukowej do określonych analiz oraz modyfikacji i doskonaleniu metod badawczych. Byłem również autorem graficznych opracowań wyników, interpretacji danych doświadczalnych oraz odpowiadałem za przygotowanie tekstów prac do publikacji.

Informacje na temat wkładu współautorów w przygotowanie publikacji są zawarte w załączniku nr 4 – Oświadczenia współautorów.

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

**Wprowadzenie**

Składowiska odpadów z wydobycia i przerobu rud galmanowych, bogatych w Zn i Pb (hałdy galmanowe), stanowią szczególne środowisko dla zasiedlających je roślin. Obszary takie charakteryzują się obecnością gatunków roślin o podwyższonej tolerancji na występujące tu abiotyczne stresy środowiska, które stwarzają ekstremalnie niekorzystne warunki wzrostu i rozwoju na tych terenach. Wysoka zawartość metali ciężkich w podłożu i związane z tym jego zasolenie, niska zasobność podłoża w

składniki mineralne i materię organiczną, niska wilgotność podłoża oraz silne nasłonecznienie i działanie silnych wiatrów, inicjują procesy naturalnej selekcji prowadzące do wykształcenia populacji roślin o unikalnych cechach. Niektóre populacje roślin występujących na hałdach galmanowych, osiągnęły, w wyniku procesów mikroewolucyjnych, wysoki poziom specjalizacji, co skutkowało powstaniem odrębnych ekotypów, tzw. ekotypów galmanowych (Wierzbicka i Rostański 2002). Procesy prowadzące do nabycia tolerancji na metale ciężkie przez rośliny występujące na obszarach zanieczyszczonych metalami mogły trwać od kilku do 150 lat (Bone i Farres 2001).

Gatunki roślin występujące na terenach metalonośnych, ze względu na osiągnięty stopień adaptacji, możemy zaliczyć do dwóch grup: metalofitów – roślin ściśle związanych z glebami o wysokiej zawartości metali oraz pseudometalofitów – roślin zasiedlających zarówno gleby skażone, jak i środowiska niezanieczyszczone metalami ciężkimi (Baker 1981). Niezależnie od osiągniętego poziomu przystosowania do wzrostu w warunkach wysokich stężeń metali w podłożu, rośliny zasiedlające tereny skażone metalami charakteryzują się podwyższonym progiem tolerancji na inne czynniki stresowe oddziaływujące na hałdach. U niektórych gatunków zasiedlających hałdy (m.in. *Biscutella laevigata*, *Silene vulgaris*, *Dianthus carthusianorum*), przejawia się to w różnicach morfologicznych między nimi, a roślinami rosnącymi na terenach nieskażonych metalami ciężkimi. Rośliny z obszarów metalonośnych charakteryzują się cechami kseromorficznymi, redukcją biomasy części nadziemnych, przyspieszeniem i wydłużeniem fazy generatywnej oraz wzrostem plenności (tzw. strategia życiowa typu „r”). Cechy te, w połączeniu z wyższą tolerancją na metale ciężkie, były widoczne i utrzymywały się w kolejnych pokoleniach roślin uprawianych w kontrolowanych warunkach (Wójcik i in. 2017). Dodatkowych dowodów, potwierdzających odrębność populacji niektórych gatunków roślin występujących na obszarach hałd galmanowych, dostarczają badania markerów genetycznych. Porównanie molekularnych markerów roślin ekotypów galmanowych z roślinami populacji z obszarów niezanieczyszczonych, wskazało nie tylko na dymorfizm genetyczny pomiędzy populacjami, ale również różny poziom wewnątrzpopulacyjnego zróżnicowania genetycznego (Wójcik i in. 2013).

Należy zwrócić uwagę, że u poszczególnych gatunków, ekotypów, czy też populacji obserwuje się zróżnicowany poziom tolerancji na stres związany z nadmiarem metali w podłożu. Różnice te występują pomiędzy gatunkami i są uwarunkowane ich zróżnicowaną odpornością konstytutywną – wynikającą ze zmian adaptacyjnych.

Notuje się także różny poziom odporności indukowanej – będącej wynikiem procesów dostosowywania się roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. Odporność roślin (ang. *stress resistance*) na wysoką zawartość metali ciężkich w podłożu może być wynikiem procesów składających się na dwie strategie. Jedną z nich (ang. *stress avoidance*) obejmuje procesy polegające na unikaniu stresu metali ciężkich poprzez blokowanie ich transportu do symplasty i utrzymanie niskiej ich zawartości w tkankach, pomimo wysokiej zawartości w glebie. Strategia ta realizowana jest, między innymi, dzięki strukturalnym modyfikacjom ściany komórkowej (intensywna produkcja kalozy, celulozy i ligniny) oraz zmianom przepuszczalności błony komórkowej, które to procesy prowadzą do zatrzymywania jonów w apoplacie, ograniczeniu pobierania poprzez zmniejszenie biodostępności metali (chelatowanie metali przez składniki eksudatów korzeniowych), czy tworzeniu barier mechanicznych zmniejszających kontakt jonów metali z korzeniami (intensywne wydzielanie mukopolisacharydów). Duże znaczenie w ograniczeniu pobierania metali ciężkich mają również procesy alkalizacji ryzosfery lub tworzenia warunków sprzyjających powstawaniu mniej dostępnych, utlenionych form metali. Poza tym rośliny, poprzez wydzieliny korzeniowe promujące wzrost mikroorganizmów w ryzosferze oraz sprzyjające mikoryzie, wpływają na biologiczną immobilizację metali, jak i na ograniczenie negatywnych skutków związanych z niską zasobnością podłoża lub suszą (Manara 2012).

Mimo że wielu fizjologów uważa strategię unikania stresu metali ciężkich za dominującą w adaptacji roślin do tego czynnika stresowego, badania nad mechanizmami drugiej strategii (ang. *stress tolerance*) rozwijają się bardzo dynamicznie od ponad 20 lat. Obejmują one 1/ poszukiwanie wewnątrzkomórkowych (konstytutywnych i indukcyjnych) ligandów, które przez wiązanie wnikających do wnętrza komórek jonów metali w kompleksy znacznie ograniczają ich toksyczność, 2/ badania wewnątrzkomórkowego transportu i sekwestracji jonów metali ciężkich lub ich kompleksów w wakuoli, 3/ badania długodystansowego transportu metali lub metalokompleksów oraz ich deponowanie w organach roślinnych (starsze liście) lub w epidermie czy jej strukturach (trichomy, aparaty szparkowe, struktury wydzielnicze) o niskiej aktywności metabolicznej lub umożliwiających ich usunięcie, 4/ badania roli enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów antyoksydacyjnych w tolerancji na metale ciężkie (Viehweger 2014).

Wiązanie metali ciężkich przez ligandy i transport takich kompleksów do wakuoli, gdzie metale są deponowane, jest jednym z procesów ich wewnątrzkomórkowej detoksykacji. U roślin takimi ligandami są niskocząsteczkowe  $\gamma$ -Glu-Cys peptydy, których synteza odbywa się przy udziale konstytutywnego enzymu – syntazy fitochelatynowej – aktywowanego obecnością jonów metali ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ) (Grill i in. 1989). Substratem syntezy tych peptydów jest tripeptyd glutation lub jego homologi (m.in.: homoglutation, hydroksymetyloglutation), które również mogą chelatować jony metali ciężkich. Wewnątrzkomórkowymi ligandami jonów metali są też niskocząsteczkowe kwasy organiczne (zwłaszcza jabłkowy i cytrynowy) oraz aminokwasy (histrydina, prolina, nikotianamina), które oprócz wewnątrzkomórkowej detoksykacji metali ciężkich uczestniczą w ich transporcie ksylemowym (Rauser 1999).

Toksyczność metali ciężkich związana jest m.in. ze zwiększeniem podaży reaktywnych form tlenu, czego przejawem są uszkodzenia komórek wywołane stresem oksydacyjnym. W roślinach funkcjonuje szereg procesów pozwalających na ograniczenie skutków tego stresu. Do najważniejszych należą: nieenzymatyczny system antyoksydacyjny, w skład którego wchodzi niskocząsteczkowe związki (kwas askorbinowy, glutation, tokoferol, karotenoidy, polifenole) oraz enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne oparte na aktywności enzymów – dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy glutationowej (Manara 2012).

Ostatnie lata badań nad zmianami metabolizmu i rolą tych zmian w odpowiedzi roślin na stres metali ciężkich, zwracają uwagę na metabolity wtórne, których znaczenie w tolerancji stresów biotycznych i abiotycznych potwierdzono wielokrotnie (Lavid i in. 2001, Chin i in. 2009, Ramakrishna i Ravishankar 2011). Wykazano, że infekcje roślin przez fitopatogeny oraz takie czynniki jak promieniowanie UV, zbyt wysoka lub niska temperatura, susza, herbicydy, nadmiar lub niedobór związków mineralnych w glebie, czy uszkodzenia mechaniczne, często prowadzą do wzmożonej syntezy metabolitów wtórnych. Ze względu na dużą heterogeniczność tej grupy związków, badania ich roli w tolerancji roślin na metale ciężkie oparte są na: 1/ ocenie zdolności metabolitów roślinnych do chelatowania metali, 2/ określeniu ich wpływu na wzrost potencjału antyoksydacyjnego roślin, w tym aktywację enzymatycznych antyoksydantów, 3/ określeniu ich udziału w lignifikacji ścian komórkowych (Kováčik i Klejdus 2008, Nourimand i Todd 2016). Obecnie uważa się, że obok powszechnie znanych roślinnych



ligandów metali ciężkich (m.in. fitochelatyn, niskocząsteczkowych kwasów organicznych, niektórych aminokwasów), istotne znaczenie w wiązaniu metali mogą mieć związki polifenolowe (Lavid i in. 2000). Chin i in. (2009) stwierdzili, że polifenole, a w szczególności taniny, odgrywają istotną rolę w wiązaniu i sekwestracji ołowiu. Ponadto wskazuje się na rolę polifenoli w ograniczaniu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego. Ostatnie badania pokazują, że metabolity wtórne nie tylko bezpośrednio uczestniczą w usuwaniu wolnych rodników tlenowych, ale także, jak w przypadku alantoiny, w obecności stresu metali mogą aktywować enzymatyczny system antyoksydacyjny (Nourimand i Todd 2016).

Procesy zwiększonej produkcji i akumulacji metabolitów wtórnych pod wpływem stresów środowiskowych mogą mieć szczególne znaczenie u gatunków roślin leczniczych (Rai i in. 2005, Nasim i Dhir 2010), co potwierdzają wyniki wcześniejszych badań wskazujące na wzmożoną syntezę hioscyjminy u *Datura stramonium* (Furze i in. 1991), alkaloidów tropanowych u *Atropa belladonna* (Lee i in. 1998) oraz ajmalicyny, w roślinach *Catharanthus roseus* (Zheng i Wu 2004).

Rośliną o pewnym potencjale leczniczym, występującą w murawie kserotermicznej łąk galmanowych jest *Echium vulgare* L. – żmijowiec pospolity. Jego ziele i korzeń od dawna są stosowane w medycynie ludowej jako środek leczniczy na wiele schorzeń. Dzisiaj wiadomo, że właściwości te związane są z występowaniem w roślinie metabolitów wtórnych, szczególnie alantoiny, garbników (ok. 8-12%), fitosteroli, saponin, olejków eterycznych i śluzów. Dodatkowo nasiona tej rośliny są bogate w kwasy tłuszczowe –  $\gamma$ -linolowy-GLA C<sub>18:3</sub> (n-6) oraz rzadko spotykany kwas stearydonowy-SDA C<sub>18:4</sub> (n-3) (Özcan 2008). Mimo dużego zainteresowania tym gatunkiem jego fitochemia nie jest zbyt dobrze poznana i dotychczas nie badano wpływu tak zanieczyszczonego metalami ciężkimi środowiska, jakim są łąki galmanowe, na produkcję metabolitów wtórnych *E. vulgare*, co mogłoby dostarczyć informacji użytecznych dla farmakologii, przemysłu spożywczego czy kosmetycznego. Z powyższego powodu wybrano gatunek *Echium vulgare*, spontanicznie zasiedlający polskie łąki galmanowe na Górnym Śląsku, jako obiekt badawczy.

### **Materiał roślinny, metody i cele badań**

*Echium vulgare* L. jest dwuletnim hemikryptofitem należącym do rodziny Boraginaceae. Roślina zasiedla gleby piaszczyste, lekkie lub kamieniste. Jako gatunek

synantropijny występuje na stanowiskach ruderalnych, nasypach kolejowych oraz hałdach odpadów budowlanych. Gatunek ten spotykany jest także na hałdach odpadów pochodzących z wydobywania i przerobu rud metali – hałdach serpentynitowych oraz galmanowych, gdzie towarzyszą mu m.in.: *Daucus carota*, *Pimpinella saxifraga*, *Reseda lutea*, *Rumex acetosa*, *Silene vulgaris*. W przeciwieństwie do niektórych gatunków zaliczanych do tzw. ekotypów galmanowych, *E. vulgare* porastający tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi nie różni się cechami morfologicznymi i anatomicznymi od roślin zasiedlających obszary nieskażone. Natomiast niekorzystne warunki bytowania na hałdach metalonośnych istotnie wpływają na ograniczenie jego wzrostu (Wójcik i in. 2017).

W prezentowanych badaniach wykorzystano trzy populacje *Echium vulgare*. Dwie populacje zasiedlające hałdy odpadów pochodzących z wydobywania i przerobu rud cynku i ołowiu oraz jedna populacja referencyjna, którą stanowiły rośliny porastające tereny niezanieczyszczone metalami ciężkimi (populacja oznaczona jako NM – *nonmetallicolous*) w okolicach Kazimierza Dolnego (51°18'45"N; 21°25'47"E). Hałdowe populacje zlokalizowane były w południowej Polsce na Górnym Śląsku, na dwóch składowiskach zróżnicowanych pod względem wieku oraz właściwości fizykochemicznych. Pierwsza z hałdowych populacji występuje w Piekarach Śląskich na stosunkowo młodym (30-letnim) składowisku żużli powstałych w wyniku przerobu rudy galmanowej (populacja MP – *metallicolous* Piekary) (50°12'88"N; 18°58'19"E), druga populacja hałdowa występowała na 90-letnim składowisku utworzonym w wyniku grawitacyjnego wzbogacania i przerobu rud cynkowo-ołowiowych, zlokalizowanym w Brzezinach Śląskich (populacja MB – *metallicolous* Brzeziny) (50°21'19"N; 19°00'17"E). Cechami znanymi obu składowisk są: silne zanieczyszczenie metalami ciężkimi (Zn, Pb, Cd), nieuregulowane stosunki wodne, niska zasobność podłoża w materiał organiczny, zasadowy odczyn podłoża i silne nasłonecznienie (dokładną charakterystykę warunków na w/w składowiskach zamieszczono w pracy Dresler i in. 2016).

### **Cele badań:**

Celem badań było poznanie mechanizmów adaptacji populacji roślin *Echium vulgare* L. do ekstremalnie wysokich zawartości metali ciężkich w podłożu hałd odpadów pochodzących z wydobywania i przerobu rud cynku i ołowiu.

W szczególności przeprowadzone badania miały na celu:

1. Określenie poziomu genetycznego zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego oraz pomiędzy badanymi populacjami *E. vulgare*.
2. Ocenę tolerancji roślin uprawianych w warunkach ostrego stresu metali ciężkich (krótkotrwała ekspozycja na wysokie stężenia Cd, Pb lub Zn w uprawach hydroponicznych) i stresu chronicznego (długotrwała uprawa na podłożu zebranym z miejsc występowania badanych populacji).
3. Ocenę wpływu ekstremalnie niekorzystnych warunków wzrostu na zawartość wybranych metabolitów wtórnych w ziele, korzeniach oraz nasionach *E. vulgare*:
  - a. opracowanie metody wykorzystującej wysokosprawną elektroforezę kapilarną do analizy wybranych metabolitów wtórnych w *E. vulgare* oraz innych roślinach z rodziny Boraginaceae,
  - b. określenie znaczenia wybranych metabolitów wtórnych dla tolerancji populacji *E. vulgare* na metale ciężkie.
4. Ocenę możliwości wykorzystania metod chemometrycznych w badaniach porównawczych populacji roślin z obszarów zanieczyszczonych i nieskażonych metalami ciężkimi, na przykładzie badanych populacji *E. vulgare*.

W badaniach wykorzystano następujące **metody analityczne**: chromatografia cienkowarstwowa (TLC – ang. **Thin Layer Chromatography**), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC – ang. **High-Performance Liquid Chromatography**), wysokosprawną elektroforezę kapilarną (HPCE – ang. **High-Performance Capillary Electrophoresis**), chromatografię gazową (GC – ang. **Gas Chromatography**), spektroskopia FTIR (ang. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy**), spektroskopia mas (MS – ang. **Mass Spectroscopy**), atomowa spektrofotometria masowa (AAS – ang. **Atomic Absorption Spectrometry**), analizy spektrofotometryczne (oznaczenie zawartości flawonoidów, polifenoli, barwników fotosyntetycznych, proliny, właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów); **metody genetyczne** oparte na badaniach markerów molekularnych: markery polimorfizmu pomiędzy powtórzeniami mikrosatelitarnymi (ISSR – ang. **Inter Simple Sequence Repeats**), polimorfizm markerów mikrosatelitarnych (SSR – ang. **Simple Sequence Repeats**), polimorfizm długości amplifikowanych markerów (AFLP – ang. **Amplified Fragment Length Polymorphism**); **metody statystyczne**: statystyki parametryczne (analiza wariancji,

korelacja r-Pearsona, analiza głównych składowych, analiza skupień), statystyki nieparametryczne (test U Manna-Whitneya), statystyki wykorzystywane w badaniach genetycznych (AMOVA – analiza wariancji molekularnej, analiza struktury populacji, indeksy podobieństwa i różnic pomiędzy populacjami, współczynniki przepływu genów pomiędzy populacjami, MI – indeks markera, PIC – polimorficzna informacja markera).

## Podsumowanie wyników badań

### 1. Ocena zróżnicowania genetycznego wewnątrzpopulacyjnego oraz pomiędzy populacjami hałdowymi a populacją referencyjną

Badane populacje hałdowe (MP, MB) oraz populacja referencyjna (NM) były analizowane pod względem genetycznego zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego oraz pomiędzy populacjami. Do tego celu użyto trzech systemów markerów molekularnych: ISSR (ang. **I**nter **S**imple **S**equences **R**epeat), AFLP (ang. **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) oraz SSR (ang. **S**imple **S**equences **R**epeat). Przeprowadzono także analizę porównawczą zastosowanych markerów pod względem ich użyteczności w badaniu polimorfizmu badanych populacji. Ze względu na poliploidalny charakter badanej rośliny metoda AFLP okazała się mało efektywna. Mimo że uwidoczniła bardzo dużą liczbę polimorficznych fragmentów DNA, to, ze względu na błędy w amplifikacji mogła dawać fałszywe rezultaty (potwierdzają to Fay i in. 2005). Przeprowadzona analiza markerów ISSR i SSR oraz obliczone współczynniki AMOVA (ang. **A**nalysis of **M**olecular **V**ariance) wykazały zróżnicowanie pomiędzy populacjami na poziomie 14% (ISSR) oraz 11% (SSR). Dymorfizm genetyczny pomiędzy populacjami potwierdziła także analiza skupień z użyciem metody średnich połączeń UPGMA (ISSR) oraz ocena struktury z wykorzystaniem statystyki Bayesa (SSR).

Charakterystyczny jest fakt odmiennego zróżnicowania genetycznego wewnątrz badanych populacji. Z reguły adaptacja roślin do ekstremalnego środowiska skutkuje ograniczeniem zróżnicowania populacji kolonizujących taki obszar. Jest to efektem presji środowiska i selekcji osobników o cechach pozwalających zasiedlić „trudny”, np. zanieczyszczony, teren. Proces ten, nazywany „efektem szyjki butelki”, przyczynia się do eliminacji alleli nieistotnych z punktu widzenia przetrwania w niekorzystnych warunkach i zawężenia zmienności genetycznej populacji (Deng i in. 2007). W badanych populacjach *E. vulgare*, nie tylko nie obserwowano ograniczenia

zróżnicowania genetycznego, ale nawet jego zwiększenie. Potwierdziły to wskaźniki zróżnicowania genetycznego ( $H_j$ ) wynoszące 0,225; 0,236; 0,239; (metoda ISSR) oraz 0,676; 0,688; 0,705 (metoda SSR) odpowiednio dla populacji NM, MB, MP. Wysoki poziom genetycznego zróżnicowania populacji hałdowych może świadczyć o:

- / wysokiej tolerancji populacji zasiedlających tereny hałdowe, w stosunku do warunków środowiskowych,
- / wysokim poziomie przepływu genów z pobliskich populacji,
- / dużym zróżnicowaniu warunków bytowania w obrębie danej hałdy,
- / możliwej zwiększonej frekwencji mutacji będących odpowiedzią na czynniki stresowe (Mengoni i in. 2001).

Wyżej opisane wyniki badań zostały przedstawione w pracy:

**Dresler S.**, Tyrka M., Szeliga M., Ciura J., Wielbo J., Wójcik M., Tukiendorf A. 2015. Increased genetic diversity in the population of *Echium vulgare* L. colonising Zn-Pb waste heaps. *Biochemical Systematics and Ecology*, 60: 28-36

## **2. Porównanie poziomu tolerancji na metale ciężkie badanych populacji *E. vulgare* w warunkach stresu ostrego i chronicznego**

Rośliny trzech populacji *E. vulgare* uzyskane z nasion zebranych w miejscach ich naturalnego występowania (dwóch pochodzących z obszarów zanieczyszczonych metalami ciężkimi – populacje MB i MP oraz jednej z terenu referencyjnego niezanieczyszczonego – NM), uprawiano hydroponicznie w ściśle kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej. Dodatkowo przeprowadzono porównawcze doświadczenia wzrostowe z użyciem gleby zebranej z naturalnych stanowisk występowania badanych populacji. Doświadczenia prowadzone były metodą kompletnej randomizacji w układzie:

- a) Doświadczenia w warunkach stresu ostrego (wysokie dawki metali, krótki czas działania, uprawy hydroponiczne):

-\ doświadczenie z użyciem kadmu:

0 (kontrola), 5, 15, 30, 50  $\mu\text{M}$  Cd  $\times$  populacje MB, MP, NM;

-\ doświadczenie z użyciem cynku:

0 (kontrola), 200, 400  $\mu\text{M}$  Zn  $\times$  populacje MB, MP, NM;

-\ doświadczenie z użyciem ołowiu:

0 (kontrola), 30, 60  $\mu\text{M}$  Pb  $\times$  populacje MB, MP, NM;

b) doświadczenie w warunkach stresu chronicznego (dłuższy czas działania w warunkach, uprawy roślin na glebie z naturalnych siedlisk):

-\ gleby NM, MP, MB  $\times$  populacje MB, MP, NM.

Przeprowadzono pomiary parametrów wzrostowych (biomasa korzeni i części nadziemnych, powierzchnia liści), oznaczono zawartość metali ciężkich i niskocząsteczkowych kwasów organicznych w roślinach oraz:

-/ w roślinach rosnących w warunkach stresu chronicznego lub ostrego, wywołanego toksycznością cynku lub ołowiu, analizowano wybrane metabolity wtórne i potencjał antyoksydacyjny,

-/ w roślinach rosnących w warunkach stresu ostrego wywołanego toksycznością kadmu, przeprowadzono analizę żywotności korzeni i oznaczono zawartość barwników fotosyntetycznych, proliny, glutationu oraz fitochelatyny.

Rośliny wszystkich populacji uprawiane hydroponicznie w obecności Cd wykazywały niższą zawartość barwników fotosyntetycznych i antocyjanów w porównaniu z roślinami rosnącymi w pożywkach bez kadmu. Natomiast większa żywotność korzeni oraz, zależny od dawki metalu, mniejsza redukcja biomasy części nadziemnych w roślinach populacji hałdowych (MP i MB), wskazuje na ich wyższą tolerancję kadmu w porównaniu z referencyjną populacją NM. Na wyższy poziom tolerancji populacji hałdowych wskazuje również mniejszą redukcję biomasy roślin uprawianych w obecności 200 lub 400  $\mu\text{M}$  Zn w pożywce (redukcja biomasy o 25-65% w porównaniu do kontroli – brak metalu) w porównaniu ze znaczącym spadkiem w populacji referencyjnej NM (redukcja biomasy o 80% w stosunku do kontroli).

W doświadczeniach hydroponicznych z dodatkiem ołowiu, podobnie stwierdzono wyższą tolerancję populacji hałdowych MB i MP (redukcja biomasy o 33-48% w stosunku do kontroli – brak metalu) w porównaniu z populacją referencyjną NM (redukcja biomasy o 58-75% w stosunku do kontroli).

Wyższa tolerancja na metale ciężkie hałdowych populacji MB i MP została również potwierdzona wynikami pomiarów biomasy w doświadczeniach glebowych.

Ze zróżnicowanym wpływem metali na wzrost roślin badanych populacji wiąże się różna zawartość metali akumulowanych w organach roślin. Różnice te wykazano

zarówno pomiędzy populacjami, jak i ze względu na sposób uprawy (hydroponiki lub doświadczenia glebowe).

W warunkach ostrego stresu w uprawach hydroponicznych stwierdzono istotnie wyższą akumulację kadmu, cynku i ołowiu w roślinach populacji hałdowych w porównaniu z populacją NM. Kadm gromadził się w znacznie większych stężeniach, zarówno w korzeniach, jak i pędach. Istotnie większe stężenia cynku stwierdzono tylko w częściach nadziemnych populacji hałdowych, co może świadczyć o łatwej translokacji tego pierwiastka do liści (współczynnik translokacji korzeń/liść 0,40 dla populacji MP, 0,65 dla populacji MB oraz 0,30 dla populacji NM). Miejscem deponowania ołowiu były natomiast korzenie (współczynnik translokacji korzeń/liść – 0,01-0,03). W warunkach wzrostu roślin w doświadczeniach glebowych długotrwały wzrost na glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi skutkował wyższą zawartością kadmu, cynku i ołowiu oraz żelaza w liściach roślin hałdowych MP i MB; w referencyjnej populacji miejscem akumulacji metali były korzenie. Wyniki te wskazują, że translokacja i wyższa zawartość metali w częściach nadziemnych roślin jest jednym z objawów zwiększonej tolerancji roślin populacji hałdowych na kadm, cynk i ołów.

Rośliny hałdowych populacji MB oraz MP, uprawiane w hydroponikach bez obecności metali, charakteryzował konstytutywnie niski poziom niskocząsteczkowych kwasów organicznych. Dodatek metalu do pożywki skutkował wzrostem ich akumulacji, zwykle nieprzekraczającym 10-krotności ich zawartości w próbie kontrolnej (bez metalu), np. w przypadku liści hałdowych populacji roślin traktowanych cynkiem lub ołowiem, czy korzeni roślin traktowanych ołowiem. Podobnie istotnie wyższą zawartość kwasów organicznych stwierdzono w korzeniach roślin hałdowych populacji traktowanych kadmem. Populację referencyjną NM traktowaną kadmem (30 lub 50  $\mu\text{M}$  Cd) charakteryzowała istotnie niższa zawartość kwasów organicznych w porównaniu do roślin hałdowych. Wpływ metali na wzrost akumulacji, m.in. kwasu cytrynowego w liściach, czy kwasu jabłkowego w korzeniach, został potwierdzony również w doświadczeniach glebowych. Jednak w warunkach stresu chronicznego nie obserwowano istotnych różnic w zawartości kwasów pomiędzy badanymi populacjami.

Obecność fitochelatyn, roślinnych peptydów zaangażowanych w wiązanie i transport metali ciężkich do wakuoli, stwierdzono jedynie w przypadku roślin uprawianych hydroponicznie w obecności kadmu. W roślinach pochodzących z doświadczenia glebowego oraz w roślinach uprawianych hydroponicznie traktowanych cynkiem lub ołowiem, zawartość tych peptydów były poniżej poziomu limitu detekcji. Powyższe

wyniki są potwierdzeniem doniesień innych autorów, wskazujących, że w stresie chronicznym fitochelatyny, jako kompleksy nietrwałe i o krótkim okresie stabilności (7-14 dni), pełnią mało znaczącą rolę w detoksykacji i kompartmentacji metali ciężkich, oraz że jony  $Zn^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  są znacznie mniej efektywnymi aktywatorami enzymu syntezy tych peptydów (Zenk 1996). W populacjach hałdowych największą zawartość fitochelatyn (300-400 nmol SH g<sup>-1</sup> ś.m.) wykrywano w roślinach traktowanych wyższymi (30, 50 μM) stężeniami kadmu. Inaczej w przypadku roślin populacji referencyjnej, gdzie najwyższą akumulację fitochelatyn (ponad 400 nmol SH g<sup>-1</sup> ś.m.) obserwowano w roślinach traktowanych 5 μM Cd, natomiast wyższe stężenie kadmu w pożywce (powyżej 15 μM) skutkowało istotnym zmniejszeniem zawartości fitochelatyn (100-200 nmol SH g<sup>-1</sup> ś.m.). Obserwowane różnice w akumulacji fitochelatyn w populacjach *E. vulgare* mogą świadczyć o roli tych związków tiolowych w zwiększaniu tolerancji populacji hałdowych na Cd. Nie stwierdzono, natomiast różnic między populacjami w ilości glutationu, który może być, obok fitochelatyn, związkiem kompleksującym jony metali ciężkich.

Wyżej opisane wyniki badań zostały przedstawione w pracach:

**Dresler S., Bednarek W., Wójcik M.** 2014. Effect of cadmium on selected physiological and morphological parameters in metalicolous and non-metallicolous populations of *Echium vulgare* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 332-338

**Dresler S., Rutkowska E., Bednarek W., Stanisławski G., Kubrak T., Bogucka-Kocka A., Wójcik M.** 2017. Selected secondary metabolites in *Echium vulgare* L. populations from nonmetalliferous and metalliferous areas. *Phytochemistry*, 133: 4-14

**Dresler S., Wójciak-Kosior M., Sowa I., Stanisławski G., Bany I., Wójcik M.** 2017. Effect of short-term Zn/Pb or long-term multi-metal stress on physiological and morphological parameters of metalicolous and nonmetallicolous *Echium vulgare* L. populations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 380-389

### **3. Optymalizacja metody elektroforezy kapilarnej do analizy metabolitów wtórnych występujących w roślinach *E. vulgare* oraz innych gatunkach rodziny *Boraginaceae***

Dotychczasowe badania wskazują, że ziele *E. vulgare* jest źródłem kwasu rozmarynowego (Kuruzüm-Uz i in. 2004), a korzeń pochodnej naftochinonu – szikoniny (Fedoreev i in. 1979). Bazując na tych informacjach przeprowadzono optymalizację analizy obu tych związków z użyciem metody HPCE. Ze względu na



różny charakter chemiczny obu związków, zastosowano dwa rodzaje ekstrahentów: heksan (szikonina) oraz mieszaninę metanol/woda (kwas rozmarynowy). Opracowana metoda pozwala analizować oba związki w krótkim czasie (3,5 minuty) przy poziomach limitu detekcji 0,603 ppm dla szikoniny i 0,270 ppm dla kwasu rozmarynowego. W toku dalszych badań metoda ta została nieznacznie zmodyfikowana (wydłużono czas analizy do 12 min, zmniejszono średnicę kapilary z 75  $\mu\text{m}$  do 50  $\mu\text{m}$  oraz obniżono pH buforu boranowego z 9,5 do 9,2). Modyfikacja metody pozwoliła zidentyfikować większą liczbę pików, na podstawie ich czasów retencji oraz podobieństwa (powyżej 99,9%) ich widm absorpcyjnych z wzorcami. Opracowana modyfikacja metody pozwoliła na wykazanie w materiale *E. vulgare* obecności alantoiny, rutyny, kwasu p-hydroksybenzoesowego, kwasu 3,4-dihydroksyhydrocynamonowego. Zmodyfikowana metoda została użyta do oceny ilościowej wybranych metabolitów oraz analizy chemometrycznej podobieństwa 17 gatunków z rodziny Boraginaceae. Wykazano, że obecność alantoiny jest cechą charakterystyczną dla roślin tej rodziny i, obok wcześniej już potwierdzonego jej występowania w *Symphytum officinale* L., związek ten wykrywano we wszystkich badanych gatunkach *Boraginaceae* w stężeniu osiagającym około 25,8  $\text{mg g}^{-1}$  p.s.m (powietrznie suchej masy) (*S. officinale*) oraz nawet 34,9  $\text{mg g}^{-1}$  p.s.m. u *Echium italicum* L. Również obecność kwasu rozmarynowego u wszystkich badanych gatunków została potwierdzona, a jego zawartość wynosiła od 1,2  $\text{mg g}^{-1}$  p.s.m. w liściach *Lithospermum officinale* L. do ponad 36  $\text{mg g}^{-1}$  p.s.m. w liściach *Pulmonaria mollis* Wulfen ex Hornem.

Wyżej opisane wyniki badań zostały przedstawione w pracach:

**Dresler S.**, Kubrak T., Bogucka-Kocka A., Szymczak G. 2015. Determination of shikonin and rosmarinic acid in *Echium vulgare* L. and *Echium russicum* J.F. Gmel. by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38: 698-701

**Dresler S.**, Szymczak G., Wójcik M. 2017. Comparison of some secondary metabolites content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharmaceutical Biology*, 55: 691-695

#### **4. Wpływ ekstremalnie niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na hałdach metalonośnych na zawartość wybranych metabolitów w roślinach i nasionach *E. vulgare***

Przeprowadzona analiza chemiczna metanolowych ekstraktów ziela i korzeni roślin *E. vulgare* zebranych z ich hałdowych stanowisk, wykazała istotny wpływ stresu środowiskowego na poziom akumulacji metabolitów wtórnych. Rośliny te zawierały istotnie większe stężenia szikoininy, alantoiny oraz kwasu p-hydroksybenzoesowego, natomiast mniejsze kwasu chlorogenowego i rutyny, w porównaniu z roślinami pozyskanymi z terenu niezanieczyszczonego. Na podstawie widm spektrometrii mas i widm absorpcyjnych (190-600 nm) otrzymanych w wyniku analiz z użyciem elektroforezy kapilarnej oraz ich porównania z widmami wzorców zidentyfikowano w roślinach *E. vulgare* 6 metabolitów wtórnych: alantoinę, szikoinę, kwas rozmarynowy, rutynę, kwas p-hydroksybenzoesowy oraz kwas chlorogenowy. Stwierdzono, że rośliny uprawiane w kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej w warunkach stresu chronicznego, na glebie zebranej z obszarów hałd metalonośnych, zawierały około 20-krotnie więcej alantoiny niż rośliny rosnące w glebie niezanieczyszczonej. Podobną zależność obserwowano w przypadku szikoininy oraz kwasu p-hydroksybenzoesowego. Także ostry stres wywołany dodatkiem cynku lub ołowiu do pożywki w uprawach hydroponicznych skutkowało zwiększeniem zawartości metabolitów wtórnych (alantoiny, kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego). Jednocześnie należy stwierdzić, że notowane zmiany zawartości wykrytych metabolitów wtórnych nie różniły się pomiędzy populacjami hałdowymi a populacją referencyjną. Zwiększonej zawartości tych metabolitów towarzyszył wzrost oznaczonego z użyciem DPPH oraz ABTS-u potencjału antyoksydacyjnego otrzymanych ekstraktów metanolowych.

Badane populacje zostały także porównane pod względem cech nasion (cechy morfometryczne, skład fitochemiczny) zebranych z roślin rosnących w miejscach ich naturalnego bytowania. Pomiary wykazały, że nasiona populacji hałdowych MP i MB były mniejsze w porównaniu z nasionami roślin referencyjnej populacji NM. Stwierdzono, że skład chemiczny nasion również różnicował badane populacje, szczególnie odróżniał populację hałdową MB od drugiej hałdowej MP oraz referencyjnej NM. Różnice te dotyczyły głównie zawartości kwasów tłuszczowych, których całkowita zawartość w populacji MB wynosiła 22,4% i była istotnie większa od zawartości w nasionach populacji NM (21,5%) oraz MP (21,7%). Jednocześnie

wykazano wyższy udział kwasów tłuszczowych nasyconych oraz jednonienasyconych w nasionach populacji MB (odpowiednio 15,6 i 20,0%) w porównaniu z nasionami populacji NM (odpowiednio 9,3 i 13,8%) oraz MP (odpowiednio 9,0 i 13,4%). Inaczej, nasiona roślin MB zawierały istotnie mniej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (63,6%) w stosunku do populacji NM (76,9%) i MP (77,4%). Nasiona populacji MB różniły się od nasion roślin NM oraz MP także niższą zawartością alantoiny oraz kwasu rozmarynowego.

Wyżej opisane wyniki badań zostały przedstawione w pracach:

**Dresler S.**, Bednarek W., Hawrylak-Nowak B., Wójcik M. 2017. Morphometric and phytochemical profile of seeds of metallicolous and nonmetallicolous *Echium vulgare* populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70: 304-310

**Dresler S.**, Rutkowska E., Bednarek W., Stanisławski G., Kubrak T., Bogucka-Kocka A., Wójcik M. 2017. Selected secondary metabolites in *Echium vulgare* L. populations from nonmetalliferous and metalliferous areas. *Phytochemistry*, 133: 4-14

##### **5. Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach roślin pochodzących z terenów skażonych metalami ciężkimi – na przykładzie populacji *E. vulgare***

Celem badań było porównanie znaczenia czterech technik analitycznych – wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE, ang. **H**igh-**P**erformance **C**apillary **E**lectrophoresis), chromatografii cienkowarstwowej (TLC, ang. **T**hin **L**ayer **C**hromatography), spektrometrii mas (MS, ang. **M**ass **S**pectrometry) i spektroskopii FTIR (ang. **F**ourier **T**ransform **I**nfrared **S**pectroscopy) w badaniu różnic fitochemicznych między roślinami populacji *E. vulgare* pochodzącymi z hałd metalonośnych oraz stanowiska referencyjnego niezanieczyszczonego metalami ciężkimi. W pracy przedstawiono opis procedury opracowania uzyskanych wielowymiarowych danych (m.in. wygładzenie sygnału, wyrównanie pików) i przeprowadzenia analizy chemometrycznej. Opracowano tzw. indeks zróżnicowania (DI, ang. **D**ifference **I**ndex) i przedstawiono jego praktyczne użycie w porównaniu populacji *E. vulgare* pochodzących z terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi oraz obszaru niezanieczyszczonego. W pracy wykorzystano także znane techniki chemometryczne wykorzystujące analizę skupień oraz analizę PCA (ang. **P**rincipal **C**omponent **A**nalysis). Chociaż wszystkie metody ujawniły fitochemiczne różnice, w

szczegółności między populacją NM a populacjami MB oraz MP, ich skuteczność w identyfikacji markerów dyskryminujących była różna i wzrastała w kierunku TLC>MS=HPCE>FTIR.

Wyniki badań zostały przedstawione w pracy:

**Dresler S.**, Kubrak T., Rutkowska E., Gagoś M., Bogucka-Kocka A., Świeboda R., Wójcik M. 2016. Comparison of analytical methods in chemometric fingerprinting of metallicolous and non-metallicolous populations of *Echium vulgare* L. *Phytochemical Analysis*, 27: 239-248

### **Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań**

Przeprowadzone badania, m.in. na populacjach *E. vulgare* zasiedlających obszary zanieczyszczone metalami ciężkimi oraz tereny nieskażone, przyczyniły się do wyjaśnienia niektórych mechanizmów adaptacyjnych roślin do wzrostu na obszarach ekstremalnie zanieczyszczonych metalami.

W szczególności wykazano że:

- a) Rośliny *E. vulgare* występujące na hałdach cynkowo-ołowiowych wykazywały utrwalony genetycznie wyższy poziom tolerancji na stres metali ciężkich w porównaniu z roślinami zasiedlającymi tereny niezanieczyszczone,
- b) Analiza markerów molekularnych badanych populacji ujawniła odrębność genetyczną populacji hałdowych; wysoki poziom zróżnicowania genetycznego tych populacji świadczy zarazem o ograniczonej selekcji podczas kolonizacji hałd metalonośnych,
- c) Na podstawie analizy zawartości metali ciężkich w roślinach rosnących w warunkach stresu chronicznego można sądzić, że podobnie jak w stresie ostrym, jednym z głównych mechanizmów tolerancji populacji hałdowych jest translokacja metali (Cd, Pb, Zn) do części nadziemnych. Mniej tolerancyjna populacja referencyjna zatrzymuje metale w korzeniu wg strategii wykluczania (excluder strategy),
- d) Translokacja metalu do części nadziemnych (Zn), jego akumulacja w korzeniach (Pb), czy też możliwość akumulacji dużych ilości w obu organach roślinnych (Cd) mogą być jednym z mechanizmów tolerancji roślin hałdowych do wzrostu w warunkach stresu ostrego,

- e) Niektóre metabolity wtórne *E. vulgare* mogą pełnić rolę w zwiększeniu tolerancji tego gatunku na metale ciężkie. Wykazano, że niekorzystne warunki środowiskowe panujące na hałdach metalonośnych lub chroniczny stres metali ciężkich, bardzo wydajnie indukowały syntezę tych metabolitów, zwłaszcza alantoiny i szikoniny. Zwiększoną akumulację metabolitów wtórnych (kwasów fenolowych oraz alantoiny) stwierdzono także u roślin uprawianych hydroponicznie w warunkach stresu ostrego wywołanego obecnością ołowiu lub cynku,
- f) Ekstremalnie niekorzystne warunki bytowania roślin populacji MB, istotnie różnicowały w ich nasionach skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość alantoiny i kwasu rozmarynowego,
- g) Fitochelatyny pełnią funkcję w detoksykacji kadmu w roślinach *E. vulgare*. Obserwowane różnice w ich zawartości, pomiędzy populacjami hałdowymi a populacją referencyjną, mogą wskazywać na pewną rolę fitochelatyn w wyższej tolerancji kadmu roślin populacji MB oraz MP,
- h) Wzrost zawartości kwasów organicznych w roślinach hałdowych populacji uprawianych w warunkach stresu ostrego wskazuje na możliwość udziału tych związków w adaptacji roślin populacji hałdowych do stresu metali ciężkich, prawdopodobnie jako transporterów metali do części nadziemnych roślin,
- i) Na podstawie przeprowadzonych analiz porównawczych różnych technik analitycznych wykazano, że techniki chemometryczne mogą być użyteczne w badaniu oraz identyfikacji populacji roślin pochodzących z terenów zanieczyszczonych, a skuteczność metod w wykrywaniu fitochemicznych markerów dyskryminujących była różna i wzrastała w kierunku TLC→MS=HPCE→FTIR,
- j) Opracowano metodę analizy metabolitów wtórnych (alantoiny, rutyny, szikoniny oraz kwasów fenolowych: kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego, kwasu p-hydroksybenzoesowego, kwasu dihydroksyhydrocynamonowego), która okazała się skuteczna w analizie 17 gatunków roślin rodziny Boraginaceae.

### **Możliwe zastosowania praktyczne wyników badań**

Badania procesów adaptacyjnych, zachodzących w zbiorowiskach roślin rosnących w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, poza znaczeniem poznawczym,

mogą mieć również ważne aspekty praktyczne dla nauk farmaceutycznych, rolnictwa i ochrony środowiska ponieważ:

-/ analizy fitochemiczne, **wykonywane z zastosowaniem prezentowanej w osiągnięciu naukowym metody**, umożliwiają ocenę badanych populacji pod względem zawartości związków biologicznie aktywnych a nawet identyfikację nowych, nieznanych dotąd metabolitów wtórnych, których synteza może być indukowana stresem metali ciężkich. Badania te mają szczególnie duże znaczenie w kontekście zwiększającego się zainteresowania znanymi już gatunkami roślin leczniczych w celu poszukiwania w nich nowych związków biologicznie czynnych wykorzystywanych w lecznictwie czy przemyśle spożywczym (źródło m.in. surowców do produkcji leków, składników odżywczych takich jak witaminy czy kwasy tłuszczowe, barwników spożywczych, konserwantów).

-/ poznanie podstaw zwiększonej tolerancji roślin z obszarów metalonośnych na ekstremalnie niekorzystne warunki środowiska może być użyteczne w tworzeniu nowych odmian o korzystnych cechach użytkowych (odporność na suszę, zasolenie, niską zasobność gleby w składniki pokarmowe czy zabiegi agrotechniczne). Ponadto, analizy fitochemiczne takich roślin są źródłem informacji dla przemysłu rolniczego i chemicznego o wykorzystaniu ich jako źródła naturalnych środków ochrony roślin, ponieważ metale ciężkie stymulują syntezę metabolitów wtórnych (fitoaleksyn) o właściwościach grzybo- czy bakterio-bójczych.

-/ ocena skażenia metalami ciężkimi roślin użytkowych zbieranych ze stanowisk metalonośnych pozwoli na określenie zagrożenia wynikającego z uprawy lub pozyskiwania roślin o potencjalnym znaczeniu w przemyśle czy rolnictwie. Wyniki badań powinny być upowszechniane wśród zamieszkującej zanieczyszczone tereny przemysłowe ludności, która w sąsiedztwie hałd metalonośnych uprawia pola i ogrody, a grzyby czy jagody do własnej konsumpcji lub na sprzedaż zbiera na hałdach.

### Literatura:

1. Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the responses of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643–654.
2. Bone E., Farres A. 2001. Trends and rates of microevolution in plants. *Genetica*, 112-113: 165-182.
3. Chin L., Leung D.W.M., Taylor H.H. 2009. Lead chelation to immobilized *Symphytum officinale* L. (comfrey) root tannins. *Chemosphere*, 76: 711-715.

4. 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 and Soil*, 297: 83-92.
5. Dresler S., Kubrak T., Rutkowska E., Gagoś M., Bogucka-Kocka A., Świeboda R., Wójcik M. 2016. Comparison of analytical methods in chemometric fingerprinting of metallicolous and non-metallicolous populations of *Echium vulgare* L. *Phytochemical Analysis* 27: 239-248
6. Fay M.F., Cowan R.S., Leitch I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany*, 95: 237-246.
7. Fedoreev S., Krivoshechekova O.E., Denisenko V.A., Gorovoi P.G., Maksimov O.B. 1979. Quinoid pigments of far eastern representatives of the family Boraginaceae. *Khimya Prirodnykh Soedinenii*, 5: 625-630.
8. Furze J.M., Rhodes M.J.C., Parr A.J., Robins R.J., Withehead I.M., Threlfall D.R., 1991. Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Reports*, 10: 111-114.
9. Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6838-6842.
10. Klemow K.M., Clements D.R., Threadgill P.F., Cavers P.B. 2002. The biology of Canadian weeds. 116. *Echium vulgare* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 82: 235-248.
11. Kováčik J., Klejdus B. 2008. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports*, 27: 605-615.
12. Kuruüzüm-Uz A., Güvenalp Z., Ströch K., Demirezer L.Ö., Zeeck A., 2004. Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 833-836.
13. Lavid N., Schwartz A., Yarden O., Tel-Or E. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta*, 212: 323-331.
14. Lee K.T., Yamakawa T., Kodama T., Shimomura K. 1998. Effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of belladonna. *Phytochemistry*, 49: 2343-2347.
15. Manara A. 2012. Plant responses to heavy metal toxicity. In: Furini A. (Ed.), *Plants and Heavy Metals*, Springer briefs in biometals. Springer, New York, 27-53.
16. Mengoni A., Barabesi C., Gonnelli C., Galardi F., Gabbrielli R., Bazzicalupo M. 2001. Genetic diversity of heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (*Caryophyllaceae*): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1319-1324.
17. Nasim A.S., Dhir B. 2010. Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 203: 139-149.

18. Nourimand M., Todd C.D. 2016. Allantoin increases cadmium tolerance in *Arabidopsis* via activation of antioxidant mechanisms. *Plant and Cell Physiology*, 57: 2485-2496.
19. Özcan T. 2008. Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 137: 155-171.
20. Rai V., Khatoon S., Bisht S.S., Mehrotra S. 2005. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *Chemosphere*, 61: 1644-1650.
21. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6: 1720-1731.
22. Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55: 35.
23. Wierzbicka M., Rostański A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 44: 7-19.
24. 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.
25. Wójcik M., Gonnelli C., Selvi F., Dresler S., Rostański A., Vangronsveld J. 2017. Metallophytes of serpentine and calamine soils their unique ecophysiology and potential for phytoremediation. In: Cuyper, A., Vangronsveld, J. (Eds.), *Advances in Botanical Research*, vol. 83. Academic Press, Elsevier, London. pp. 1-42, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2016.21.002>.
26. Zenk M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179: 21-30.
27. Zheng Z., Wu M. 2004. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Science*, 166: 507-514.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### a) Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów doktoranckich, w ramach wykonywanej pracy doktorskiej, prowadziłem badania środowiskowe nad **wpływem czynników fizyko-chemicznych gleby, zabiegów agrotechnicznych, oraz przebiegu pogody na występowanie mineralnych form azotu w glebie**. Przeprowadzone na terenie województwa lubelskiego badania zawartości azotu azotanowego i amonowego w glebie wskazały na istotny wpływ zabiegów agrotechnicznych, właściwości fizyko-chemicznych gleby oraz pory roku na rozmieszczenie obu form azotu w profilu gleby (0-90 cm). Stwierdzono, wysoką mobilność azotu azotanowego oraz możliwości wymycia tej formy z warstwy



0-60 cm w okresie jesienno-zimowym. Uzyskane wyniki zostały opublikowane i przedstawione w publikacjach: 2.A\* i 22.B zgodnie z załącznikiem 3. Ponadto brałem udział w badaniach prowadzonych w Katedrze Chemii Rolnej i Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem prof. dr. hab. Wiesława Bednarka. Badania dotyczyły głównie **oceny jakości produktów rolnych pod kątem zawartości m.in. metali ciężkich**. Przedmiotem badań była ocena jadalnych części roślin (m.in.: marchwi, ziemniaków, ogórków, kapusty białej, żyta ozimego, pszenicy ozimej, truskawek, jabłek) uprawianych na terenie województwa lubelskiego pod względem zawartości metali ciężkich (Pb, Cd, Ni, Zn, Cu, As, Hg). Dodatkowo przeprowadzono ocenę jakości ziemniaka i warzyw korzeniowych pod względem zawartości azotanów. Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 1.B; 2.B; 3.B; 4.B; 5.B; 6.B; 7.B; 8.B; 10.B. Przed obroną doktoratu brałem także udział w badaniach nad określeniem wpływu warunków meteorologicznych na plonowanie kupkówki pospolitej (9.B) oraz ocenie zaopatrzenia w siarkę roślin uprawnych (11.B).

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje: **11** oryginalnych recenzowanych prac eksperymentalnych (załącznik 3, pozycje 1.B-11.B), których sumaryczna liczba punktów MNiSW (wg ujednoliconego wykazu czasopism z dn. 26.01.2017) wynosi **147**.

#### **b) Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu w 2009 roku stopnia doktora nauk rolniczych w zakresie kształtowania środowiska (dyscyplina chemia środowiska) podjąłem pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Tutaj włączyłem się do prac zespołu badającego **fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy tolerancji roślin na stres metali ciężkich**. Badania były prowadzone na populacjach roślin zasiedlających silnie zanieczyszczone metalami ciężkimi hałdy pokopalniane i pohutnicze na obszarze Górnego Śląska. Obiektem badań były rośliny *Dianthus carthusianorum*, u którego w populacji z hałdy galmanowej w Bolesławiu koło Olkusza wykazano wyraźny dymorfizm w porównaniu z roślinami zebranymi z obszarów referencyjnych. Rośliny hałdowe były mniejsze, miały mniej liści w rozecie, ich liście były węższe i krótsze w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Dodatkowym dowodem

---

\* numer prac umieszczony w wykazie opublikowanych prac naukowych (Załącznik nr 3)

na wykształcenie odrębnego ekotypu (tzw. galmanowego) *D. carthusianorum* była analiza markerów molekularnych, która wskazała na istotne zróżnicowanie genotypowe między populacjami hałdową i referencyjną. Również doświadczenia hydroponiczne, przeprowadzone w kontrolowanych warunkach komór wegetacyjnych, wskazały na zróżnicowany poziom tolerancji na stres wysokich dawek Cd, Zn i Pb, znacznie wyższy w populacji *D. carthusianorum* z hałdy galmanowej w porównaniu z roślinami pochodzącymi z obszarów niezanieczyszczonych tymi metalami. Stwierdzono również, że zarówno fitochelatyny, jak i kwasy organiczne nie pełnią roli w zwiększonej tolerancji populacji hałdowej na stres nadmiaru badanych metali. Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w 5 publikacjach (załącznik 4, poz. 6.A; 11.A; 14.A; 20.A; 27.B).

Innym nurtem badań w których uczestniczyłem, były zagadnienia **wpływu egzogennych związków na łagodzenie skutków toksycznego działania metali ciężkich.**

Dodatek selenu (w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ ) do środowiska wzrostu roślin ogórka traktowanych kadmem w kulturach hydroponicznych wpływał pozytywnie na wzrost systemu korzeniowego, zmniejszał poziom peroksydacji lipidów oraz wpływał na wzrost stabilności błon komórkowych. Przeprowadzone badania pokazały ponadto, że selen znacząco ograniczał syntezę fitochelatyn u roślin traktowanych kadmem. Przyczyną takiego efektu mogło być podstawienie selenu w miejsce siarki w cysteinie (selenocysteina zamiast cysteiny), ważnym substracie w syntezie fitochelatyn.

Uczestniczyłem również w badaniu możliwości detoksykacji kadmu przez dodatek do środowiska wzrostu roślin ogórka jonów  $\text{Si}^{2+}$ . Obserwowane w tym przypadku zmniejszenie produkcji fitochelatyn mogło być spowodowane stwierdzonym ograniczeniem pobierania kadmu przez rośliny. Pomimo mniejszej akumulacji kadmu, zastosowanie krzemu nie wpływało na łagodzenie toksycznego wpływu kadmu na rośliny, chociaż w próbie kontrolnej (0  $\mu\text{M}$  Cd) krzem wykazywał korzystne działanie na wzrost roślin.

Analiza wpływu wybranych niskocząsteczkowych kwasów organicznych (kwasu jabłkowego, kwasu octowego) dodawanych do wzrostu roślin traktowanych kadmem, wykazała, że związki te w istotny sposób ograniczyły toksyczność kadmu. Rośliny uprawiane w obecności kadmu bez dodatku kwasów organicznych miały istotnie niższą zawartość barwników fotosyntetycznych, zawierały więcej nadtlenku wodoru oraz charakteryzowały się niższą aktywnością stożków wzrostu korzeni.

Badano również możliwość ograniczenia toksycznego działania miedzi przez dodanie do środowiska wzrostu roślin jasmonianu metylu. Należy on do fitohormonów i jako cząsteczka sygnałowa uczestniczy w odpowiedzi roślin na stres biotyczny i wywołane różnymi czynnikami stresi abiotyczne. Znaczenie jasmonianu w tych procesach związane jest z jego oddziaływaniem na enzymatyczny i nieenzymatyczny potencjał antyoksydacyjny. Do badań wykorzystano rośliny fasoli traktowane jasmonianem metylu a następnie poddane krótko- lub długotrwałemu działaniu miedzi w kulturach hydroponicznych. Oznaczenia enzymów systemu antyoksydacyjnego (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej) wykazały wzrost ich aktywności pod wpływem miedzi i niejednoznaczny wpływ jasmonianu na aktywację enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 8.A; 12.A; 15.A; 17.A.

Wyniki badań nad **zróznicowaną odpowiedzią roślin traktowanych kadmem lub miedzią zależnie od wieku liści**, zostały przedstawione w publikacjach: 5.A; 9.A. Wykorzystując charakterystyczny typ wzrostu liści roślin jednoliściennych, liście dzielono na trzy części, oznaczając je jako młode, dojrzałe i stare. Pod wpływem metali ciężkich stwierdzono zwiększoną akumulację kwasów organicznych w starszych fragmentach liści z istotnym zróznicowaniem między działaniem badanych metali. Kadm (100  $\mu\text{M}$  Cd) zwiększał zawartość kwasu cytrynowego, natomiast pod wpływem miedzi (50  $\mu\text{M}$  Cu) wzrastała zawartość kwasu bursztynowego i pirogronowego. Zawartość kwasu jabłkowego wzrastała istotnie pod wpływem stosowanych dawek obu metali. W badaniach zawartości w liściach niektórych nieenzymatycznych antyoksydantów glutationu (GSH/GSSG) i kwasu askorbinowego (L-AA/L-DHA) wykazano, że miedź, niezależnie od wieku badanego organu, wpływała 3-4- krotnie na wzrost zawartości L-AA. Metal ten zwiększał również akumulację GSH oraz GSSG w młodszych fragmentach liści. W obecności kadmu obserwowano natomiast zwiększoną akumulację GSH w starszych liściach i zmniejszenie jego zawartości w liściach młodych.

Wyniki badań przedstawionych w publikacjach 10.A i 18.A, dotyczą **zastosowania strontu jako induktora syntezy fitoestrogenów w roślinach soi *Glycine max* L. Merr.** Badania były prowadzone w dwóch kierunkach: oceny wpływu strontu na akumulację izoflawonów w roślinach soi oraz możliwości biofortyfikacji roślin soi tym pierwiastkiem. Ze względu na podobieństwo strontu do wapnia, pierwiastek ten w

organizmach zwierzęcych przejmuje funkcję wapnia i może być odkładany w układzie kostnym. Potwierdzono lecznicze (terapeutyczne) działanie organicznych związków strontu (ranelinian strontu) w leczeniu osteoporozy: korzystny wpływ na osteoblasty, przy jednoczesnym hamowaniu różnicowania się komórek w osteoklasty. Innym aspektem działania strontu jest jego wpływ na zawartość fitoestrogenów w roślinach. Znamioną cechą roślin soi jest zdolność do syntezy izoflawonów (genisteiny, daidzeiny, glicyteiny). Ze względu na strukturalne podobieństwo do żeńskich hormonów płciowych, związki te mają zdolność wiązania się z receptorami estrogenowymi. Cecha ta pozwala wykorzystywać izoflawony w leczeniu objawów menopauzy. Ponadto związki te mogą zapobiegać osteoporozie, działają hamująco na niektóre typy nowotworów lub mogą być stosowane w chorobach układu krążenia.

W wyniku przeprowadzonych badań nad możliwością wzbogacania roślin w korzystne ilości strontu stwierdzono, że stront jest łatwo akumulowany w częściach nadziemnych soi, osiągając współczynnik translokacji korzeń-liść (w zależności od stężenia strontu w pożywce) na poziomie od 7 do ponad 9. Najwyższą zawartość strontu ( $1,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.}$ ) oznaczono w liściach roślin uprawianych na pożywce zawierającej 3,0 mM strontu. Stwierdzono także korzystny wpływ strontu na zawartość izoflawonów w roślinach soi. Uprawa soi w pożywce zawierającej 2,0 mM strontu, zwiększała 2,7; 1,9, 3,8, oraz 2,9-krotnie zawartość odpowiednio daidzeiny, kumestrolu, genisteiny oraz formononetyny w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Ponieważ identyfikację i izolację roślinnych metabolitów wtórnych znacznie ułatwia zastosowanie metody elektroforezy kapilarnej, podjęto **badania metodyczne związane z optymalizacją rozdziału metabolitów roślinnych tą metodą.**

Wysokosprawna elektroforeza kapilarna jest dynamicznie rozwijającą się techniką rozdziału mieszanin chemicznych. Niewątpliwymi jej zaletami są niskie koszty analizy, wysoka sprawność, łatwość w przygotowaniu próbek, krótki czas analizy oraz szerokie spektrum zastosowania. Podstawą rozdziału elektroforetycznego jest zjawisko przepływu elektroosmotycznego. W przeciwieństwie do technik chromatograficznych, mobilność próbki w elektroforezie kapilarnej jest wynikiem przyłożenia wysokiego napięcia do końców wypełnionej buforem kapilary. Technika ta jest wykorzystywana w badaniach farmaceutycznych, biochemicznych oraz klinicznych. Umożliwia analizę zarówno związków organicznych (m.in.: węglowodanów, kwasów nukleinowych, roślinnych metabolitów wtórnych, białek), jak i jonów nieorganicznych. Wykorzystując technikę elektroforezy kapilarnej przeprowadzono optymalizację rozdziału związków

kumarynowych (eskulina, eskulatyna, dihydrokumaryna, umbeliferon) w korze *Aesculus hippocastanum* (L.), i *Juniperus communis* (L.) "Pendula" oraz w ziele *Cichorium intybus* (L.), i *Melilotus officinalis* (L.). Metoda charakteryzuje się dobrą powtarzalnością oraz rozdzielczością, a czas rozdziału nie przekracza 9 min. Metoda elektroforezy kapilarnej okazała się również użyteczna w oznaczaniu w roślinach zredukowanych oraz utlenionych nieenzymatycznych związków antyoksydacyjnych (glutationu – GSH, dwusiarczku glutationu – GSSG; kwasu askorbinowego – L-AA, kwasu dehydroaskorbinowego – L-DHA). Związki te uczestniczą w cyklu askorbinianowo-glutationowym prowadzącym do usuwania reaktywnych form tlenu. Opracowana metoda pozwala na jednoczesną analizę badanych związków zapewniając dobrą liniowość i powtarzalność. Dodatkowo umożliwia pomiar zawartości analitów w niewielkiej ilości próbki (np. we fragmencie liścia).

Opracowano również, z użyciem elektroforezy kapilarnej, metody analizy alkaloidów izochinolinowych w *Chelidonium majus* L. (cheleretryna, sangwiniaryna, berberyina, chelidonina), furanokumaryn (m.in. bergapten, izopimpinellina, ksantotoksyna) oraz substancji biologicznie aktywnych występujących w *Hypericum perforatum* L. (hiperycyna, hyperforyna, hiperozyd, rutyna, kwercetyna, kwas chlorogenowy).

Wyniki części opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 5.A; 16.A.

**Badania rolnicze związane m.in. z oceną jakości płodów rolnych pod względem zawartości metali ciężkich oraz określeniem wpływu czynników antropogenicznych i środowiskowych na plon i jakość gleby.** Badania były realizowane w ramach współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie. Problematyka badań obejmowała cztery główne zagadnienia:

1) *Wpływ agrotechniki i warunków uprawy na plonowanie i jakość roślin*

Celem badań było określenie wpływu przeprowadzonych zabiegów agrotechnicznych oraz czynników środowiskowych na plon roślin (owies, żyto ozime, jęczmień jary, pszenica jara, pszenica ozima, burak cukrowy, kupkówka pospolita) oraz określenie roli integrowanej produkcji na zawartość metali ciężkich w niektórych owocach. Badania obejmowały również analizę wybranych parametrów fizjologicznych rukoli siewnej, nawożonej różnymi dawkami azotu i potasu oraz zawartość frakcji azotu w kupkówce pospolitej, w zależności od przebiegu warunków meteorologicznych lub

nawożenia azotem. Badania dotyczyły także wpływu nawożenia mineralnego na wybrane parametry fizjologiczne rukoli siewnej lub zawartość różnych frakcji azotu w tymotce łąkowej.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 1.A; 13.A; 19.A; 9.B; 12.B; 13.B; 14.B; 15.B; 17.B; 18.B; 19.B; 20.B; 23.B;

2) *Ocena wpływu czynników agrotechnicznych i środowiskowych na wybrane właściwości fizyko-chemiczne gleby*

Badania koncentrowały się na przeglądzie jakości gleb uprawnych na Lubelszczyźnie oraz określeniu wpływu powodzi i zabiegów agrotechnicznych (nawożenie organiczne) na ich właściwości.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 3.A; 4.A; 7.A; 21.B; 28.B.

3) *Określenie stopnia zaopatrzenia roślin uprawianych na terenie Lubelszczyzny w makro- i mikroelementy*

Podjęte badania miały na celu ocenę stopnia zaopatrzenia w makro- i mikroelementy roślin uprawianych na terenie Lubelszczyzny. Badania zawartości mikro- i makroelementów dotyczyły takich upraw jak: pomidor, jabłoń oraz – w przypadku oceny zaopatrzenia roślin w siarkę – żyto ozime, pszenica ozima, ziemniaki, marchew, kapusta biała, ogórki, truskawka i jabłoń. Ocenie poddano również jakość nawozów organicznych pochodzących z regionu lubelskiego. Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach: 16.B; 24.B; 25.B; 26.B.

## 6. Dane bibliometryczne.

- a) Sumaryczny współczynnik oddziaływania (5-letni **Impact Factor** w roku 2015) czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta – **50,655**;  
(suma IF zgodnie z rokiem opublikowania – **44,929**)
- b) Sumaryczna liczba punktów MNiSW wg ujednoliconego wykazu czasopism z dn. 26.01.2017 za wszystkie publikacje habilitanta – **1037,5**
- c) Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science/Cited Reference Search) (w dniu 24.05.2017) – **148**
- d) Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science/Cited Reference Search) – **7**