



**dr inż. Ewa Muszyńska-Sadłowska**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Instytut Biologii  
Katedra Botaniki

## **AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM**

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

Warszawa, 2021

dr inż. Ewa Muszyńska-Sadłowska  
Katedra Botaniki, Instytut Biologii  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
e-mail: ewa\_muszynska@sggw.edu.pl



<https://orcid.org/0000-0003-0419-4597>

**I. IMIĘ I NAZWISKO:** Ewa Muszyńska-Sadłowska

**II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE — Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

- 2008      **Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,  
Instytut Botaniki, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin  
  
specjalność: **Biologia roślin**  
tytuł: **magister** (29. IX. 2008 r.)  
temat pracy: „*Procesy embriologiczne w zalążkach *Lepidium rudera*le w warunkach skażonego siedliska poboczy szlaków komunikacyjnych*”  
promotor: prof. dr hab. Romana Izmałłow
- 2010      **Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie**,  
Wydział Ogrodniczy, Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin  
  
specjalność: **Ogrodnictwo z marketingiem**  
tytuł: **inżynier** (15. I. 2010 r.)  
temat pracy: „*Wykorzystanie roślin w celu remediacji skażeń środowiska*”  
promotor: dr inż. Ewa Hanus-Fajerska
- 2011      **Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie**,  
Wydział Ogrodniczy, Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin  
  
specjalność: **Ogrodnictwo z marketingiem**  
tytuł: **magister inżynier** (21. VI. 2011 r.)  
temat pracy: „*Walory zdobnicze i ocena możliwości produkcji rodzimych gatunków roślin kwiatowych przydatnych w technikach remediacji*”  
promotor: dr inż. Ewa Hanus-Fajerska
- 2015      **Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie**,  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Instytut Biologii Roślin  
i Biotechnologii, Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin  
  
dyscyplina: **Ogrodnictwo**  
specjalność: **Botanika**  
stopień: **doktor nauk rolniczych** (15. XII. 2015 r.)  
temat pracy: „*Efektywność zastosowania roślin galmanowych w fitoremediacji*”  
promotor: dr hab. inż. Ewa Hanus-Fajerska

Ważniejsze kursy i szkolenia

- 2005 – 2007    **Studium Pedagogiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**  
Uzyskanie kwalifikacji pedagogicznych do nauki przyrody oraz biologii
- 2013    **Szkolenie „Nowe środki ulepszania gleby do redukcji zanieczyszczeń i rewitalizacji ekosystemu glebowego”.** Kraków, 28.11.2013 r.
- 2018    **Warsztaty “Sustainable remediation and rehabilitation of contaminated sites”,** The Central and Eastern European Conference on Health and the Environment (CEECH). Kraków, 10.06.2018 r.
- 2018    **Udział w badaniach i szkolenie z zakresu lokalizacji metali ciężkich** w materiale roślinnym za pomocą S(T)EM-EDX. Wrocławskie Centrum Badań EIT+ (obecnie Sieć Badawcza Łukasiewicz - Polski Ośrodek Rozwoju Technologii we Wrocławiu).
- 2019    **Symposium “Współczesne techniki mikroskopowe w obrazowaniu materii biologicznej”.** Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie, 15.03.2019 r.


**III. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

- X.2015 – III.2016    **Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin**  
*Laborant* w laboratorium kultur *in vitro*, mikroskopowym, analitycznym i anatomiczno- cytologicznym
- III.2016 – IX.2016    **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Botaniki**  
*Starszy referent techniczny* w laboratorium ultramikrotomowym, kultur *in vitro*, i in.
- X.2016 – IX.2018    **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Botaniki**  
*Asystent naukowo-dydaktyczny*
- X.2018 – aktualnie    **Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa i Biologii/Instytut Biologii, Katedra Botaniki**  
*Adiunkt naukowo-dydaktyczny*


**IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 219 UST. 1 PKT 2 LIT. B USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2020 R. POZ. 85 Z PÓŻN. ZM.)****a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 219 ust. 1 pkt 2 lit. b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) jest cykl ośmiu powiązanych tematycznie artykułów zatytułowany „**Strategie adaptacyjne wybranych pseudometalofitów do wzrostu w obecności pierwiastków metalicznych**”.


**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego** (przy każdej pozycji podano wskaźnik *Impact Factor* (IF) zgodny z rokiem opublikowania, pięcioletni IF oraz punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) według ujednoliconego wykazu czasopism obowiązującego w roku publikacji).

**P1. Muszyńska E.** , Labudda M. 2019. Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology—From Negative to Beneficial Impact on Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 3117. DOI: 10.3390/ijms20133117


**IF<sub>2019</sub> = 4,556; IF<sub>5-year</sub> = 4,653, liczba punktów MNiSW – 140**

**P2. Muszyńska E.** , Labudda M., Różańska E., Hanus-Fajerska E., Koszelnik-Leszek A. 2019. Structural, physiological and genetic diversification of *Silene vulgaris* ecotypes from heavy metal-contaminated areas and their synchronous *in vitro* cultivation. *Planta*, 249: 1761-1778. DOI: 10.1007/s00425-019-03123-4


**IF<sub>2019</sub> = 3,39; IF<sub>5-year</sub> = 3,687, liczba punktów MNiSW – 100**

**P3. Muszyńska E.** , Labudda M., Kamińska I., Górecka M., Bederska-Błaszczak M. 2019. Evaluation of heavy metal-induced responses in *Silene vulgaris* ecotypes. *Protoplasma*, 256 (5): 1279-1297. DOI: 10.1007/s00709-019-01384-0

**IF<sub>2019</sub> = 2,751; IF<sub>5-year</sub> = 2,772, liczba punktów MNiSW – 70**


**P4. Muszyńska E.** , Labudda M. 2020. Effects of lead, cadmium and zinc on protein changes in *Silene vulgaris* shoots cultured *in vitro*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204: 111086. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111086

**IF<sub>2019</sub> = 4,872; IF<sub>5-year</sub> = 4,967; liczba punktów MNiSW – 100**

**P5. Muszyńska E.** , Labudda M., Kral A. 2020. Ecotype-specific pathways of reactive oxygen species deactivation in facultative metallophyte *Silene vulgaris*

(Moench) Garcke treated with heavy metals. *Antioxidants*, 9 (2): 102. DOI: 10.3390/antiox9020102


**IF<sub>2019</sub> = 5,014; IF<sub>5-year</sub> = nie dotyczy, liczba punktów MNiSW – 100**

**P6. Muszyńska E.** , Labudda M., Różańska E., Hanus-Fajerska E., Znojek E. 2018. Heavy metal tolerance in contrasting ecotypes of *Alyssum montanum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161: 305-317. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.075

**IF<sub>2018</sub> = 4,527; IF<sub>5-year</sub> = 4,967; liczba punktów MNiSW – 30**

**P7. Muszyńska E.**, Labudda M., Hanus-Fajerska E. 2019. Changes in proteolytic activity and protein carbonylation in shoots of *Alyssum montanum* ecotypes under multi-metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 232: 61-64. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.013

**IF<sub>2019</sub> = 3,013; IF<sub>5-year</sub> = 3,615; liczba punktów MNiSW – 100**

**P8. Muszyńska E.** , Tokarz K., Dziurka M., Labudda M., Dziurka K., Piwowarczyk B. 2021. Photosynthetic apparatus efficiency, phenolic acid profiling and pattern of chosen phytohormones in metal-tolerant and intolerant *Alyssum montanum* ecotypes. *Scientific Reports*, 11: 4135. DOI: 10.1038/s41598-021-83695-y

**IF<sub>2019</sub> = 3,998; IF<sub>5-year</sub> = 4,576; liczba punktów MNiSW – 140**

 autor korespondencyjny

Wszystkie prace, składające się na osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane w czasopismach z bazy *Journal Citation Reports*. Ich sumaryczny **Impact Factor (IF)** zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **32,121** (suma IF 5-letniego 29,142), sumaryczna **liczba punktów MNiSW – 780**, zaś liczba cytowań (na dzień 13.02.2021) według Web of Science **64**, Scopus **73**, Google Scholar **87**.

We wszystkich wyżej wymienionych publikacjach jestem pierwszym autorem, a w siedmiu dodatkowo autorem korespondencyjnym. Byłam autorem koncepcji badań, pełniłam wiodącą rolę w planowaniu, organizacji i wykonaniu doświadczeń, a także w modyfikacji i doskonaleniu metod badawczych. Byłam również autorem graficznych i statystycznych opracowań wyników, interpretacji danych doświadczalnych oraz odpowiadałam za przygotowanie tekstów prac do publikacji.

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

**V. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA, O KTÓRYM MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT 2 LIT. B USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2020 R. POZ. 85 Z PÓŹN. ZM.)*****Wprowadzenie w tematykę badawczą***

Metale ciężkie są naturalnym i wszechobecnym elementem różnych ekosystemów, jednakże ich podwyższona zawartość w środowisku jest skutkiem działalności człowieka, która prócz zamierzonych korzystnych efektów, jest jedną z głównych przyczyn niepożądanych zmian ekologicznych zachodzących w otaczającym nas świecie. Chociaż w ostatnich latach termin „metale ciężkie” jest powszechnie spotykany w literaturze (Słomka i in. 2012; Kisa i in. 2016; Terrón-Camero i in. 2019), dotychczas nie powstała jego jedna obowiązująca definicja. Najczęściej pojęcie to odnosi się do grupy metali i metaloidów związanych z zanieczyszczeniem, potencjalną toksycznością lub ekotoksycznością. Autorzy klasyfikują w obrębie metali ciężkich pierwiastki w zależności od ich gęstości, masy i liczby atomowej, właściwości chemicznych lub na podstawie innych przesłanek (Muszyńska i Labudda 2019). Pomimo różnorodności istniejących definicji, do metali ciężkich zalicza się: chrom (Cr), cynk (Zn), kadm (Cd), miedź (Cu), nikiel (Ni), ołów (Pb), rtęć (Hg) oraz metaloidy - arsen (As) i selen (Se) (Nagajyoti i in. 2010). Niektóre spośród wymienionych pierwiastków, takie jak Cr, Cu, Ni czy Zn są mikroelementami warunkującymi prawidłowy przebieg wielu procesów metabolicznych, ale też mogą wykazywać szkodliwe działanie, kiedy ich stężenie w komórce przekroczy wartości fizjologiczne. Przeciwnie, Cd, Hg czy Pb uważane są wyłącznie za toksyczne (balastowe) i zbędne dla metabolizmu. Bez względu na znaczenie biologiczne, te najbardziej rozpowszechnione obecnie zanieczyszczenia nieorganiczne mogą rozprzestrzeniać się na duże odległości przez wiatr, wody powierzchniowe i gruntowe oraz zwierzęta roślinożerne, stanowiąc poważne zagrożenie dla różnych poziomów sieci troficznych (Phillips i in. 2015; Karmakar i Padhy 2019). Co więcej, wiele pierwiastków metalicznych pozostaje w środowisku przez bardzo długi czas. W glebach klimatu umiarkowanego okres półtrwania wynosi od 75 do 380 lat dla Cd i od 1000 do 3000 lat dla Cu, Ni, Pb, Zn i Se (Kabata-Pendias 2011). Z tego powodu wymienione ksenobiotyki są uważane za trwałe (czyli nieulegające biodegradacji), można je jednak częściowo usunąć z obszaru, w którym się kumulują, dzięki naturalnej zdolności niektórych gatunków roślin do ich intensywnego pobierania z roztworu glebowego poprzez korzenie lub pochłaniania zanieczyszczonych pyłów z powietrza przez powierzchnię liści (Muszyńska i Hanus-Fajerska 2015; Chandra i Kumar 2017).

Obecnie, jednymi z najsilniej zanieczyszczonych metalami ciężkimi terenami są miejsca historycznego lub/i aktualnego wydobycia oraz przetwarzania rud metali. Najwięcej

tego typu nieużytków przemysłowych położonych jest w południowej części Polski – na Wyżynie Śląsko-Krakowskiej, gdzie zlokalizowane są rudy Zn i Pb oraz na Dolnym Śląsku, gdzie eksploatuje się rudy Ni. Powstające w wyniku działalności przetwórczej nadpoziomowe składowiska odpadów górniczych i hutniczych, zwane popularnie hałdami, często porośnięte są jedynie znikomą roślinnością lub jej zupełnie pozbawione. Głównym czynnikiem ograniczającym spontaniczne zasiedlanie zdeponowanych odpadów przez rośliny naczyniowe jest wysoka zawartość metali ciężkich w podłożu, których toksyczność wiąże się z negatywnym oddziaływaniem na budowę struktur komórkowych oraz na przebieg licznych procesów życiowych, jak fotosynteza, transpiracja, podziały komórkowe (Dresler i in. 2014; Krzesłowska i in. 2019; Tokarz i in. 2020). Samoistny rozwój pokrywy roślinnej utrudnia także niska polowa pojemność wodna, brak materii organicznej, niska zawartość składników mineralnych w podłożu, silne nasłonecznienie i intensywne wiatry (Wierzbička i Rostański 2002; Przedpeńska i Wierzbička 2007). Pomimo występowania licznych czynników ograniczających funkcjonowanie roślin na hałdach, w długotrwałym procesie sukcesji może dochodzić do samorzutnej odbudowy roślinności i wykształcenia unikatowych zbiorowisk (Szarek-Łukaszewska i Grodzińska 2008; Kasowska i Koszelnik-Leszek 2014; Wąsowicz i in. 2014). Wśród występujących tam gatunków wyróżnia się (i) metalofity fakultatywne (pseudometalofity), czyli taksony spotykane zarówno na stanowiskach o podwyższonym tle metalicznym, jak i w siedliskach nieskażonych, oraz (ii) metalofity obligatoryjne zdolne do wzrostu jedynie na podłożach metalonośnych (Bothe i Słomka 2017). Natomiast ze względu na rodzaj złoża mineralnego, zbiorowiska metalofitów występujące na glebach ubogich głównie w azot i fosfor i jednocześnie zasobnych w Zn, Pb, Cd noszą nazwę roślinności galmanowej, podczas gdy gleby o niskiej zawartości fosforu, potasu i wapnia oraz wysokiej koncentracji Ni, Cr, Co porasta roślinność serpentynitowa (Żołnierz 2007; Cabała 2009; Muszyńska i in. 2015).

Metalofity w drodze ewolucji wykształciły wewnątrzkomórkowe mechanizmy umożliwiające im tolerowanie ponadnormatywnych stężeń pierwiastków metalicznych w komórkach. Strategię tę realizują poprzez detoksykację szkodliwych jonów i ich kompartmentację w miejscach bezpiecznych dla metabolizmu. Do ważnych ligandów cytoplazmatycznych odpowiadających za chelatowanie i neutralizację jonów metali zalicza się fitochelatyny, glutation, aminokwasy czy kwasy organiczne. Ich rolę w odpowiedzi na stres wykazano między innymi u *Silene vulgaris* (van Hoof i in. 2001), *Dianthus carthusianorum* (Wójcik i in. 2015), licznych przedstawicieli rodzaju *Alyssum* (Broadhurst i in. 2004). Z kolei, sekwestracja nadmiaru metali może mieć miejsce w wakuoli, pęcherzykach diktiosomalnych

czy retikulum endoplazmatycznym (Wierzbicka i Potocka 2002; Saraswat i Rai 2011). Jony mogą być także wycofywane do starzejących się liści, włosków bądź usuwane poza organizm za pomocą gruczołów wydzielniczych, co obserwowano np. u *Alyssum murale* i *A. corsicum* (Broadhurst i in. 2004), *Biscutella laevigata* (Wierzbicka i in. 2017), *Thlaspi caerulescens* (Wójcik i in. 2005). Możliwość egzystencji roślin w określonym środowisku jest również uzależniona od zdolności organizmu do naprawy uszkodzeń wywołanych stresem. Z metalami ciężkimi nieodzownie związany jest stres oksydacyjny, powstający w wyniku zaburzenia równowagi procesów oksydacyjno-redukcyjnych przebiegających w żywych tkankach. W konsekwencji dochodzi do nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT), których nagromadzenie może prowadzić do utleniania białek (karbonylacji), lipidów (peroksydacji), kwasów nukleinowych, sacharydów, barwników fotosyntetycznych i innych (Anjum i in. 2015; Ali i in. 2018; Salas-Moreno i in. 2019). Aby zapobiec negatywnym skutkom wywołanym przez podwyższoną zawartość RFT, rośliny aktywują system obrony antyoksydacyjnej, który obejmuje syntezę niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy (antyoksydantów). Wśród nich na szczególną uwagę zasługują związki fenolowe, gdyż prócz bezpośredniego neutralizowania RFT, niektóre z nich wykazują zdolność do chelatowania jonów metali, jak również uczestniczą w formowaniu grubszej mechanicznej bariery w postaci zlignifikowanej ściany komórkowej zabezpieczającej przed penetracją toksycznych jonów do protoplastu (Sharma i in. 2012; Kisa i in. 2016). Obrona organizmu przed nadmiarem RFT polega także na aktywacji specyficznych enzymów przeciwutleniających. Podstawową triadę antyoksydacyjną tworzą (i) dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), odpowiedzialne za katalizowanie reakcji dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego w nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), (ii) katalazy (CAT) rozkładające cząsteczki  $H_2O_2$ , oraz (iii) peroksydazy (POD), obejmujące m. in. peroksydazę gwajakolową (GOPX), glutationową (GPX) oraz askorbinianową (APX), redukujące  $H_2O_2$  przy jednoczesnym utlenianiu innych substancji (Gill i Tuteja 2010; Ali i in. 2018).

W przeciwieństwie do ogromnego postępu badań nad biosyntezą białek o różnej roli w odpowiedzi roślin na metale, mechanizmy ich degradacji pozostają nadal nierozszyfrowane, choć wiadomo, że czynniki stresowe modyfikują metabolizm tych makrocząsteczek. Pierwiastki metaliczne nie tylko wywołują stres oksydacyjny, który sprzyja denaturacji białek, ale także zakłócają proces fałdowania nowo tworzonych cząsteczek, wchodzą w interakcje z ich grupami sulfohydrylowymi lub też wypierają niezbędne jony z miejsc ich wiązania, co zmienia strukturę i funkcjonalność białek (Salas-Moreno i in. 2019; Terrón-Camero i in. 2019). Uszkodzone lub niepotrzebne białka są następnie kierowane na drogę proteolizy, która może przebiegać na dwóch różnych szlakach – wakuolarnym, niezależnym od ATP,



realizowanym głównie przez endoproteinazy oraz pozawakuolarnym, wymagającym nakładów energii z udziałem proteasomu (Polge i in. 2009). Proteoliza umożliwia zatem utrzymanie odpowiedniego poziomu białek wewnątrz komórki poprzez usuwanie niefunkcjonalnych cząsteczek oraz podaż aminokwasów niezbędnych do syntezy nowych białek, a także innych związków. Z tego względu, poznanie procesów proteolitycznych roślin o różnym poziomie tolerancji na metale ciężkie może okazać się pomocne w lepszym zrozumieniu przystosowań organizmów do warunków stresowych, które często wymagają szybkiej przebudowy proteomu.

### ***Cel badań***

Nadrzędnym celem publikacji, wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego, było wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw adaptacji *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) i *Alyssum montanum* (Brassicaceae) do wzrostu i rozwoju na podłożach wzbogaconych w metale ciężkie. W szeroko zakrojonych interdyscyplinarnych badaniach, realizowanych z wykorzystaniem różnych metod analitycznych, szczególną uwagę poświęciłam ocenie komórkowego stanu redoks i zdolności antyoksydacyjnych wybranych pseudometalofitów, rosnących zarówno w warunkach naturalnych, jak i laboratoryjnych. Zagadnienie to stanowi nowatorskie podejście do zjawiska tolerancji, gdyż niewiele wiadomo na temat systemu antyoksydacyjnego u badanych gatunków, jak również o przemianach proteolitycznych u metalofitów *sensu lato*. Określenie mechanizmów konstytutywnych i swoistych dla poszczególnych ekotypów stanowi zatem przyczynek do poznania odpowiedzi na pytanie czy można mówić o wspólnym podłożu reakcji roślin na metale ciężkie. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty z dziedziny nauk biologicznych nakierowane były na śledzenie procesów, zachodzących na różnych poziomach organizacji organizmów, co pozwoliło na lepsze zrozumienie przystosowań roślin do podwyższonej zawartości pierwiastków metalicznych w środowisku wzrostu. Tak sformułowany problem badawczy umożliwił uzyskanie wyników, które mogą przyczynić się również do udoskonalenia dostępnych metod oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń nieorganicznych.

### **Szczegółowe zadania badawcze obejmowały:**

1. Wykazanie wielokierunkowości działania pierwiastków metalicznych podczas reakcji roślin na potencjalny czynnik stresowy.
2. Określenie poziomu zróżnicowania osobników *Silene vulgaris* porastających hałdy galmanowe i serpentynitowe oraz obszar nieskażony metalami ciężkimi.

3. Opracowanie modelowego układu doświadczalnego do prowadzenia badań nad mechanizmami adaptacyjnymi ekotypów *S. vulgaris* w ujednoliconych warunkach *in vitro*.
4. Identyfikację strukturalno-metabolicznych zmian w kulturach pędowych *S. vulgaris* poddanych krótko- i długotrwałej ekspozycji na jony Pb i Ni.
5. Porównanie mechanizmów funkcjonowania roślin *S. vulgaris* i *A. montanum* uprawianych w warunkach stresu chronicznego spowodowanego obecnością mieszaniny jonów Cd, Pb i Zn w pożywce:
  - a) wyznaczenie strategii akumulacji metali ciężkich oraz ich wpływu na parametry wzrostu kultur;
  - b) ocena poziomu uszkodzeń oksydacyjnych białek i lipidów;
  - c) określenie roli enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w reakcji poszczególnych gatunków i ich ekotypów na aplikowane jony;
  - d) powiązanie aktywności enzymów proteolitycznych z potencjalnymi mechanizmami radzenia sobie z toksycznością metali ciężkich.

### **Opis uzyskanych wyników**

#### **Ad 1. Wykazanie wielokierunkowości działania pierwiastków metalicznych podczas reakcji roślin na potencjalny czynnik stresowy**

**W pracy P1** przeprowadzono szczegółowe studium literaturowe dotyczące metali ciężkich jako interesującej grupy pierwiastków śladowych o dualistycznej roli w funkcjonowaniu organizmów żywych. Z jednej strony bowiem, niektóre metale ciężkie stanowią mikroelementy niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, podczas gdy znaczenie biologiczne innych jest niekorzystne lub wręcz toksyczne. Co więcej, skutki działania pierwiastków metalicznych są zależne od dawki i nawet mikroelementy mogą wywołać efekty fitotoksyczne, które w prezentowanej pracy wykazano dla zróżnicowanych taksonomicznie grup – od cyanobakterii aż po rośliny wyższe. Szczególną uwagę zwrócono na udział metali śladowych w zwiększaniu odporności roślin na różne czynniki stresowe, takie jak zasolenie, pierwiastki toksyczne, susza. Na podstawie analizy najnowszej literatury stwierdzono, że aplikacja wybranych pierwiastków, np. Mn, Zn, Ni, może przyczynić się do łagodzenia negatywnych skutków działania innych stresorów, m.in. poprzez stymulację mechanizmów przywracających homeostazę redoks i neutralizujących szkodliwy metyloglioksal w komórkach. Wpisując się w nurt badań nad zjawiskiem hormezy wykazano, że w przypadku określonych taksonów, niewielkie stężenia pierwiastków balastowych mogą korzystnie oddziaływać na procesy morfo-fizjologiczne i zapewniać roślinom ochronę przed

wyższą dawką czynnika stresowego (tego samego lub innego typu). Odpowiedź hormetyczna może zatem stanowić strategię, dzięki której organizmy aklimatyzują się do trudniejszych warunków, co prowadzi do specjacji w procesie ewolucyjnym. W tym kontekście omówiono występowanie unikatowych zbiorowisk roślin metalotolerancyjnych na obszarach o podwyższonym tle metalicznym, które wykształciły różnorodne mechanizmy akumulacji i detoksykacji metali ciężkich, umożliwiające im przetrwanie w skrajnie nieprzyjnym środowisku.

Podsumowując, omówiony artykuł prezentuje nowe spojrzenie na koncepcję stresu metalicznego i w myśl stwierdzenia Paracelsusa „*Omnia sunt venena, nihil est sine veneno. Sola dosis facit venenum*” stworzył podwaliny teoretyczne pod dalsze prace eksperymentalne nad poznaniem i porównaniem reakcji różnych ekotypów tego samego gatunku na metale ciężkie.

#### **Ad. 2. Określenie poziomu zróżnicowania osobników *Silene vulgaris* porastających hałdy galmanowe i serpentynitowe oraz obszar nieskażony metalami ciężkimi**

W badaniach, których wyniki opublikowano w **pracy P2**, wykorzystano rośliny *S. vulgaris* Moench (Garcke) z rodziny *Caryophyllaceae*, występujące w ich naturalnych środowiskach. Materiał do analiz stanowiły liście pobrane z osobników reprezentujących populację galmanową Olkuskiego Rejonu Rudnego (hałda w Bolesławiu, woj. małopolskie; oznaczona dalej jako GAL), populację serpentynitową (hałda w Wirkach, woj. dolnośląskie; oznaczona dalej jako SER) oraz populację referencyjną (Niemetalotolerancyjną w stosunku do Metali, oznaczoną dalej jako NM), porastającą obszar niezanieczyszczony metalami ciężkimi (murawa w Zielonce koło Warszawy, woj. mazowieckie). Oceniono cechy morfologiczne i anatomiczne liści, a także parametry fizjologiczne (w tym zawartość barwników fotosyntetycznych, całkowita zawartość metabolitów wtórnych i wybranych grup związków fenolowych), biochemiczne (aktywność enzymów GPX, SOD, GOPX, CAT) oraz markery genetyczne polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *ang.* restriction fragments length polymorphism).

Wykazano, że liście ekotypu GAL są węższe i krótsze w porównaniu do liści pozostałych ekotypów, jednakże ich grubość jest podobna do liści ekotypu SER i znacznie większa niż NM. Różnice te wynikały z większej objętości komórek miękiszu asymilacyjnego, którego formę palisadową i gąbczastą stwierdzono jedynie w ekotypie GAL. Najwięcej aparatów szparkowych zaobserwowano w liściach osobników NM, zaś najmniej - w liściach GAL, w których dodatkowo średnia liczba aparatów była porównywalna po obu stronach

blaszki. Obserwowane cechy budowy liści roślin metalotolerancyjnych świadczą o ich przystosowaniach kserotermicznych, które mogą odgrywać istotną rolę w pobieraniu i translokacji jonów metali przemieszczających się wewnątrz organów z prądem transpiracyjnym.

Ocena parametrów fizjologicznych i biochemicznych ujawniła kolejne różnice pomiędzy ekotypami metalotolerancyjnymi i materiałem referencyjnym. Najwyższą zawartością chlorofilu *a*, *b* i karotenoidów charakteryzowały się liście NM, pośrednią – liście GAL, zaś najniższą liście SER. Podobnie, liście NM akumulowały najwięcej związków fenolowych, jednakże ich zdolność do dezaktywacji wolnego rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego) była stosunkowo niska. Przeciwnie, ogólna zawartość metabolitów wtórnych (z co najmniej jednym wiązaniem podwójnym w cząsteczce), fenylopropanoidów i flawonoli w ekotypach metalotolerancyjnych pozostała na porównywalnym poziomie (niższym niż u NM). Wynik ten może sugerować istnienie podobnych szlaków ich syntezy/degradacji funkcjonujących w populacjach GAL i SER, a także wskazywać na działanie innych związków w odpowiedzi metalotolerancyjnych osobników *S. vulgaris* na warunki środowiskowe. Przeprowadzone badania wskazały na potencjalne znaczenie SOD, której aktywność była trzykrotnie wyższa w liściach GAL i SER niż w liściach NM, podczas gdy aktywność GPX wykazywała odwrotną tendencję. Z kolei, aktywność CAT była porównywalna u NM i GAL oraz NM i SER. Poszczególne ekotypy najsilniej różnicowała aktywność GOPX, której najwyższą aktywność na poziomie około  $841 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$  stwierdzono w liściach SER, pośrednią w liściach NM ( $467 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ), zaś najniższa w liściach GAL ( $188 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). Stwierdzono, że neutralizowanie RFT u naturalnie występujących osobników ekotypie GAL opiera się na współdziałaniu SOD i CAT, w ekotypie SER bazuje na wspólnej aktywności SOD i GOPX, zaś ekotyp NM wyróżnia się przede wszystkim zwiększoną akumulacją w liściach nieenzymatycznych antyoksydantów.

Zróznicowanie genotypowe między populacjami hałdowymi i populacją referencyjną wykazała analiza molekularna markerów RFLP. Na podstawie pracy Welch i in. (2006), do badań wytypowano geny mitochondrialne *atpA* (GenBank: DQ422872) i *coxI* (GenBank: DQ422877), których amplikony zostały pocięte za pomocą następujących enzymów restrykcyjnych -*AluI* i *MspI* w przypadku *atpA* oraz *DdeI* i *MspI* dla *coxI*. Populacje GAL i SER różnią się od NM, co zostało ujawnione po trawieniu restrykcyjnym amplikonu podjednostki alfa syntazy ATP (*atpA*) przez endonukleazę *MspI*. Nie zaobserwowano natomiast polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych w odniesieniu do endonukleazy *AluI* oraz trawienia amplifikowanego fragmentu *coxI* za pomocą *MspI* i *DdeI*.

### **Ad. 3. Opracowanie modelowego układu doświadczalnego do prowadzenia badań nad mechanizmami adaptacyjnymi ekotypów *S. vulgaris* w ujednoliconych warunkach *in vitro***

Wielopłaszczyznowe zróżnicowanie naturalnie występujących populacji *S. vulgaris* przyczyniło się istotnie do podjęcia próby opracowania ujednoliconych warunków uprawy dla wszystkich trzech badanych ekotypów. Do tego celu wykorzystano techniki kultur *in vitro* ze względu na możliwość wykluczenia licznych interakcji, które mogłyby zaburzyć jednoznaczność efektu działania badanego czynnika (Dubert i Płazek 2007). Z tego względu, **w pracy P2** zaproponowano modelowy układ do prowadzenia kultury pędowej oraz kultury kalusa z myślą o dalszych badaniach zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym, np. nad namnażaniem cennych genotypów do bezpośredniego zastosowania w fitoremediacji i rekultywacji obszarów poprzemysłowych bądź nad selekcją linii odpornych na metale.

Materiał do inicjacji kultur stanowiły nasiona pozyskane z osobników reprezentujących przebadane populacje. Opracowano optymalny czas powierzchniowej dekontaminacji nasion, a także zbadano wpływ oświetlenia na ich kiełkowanie. Następnie, apikalne fragmenty uzyskanych sterylnie siewek wyłożono na pożywkę MS (Murashige i Skoog 1962), wzbogaconą w różne kombinacje regulatorów wzrostu i rozwoju z grupy auksyn i cytokinin. Skład fitohormonów modyfikowano aż do momentu ustalenia identycznej dla wszystkich ekotypów reakcji morfogenetycznej, aby wykluczyć potencjalne efekty oddziaływania innych związków, które mogłyby zaburzyć poprawne wnioskowanie na temat mechanizmów tolerancji *S. vulgaris* na metale ciężkie. Jednocześnie, zoptymalizowano protokół inicjacji i prowadzenia kultury kalusa, testując jako eksplantaty pierwotne liścienie, hipokotyle i całkowicie rozwinięte liście izolowane z aseptycznie uzyskanych siewek/pędów. Kultury utrzymywano zarówno na świetle, jak i w ciemności na pożywkach MS lub B5 (Gamborg i in. 1968) z dodatkiem różnych stężeń i kombinacji 6-benzyloaminopuryny (BA), kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i kwasu naftylooctowego (NAA).

Badania wykazały najwyższą zdolność kiełkowania nasion ekotypu NM, która osiągnęła około 90%, podczas gdy nasiona ekotypu GAL kiełkowały niezależnie od warunków świetlnych w 53-58%. Podobną do GAL zdolność kiełkowania posiadały nasiona ekotypu SER na świetle, zaś w ciemności wartość ta uległa obniżeniu o prawie 20%. Niskie wartości tego parametru u ekotypów metalotolerancyjnych sugerowały zaburzenia przebiegu procesów embriologicznych, co stanowiło dodatkową przesłankę do podjęcia działań zmierzających ku opracowaniu efektywnej metody klonalnej propagacji.

Najbardziej wyrównany wzrost i tempo namnażania badanych ekotypów stwierdzono na pożywce MS wzbogaconej w  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA i  $0,25 \text{ mg l}^{-1}$  BA. Z tego względu, pożywkę tę uznano za optymalną do prowadzenia kultury pędowej podczas dalszych doświadczeń. Co więcej, namnożone pędy NM, GAL i SER ukorzeniono w obecności tych samych regulatorów wzrostu, ale o zredukowanym do 1/3 składzie makro- i mikroelementów. Następnie uzyskane mikrorośliny skutecznie zaaklimatyzowano do uprawy *ex vitro* w ziemi ogrodniczej oraz w ziemi ogrodniczej z dodatkiem podłoża galmanowego lub podłoża serpentynitowego w zależności od ekotypu.

Pomimo zastosowania różnych eksplantatów do inicjacji kultury kalusa, jedynie w pełni wykształcone liście, pochodzące z ustabilizowanych kultur pędowych, zareagowały na warunki hodowli. Chociaż najlepiej proliferującą tkankę kalusa zaobserwowano na pożywce MS wzbogaconej w  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA i  $5,0 \text{ mg l}^{-1}$  BA, sam proces indukcji i namnażania zależał od orientacji fragmentów liści na pożywce. W przypadku gdy odosiowa powierzchnia blaszki liściowej stykała się z pożywką, wówczas niezależnie od warunków świetlnych 100% eksplantatów GAL i SER podejmowało rozwój. Z kolei, odwrotna orientacja eksplantatu prowadziła do obfitszego wytwarzania kalusa w ciemności niż na świetle. Analiza histologiczna kalusa ujawniła różnice w jego tempie wzrostu i zdolnościach morfogenetycznych, wskazując na silniejszą heterogeniczność budowy kalusa GAL w ciemności niż na świetle, i odwrotnie dla ekotypu SER. Biorąc pod uwagę ekotyp NM, inicjację kalusa i nieznaczny wzrost tkanki uzyskano niezależnie od warunków świetlnych i orientacji eksplantatów, ale po trzech tygodniach stwierdzono postępującą nekrozę komórek i zahamowanie proliferacji kultury.

#### **Ad. 4. Identyfikacje strukturalno-metabolicznych zmian w kulturach pędowych**

##### ***S. vulgaris* poddanych krótko- i długotrwałej ekspozycji na jony Pb i Ni**

Opracowanie ujednoliconego protokołu mikrorozmnażania kultury pędowej ekotypów *S. vulgaris* było pierwszym etapem kierowanego przeze mnie projektu badawczego, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 1, pt. „Zastosowanie metod obrazowania mikroskopowego do określenia strukturalno-metabolicznej odpowiedzi kontrastujących ekotypów *Silene vulgaris* na metale ciężkie” (DEC-2017/01/X/NZ8/00382, okres realizacji: 2017-2018). Wyniki z realizacji II etapu zadania, obejmującego przede wszystkim ocenę metabolizmu oksydacyjnego przy użyciu technik mikroskopii elektronowej, świetlnej i konfokalnej przedstawiono w pracy P3.

W eksperymencie, apikalne fragmenty pędów poszczególnych ekotypów wykładano na zoptymalizowaną pożywkę wzbogaconą w  $33 \mu\text{M Pb(NO}_3)_2$  lub  $1 \text{ mM NiSO}_4$ . Zastosowane stężenia odpowiadały koncentracjom rozpuszczalnych form tych metali w miejscu naturalnego występowania ekotypu GAL i SER, odpowiednio. Po 24 h (stres krótkotrwały) i po 28 dniach (stres długotrwały) od traktowania metalami, przeprowadzano wizualizację RFT oraz nieenzymatycznych składników systemu antyoksydacyjnego – glutationu i związków fenolowych. Ponadto, przeanalizowano rozmieszczenie metali ciężkich w komórkach i tkankach. Mapowanie pierwiastków metalicznych na poziomie ultrastrukturalnym zostało wykonane w ramach mojego czynnego uczestnictwa w zewnętrznym zleceniu dla Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ (obecnie Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii), które finansowane było z projektu. Zastosowane metody obrazowania mikroskopowego wzbogacono o spektrofotometryczną analizę zawartości  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oznaczenie stopnia peroksydacji lipidów oraz zawartości związków fenolowych, zaś kondycję kultur wyznaczono w oparciu o zawartość barwników fotosyntetycznych i pomiar fluorescencji chlorofilu *a*.

Podczas eksperymentu, nie udało się uzyskać witalnej kultury pędowej żadnego z ekotypów na pożywce zawierającej  $1,0 \text{ mM NiSO}_4$ , a ukorzenianie pędów przed traktowaniem  $\text{Ni}^{2+}$  pozostawało bez wpływu na reakcję roślin. Z kolei, aplikacja Pb skutkowała silnym ograniczeniem namnażania i wzrostu kultur NM, które korelowało z zaburzeniami funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego pod wpływem metali zlokalizowanych w blaszce liściowej. Przeciwnie, liczba nowo zregenerowanych pędów GAL i SER oraz ich generalna kondycja fizjologiczna nie różniła się pomiędzy kulturą kontrolną i traktowaną Pb, chociaż jony tego pierwiastka powodowały skrócenie pędów i wzrost zawartości ich suchej masy u ekotypu SER. W konsekwencji, wyliczony na podstawie biomasy współczynnik tolerancji wzrostu (GTI) obniżył się dla NM i SER pod wpływem ekspozycji na Pb oraz istotnie wzrósł do ponad 140% dla GAL.

Reakcja morfo-fizjologiczna kultur poszczególnych ekotypów związana była ze specyficznym nagromadzeniem RFT w tkankach, które zmieniało się wraz z upływem czasu trwania eksperymentu. Po 24 h najwyższy poziom RFT, oceniony za pomocą metod mikroskopowych, wykazano w komórkach liści GAL niezależnie od podanego metalu, jednakże tylko w traktowaniu Pb stwierdzono wówczas obecność  $\text{H}_2\text{O}_2$  na terenie ścian komórkowych. Podobną lokalizację RFT obserwowano w pędach SER rosnących na pożywce z dodatkiem Ni, podczas gdy w liściach NM traktowanych metalami oraz w kulturach kontrolnych nie zanotowano wzmożonej produkcji RFT. Odwrotną tendencję ujawniono

po 28 dniach hodowli w obecności Pb, kiedy pędy NM charakteryzowały się najwyższą zawartością RFT (w tym także koncentracją  $H_2O_2$ ), pędy SER – pośrednią, zaś pędy GAL – najniższą. Wynik ten sugeruje regulacyjną rolę RFT, które uruchamiają kaskadę sygnałową u osobników metalotolerancyjnych, prowadzącą do aktywacji wewnątrzkomórkowych mechanizmów obronnych, zanim jeszcze toksyczne jony zostaną przetransportowane do istotnych metabolicznie miejsc. Jedną ze strategii funkcjonującą u SER (a także u NM) mogła być wzmożona synteza związków fenolowych pod wpływem czynnika stresowego, podczas gdy specyficzna reakcja GAL opierała się na akumulacji zredukowanego glutationu (GSH) w cytoplazmie komórek miększu palisadowego, którego nie obserwowano w mezofilu liści pozostałych ekotypów. Co ciekawe, lokalizacja GSH korespondowała z lokalizacją metali ciężkich w komórkach GAL, co wskazuje na zaangażowanie GSH w tworzenie kompleksów unieczynnających nadmiar szkodliwych jonów na terenie protoplastu.

**Ad. 5. Porównanie mechanizmów funkcjonowania roślin *S. vulgaris* i *A. montanum* uprawianych w warunkach stresu chronicznego spowodowanego obecnością mieszaniny jonów Cd, Pb i Zn w pożywce**

Ze względu na trudności w ustaleniu subletalnej dawki jonów Ni, w kolejnym etapie prac eksperymentalnych zastosowano jedynie mieszaninę metali ciężkich występujących w odpadach po flotacji i przeróbce rud cynkowo-ołowiowych. W celu narażenia badanych ekotypów na stres chroniczny, rozumiany jako co najmniej kilkutygodniowa ekspozycja na stosunkowo niskie stężenia substancji toksycznych, kultury utrzymywano przez okres ośmiu tygodni na pożywkach wzbogaconych jednocześnie w  $714,3 \mu M ZnSO_4$ ,  $3,0 \mu M Pb(NO_3)_2$  i  $16,4 \mu M CdCl_2$ . Aplikowane stężenia ustalono na podstawie badań własnych oraz przeglądu literatury, wskazujących potencjalną dostępność metali w podłożu hałdy w Bolesławiu (Godzik 1993; Muszyńska i in. 2013) i określono dalej jako  $1 \times HMs$ . Dodatkowo, w kolejnych próbach dawki Zn, Pb i Cd zwiększono 2,5- i 5-krotnie względem stężeń wyjściowych (opisane dalej odpowiednio jako  $2,5 \times HMs$  oraz  $5 \times HMs$ ). Każdorazowo, materiał kontrolny stanowiły kultury określonego ekotypu prowadzone na pożywce propagacyjnej bez dodatku jonów metali ciężkich.

W prezentowanym bloku eksperymentalnym, oprócz *S. vulgaris*, wykorzystano także *Alyssum montanum* (*Brassicaceae*) jako materiał służący do międzygatunkowego porównania mechanizmów tolerancji funkcjonujących u wybranych przedstawicieli rodzimej flory galmanowej. Gatunek ten wytypowano na podstawie doświadczeń prowadzonych w ramach mojej rozprawy doktorskiej, w której wykazano stymulujący wpływ niskich stężeń jonów Cd



i Pb aplikowanych oddzielnie na wzrost i organogenezę w warunkach *in vitro*. Kulturę pędową galmanowego ekotypu *A. montanum* (oznaczoną jako M) założono z nasion osobników populacji porastającej ponad 100-letnią hałdę Olkuskiego Rejonu Rudnego, podczas gdy kulturę ekotypu niemetalotolerancyjnego (oznaczoną jako NM) wyprowadzono z nasion zebranych na obszarze nieskażonym w Pińczowie koło Kielc. Ze względu na brak spontanicznego występowania tego gatunku na hałdach serpentynitowych, ekotyp ten został pominięty. Pędy M i NM utrzymywano na pożywkach wzbogaconych w takie same stężenia Zn, Pb i Cd, jakie zastosowano dla kultur *S. vulgaris*.

Znaczną część badań nad *A. montanum* zrealizowano w ramach projektu przyznanego w wewnętrznym trybie konkursowym na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie, pt. „Reakcja dwóch kontrastujących ekotypów *Alyssum montanum* na podwyższony poziom metali ciężkich” (nr 505-10-011100-P00136-99, rok realizacji 2017).

**Wyniki badań przedstawiono w pięciu pracach eksperymentalnych** (dwie z nich – **P4, P5** dotyczyły *S. vulgaris*, zaś trzy – **P6, P7 i P8** – *A. montanum*):

**a) wyznaczenie strategii akumulacji metali ciężkich oraz ich wpływu na parametry wzrostu kultur**

**W pracy P4** stwierdzono, że zawartość metali balastowych w pędach wszystkich ekotypów *S. vulgaris*, uprawianych w obecności  $1\times$  HMs, nie tylko osiągnęła progi fitotoksyczności, które wahają się od 25 do 30 ppm dla Pb i od 5 do 20 ppm dla Cd (Kabata-Pendias 2011), ale w przypadku Pb znacznie je przekroczyła. Oznaczone zawartości tego pierwiastka wynosiły około 180 ppm w pędach NM, 90 ppm – u GAL i niecałe 80 ppm – u SER. Zastosowanie mikroanalizy rentgenowskiej podczas obserwacji w elektronowym mikroskopie skaningowym, potwierdziło jego najwyższe stężenie spośród lokalizowanych metali ciężkich zarówno w wiązce przewodzącej jak i w powierzchniowych warstwach liści (**praca P5**). Co więcej, w pędach GAL i SER traktowanych metalami zaobserwowano trzykrotnie wyższą koncentrację Zn w porównaniu do kontroli, podczas gdy w pędach NM tendencja ta była odwrotna i nie osiągnęła stężenia toksycznego. Biorąc zatem pod uwagę akumulację Zn i Pb, można stwierdzić, że w pędach osobników metalotolerancyjnych obniżenie zawartości Pb jest skorelowane ze wzrostem zawartości Zn, zaś w pędach NM akumulacja Pb przyczynia się do ograniczenia pobierania Zn z pożywki i może prowadzić do dodatkowych konsekwencji wynikających z zaburzenia odżywienia mineralnego roślin.

Niekontrolowanemu napływowi toksycznych jonów do pędów NM towarzyszyła zmniejszona akumulacja Zn, P, Cu i Mo (**praca P4**), a także niezależnie od zastosowanej dawki metali dezintegracja organelli komórkowych, obniżenie zawartości barwników fotosyntetycznych oraz parametrów morfologicznych (średniej liczby i długości namnożonych pędów, ich świeżej i suchej masy) i obliczonej wartości GTI (**praca P5**). Przeciwnie, pędy ekotypu SER traktowane  $1\times$  HMs charakteryzowały się lepszym odżywieniem mineralnym niż pędy kontrolne i tylko zawartość Mn i Mo spośród 12 analizowanych pierwiastków ulegała obniżeniu. Pomimo tego, w kulturach SER stwierdzono najniższą wartość współczynnika GTI, która wynosiła 53%. Dodatkowo, w **pracy P5** wykazano, że oprócz średniej liczby zregenerowanych pędów SER z jednego eksplantatu, która w traktowaniu  $1\times$  HMs była porównywalna do kontroli, długość namnożonych pędów i zawartość chlorofilu *a* i *b* zmniejszały się stopniowo wraz ze wzrostem zastosowanych dawek metali. W konsekwencji, zastosowanie najwyższego stężenia metali ( $5\times$  HMs) przyczyniło się do całkowitego obumarcia kultury SER. Jednocześnie, biorąc pod uwagę stosunkowo nieliczne zaburzenia ultrastrukturalne, występujące w komórkach liści osobników SER rosnących na pożywce z dodatkiem  $1\times$  HMs można przypuszczać, że ograniczenie wzrostu pędów w tym traktowaniu związane było z wysokimi kosztami energetycznymi poniesionymi na walkę ze stresem, którego negatywne efekty pojawiły się dopiero powyżej tej dawki.

Zastosowanie stężenia odpowiadającego zawartości metali w warunkach naturalnych stymulowało rozwój kultury GAL i skutkowało wzrostem wartości GTI do prawie 140%. Co więcej, namnażanie pędów oraz ich średnia długość, jak i zawartość świeżej i suchej masy osiągnęły w traktowaniu  $1\times$  HMs istotnie wyższe wartości niż w traktowaniu kontrolnym, zaś zawartość barwników nie różniła się znacząco między tymi obiektami. Dopiero wyższe dawki metali powodowały ograniczenie morfogenezy, chociaż zaburzenia ultrastrukturalne w komórkach liści osobników rosnących na pożywce wzbogaconej w  $2,5$  i  $5\times$  HMs obserwowano sporadycznie. Niespotykaną wśród innych ekotypów cechą ultrastruktury komórek GAL było tworzenie stromuli, czyli długich wypustek otoczki chloroplastu wypełnionych stromą, które rozciągały się w kierunku innych chloroplastów, mitochondriów lub jądra komórkowego. Pomimo że funkcja stromuli nie jest jeszcze w pełni poznana, przypuszcza się, iż zmniejszają one dystans między poszczególnymi organellami, a tym samym ułatwiają transport cząsteczek lub substancji sygnałowych, takich jak  $H_2O_2$  czy kwas salicylowy między poszczególnymi przedziałami komórkowymi (Brunkard i in. 2015). Stromule mogą również uczestniczyć w procesach starzenia poprzez usuwanie zdegradowanych białek chloroplastowych poza obręb tych organelli (Gregersen i in. 2008).

Nie można zatem wykluczyć, że obie wymienione przyczyny leżą u podstaw formowania stromuli przez chloroplasty GAL, szczególnie jeśli pod uwagę zostaną wzięte wyniki badań dotyczących akumulacji  $H_2O_2$  w pędach traktowanych jedynie Pb (praca P3) lub też procesy proteolityczne opisane poniżej w pracy P4.

Podobnie jak w przypadku *S. vulgaris*, w **pracy P6** wykazano, że ekotyp NM *A. montanum* zakumulował wyższą zawartość Pb i Cd w pędach niż ekotyp M tego gatunku, co mogło być bezpośrednią przyczyną obserwowanych silnych zaburzeń morfogenetycznych osobników testowych, przejawiających się ograniczeniem namnażania pędów, chlorozami i drobnieniem liści, a także zmianami w ultrastrukturze ich komórek. Z kolei, w pędach osobników M odnotowano wyższą niż u NM zawartość Zn, którego antagonistyczne działanie z toksycznymi jonami mogło redukować negatywne skutki stresu. Dodatkowo, histochemiczna lokalizacja metali ciężkich ujawniła intensywne zabarwienie komórek epidermy i włosków tylko w przypadku liści M, co świadczyło o sekwestracji nadmiaru metali na ich terenie. Rolę ochronną mogły również pełnić spontanicznie zregenerowane korzenie przybyszowe. Ich liczba była jednak istotnie wyższa u osobników M niż NM. Hipotezę tę potwierdza obliczony współczynnik translokacji, który dla większości metali nie przekroczył wartości 1. Pomimo tego, zaobserwowano silne skrócenie pędów i ograniczenie przyrostu biomasy obu ekotypów. W konsekwencji, zanotowano obniżenie współczynnika tolerancji wzrostu (GTI) pędów do około 60%. Wyższe stężenia metali w pożywce niż odpowiadające zawartościom spotykanym w naturalnym środowisku wzrostu (tzw.  $2,5\times$  HMs i  $5\times$  HMs) powodowały całkowite zahamowanie proliferacji i elongacji pędów obu ekotypów *A. montanum*, dlatego zaniechano dalszych doświadczeń z ich wykorzystaniem (dane niepublikowane).

#### **b) ocena poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek**

Zmianom morfologiczno-strukturalnym u ekotypów NM *S. vulgaris* i *A. montanum* traktowanych  $1\times$  HMs towarzyszył wzrost w zawartości związków, będących produktami utleniania lipidów i białek (**praca P4-P7**). Przeciwnie, w pędach galmanowych ekotypów obu gatunków rosnących na pożywce z dodatkiem  $1\times$  HMs poziom peroksydacji lipidów był porównywalny do kontroli, a nawet niższy niż w kontroli w przypadku kultur *S. vulgaris* utrzymywanych na pożywce wzbogaconej w  $2,5\times$  HMs. Z kolei, w pędach osobników SER *S. vulgaris* stwierdzono stopniowy wzrost peroksydacji lipidów wraz ze wzrostem zastosowanych dawek metali. Biorąc pod uwagę karbonylowe modyfikacje białek, u metalotolerancyjnych ekotypów *S. vulgaris* różnice pomiędzy pędami kontrolnymi

i zregenerowanymi w obecności  $1\times$  HMs były statystycznie nieistotne, podczas gdy karbonylacja białek u osobników *M. A. montanum* wzrastała pod wpływem metali ciężkich.

Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić o wydajniejszych mechanizmach antyoksydacyjnych, funkcjonujących w ekotypach metalotolerancyjnych *S. vulgaris* niż *A. montanum*, skoro nagromadzenie RFT nie przyczyniło się u tego pierwszego gatunku do istotnego wzrostu utleniania białek, których karbonylacja wymaga intensywniejszego stresu oksydacyjnego niż peroksydacja lipidów (Anjum i in. 2015).

### **c) określenie roli enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w reakcji poszczególnych gatunków i ich ekotypów na aplikowane jony**

Pomimo że mechanizmy tolerancji na metale stanowią jedno z najchętniej podejmowanych obecnie zagadnień badawczych, sposoby neutralizacji RFT jako podstawa adaptacji do trudnych warunków nie zostały dotychczas porównane między przedstawicielami różnych gatunków zasiedlającymi te same nisze ekologiczne ani też opisane dla ekotypów tego samego gatunku reprezentujących odmienne siedliska.

Badania nad *S. vulgaris* wykazały, że niezależnie od ekotypu zawartość karotenoidów, proliny i związków fenolowych była raczej porównywalna lub niższa w pędach rosnących w obecności  $1\times$  i  $2,5\times$  HMs niż w pędach kontrolnych (**praca P5**). Wyjątek stanowiła zawartość polifenoli, których zbliżony wzrost akumulacji u NM i SER obserwowano w obu traktowaniach, podczas gdy ich koncentracja w pędach GAL na pożywce  $1\times$  HMs osiągnęła najwyższe wartości. Wnioskowano zatem, że w przypadku *S. vulgaris* analizowane niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające nie są zaangażowane w reakcję roślin na stres. Jedynie gromadzenie flawonoli i antocyjanów w odpowiedzi na obie dawki pierwiastków metalicznych, jak również fenylopropanoidów i proliny pod wpływem  $1\times$  HMs może stanowić cechę specyficzną dla ekotypu GAL. Poszczególne ekotypy najsilniej różnicowała aktywność enzymatycznych składników systemu antyoksydacyjnego. Analiza składowych głównych potwierdziła, że w reakcję na  $1\times$  HMs zaangażowane są przede wszystkim enzymy z grupy peroksydaz (POD). Jednakże u GAL i SER funkcję ochronną pełniła GOPX, wspomagana przez peroksydazy działające w pH 6.8 i 8.8, podczas gdy u NM – aktywność wykazywała jedynie APX, wspomagana przez transferazę S-glutationową (GST), związaną z przemianami glutationu, której aktywność u ekotypów metalotolerancyjnych była wówczas całkowicie zahamowana. Wzrost aktywności wyłącznie APX i GST zanotowano również w pędach SER eksponowanych na  $2,5\times$  HMs. Biorąc jednak pod uwagę zaburzenia wzrostu, zarówno kultury SER w tym traktowaniu, jak i kultury NM niezależnie od dawki metali, można sądzić,

że mechanizm obronny oparty na obu wymienionych enzymach jest niewystarczający do skutecznego przeciwdziałania negatywnym skutkom stresu. Co ciekawe, aktywność APX nie zmieniała się istotnie w pędach GAL rosnących w obecności metali, podczas gdy aktywność GST była niższa niż w kontroli. Przeciwnie, zwiększona i porównywalna aktywność CAT pod wpływem obu dawek metali wydaje się być cechą specyficzną dla tego ekotypu metalotolerancyjnego.

W odróżnieniu od *S. vulgaris*, odpowiedź kultur *A. montanum* nie była związana z enzymami antyoksydacyjnymi, takimi jak CAT, GPX, GST, których aktywność niezależnie od ekotypu zmniejszała się w pędach traktowanych metalami w porównaniu do kontroli (**praca P6**). Odwrotną zależność wykazywała jedynie GOPX, chociaż histochemiczna lokalizacja CAT i POD ujawniła obecność obu enzymów w komórkach liści. W analizach mikroskopowych CAT wykryto głównie na terenie miękiszu palisadowego, podczas gdy POD zlokalizowano w komórkach miękiszu gąbczastego. Uzyskane dane w połączeniu z analizą aktywności enzymatycznej sugerowały obecność нефunkcjonalnych cząsteczek CAT w tkankach, których inhibicja mogła być wynikiem nadprodukcji RFT lub zmian w konformacji białka pod wpływem stresu metalicznego/oksydacyjnego. Reakcja *A. montanum* na metale zależała od akumulacji związków fenolowych. W kulturach M odnotowano nie tylko istotnie wyższy poziom fenylopropanoidów i flawonoli niż u NM, ale dodatkowo ich zawartość wzrosła odpowiednio o 13% i 24% pod wpływem 1× HMs, podczas gdy u NM pozostała na niezmiennym poziomie. Aby zatem dowiedzieć się więcej o roli fenoli w odpowiedzi *A. montanum* na metale, przeprowadzono dalszą szczegółową analizę ich przemian, której rezultaty opublikowano w **pracy P8**. W badaniach stwierdzono istotny wzrost akumulacji kwasu *trans*-cynamonowego – prekursora wielu związków fenylopropanoidowych w pędach M traktowanych metalami. Jego zawartość była dodatnio skorelowana z aktywnością amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL), kluczowego enzymu biorącego udział w początkowym etapie biosyntezy fenoli. Powstający kwas cynamonowy ulegał następnie przekształceniom do kwasu *p*-kumarowego i w dalszych reakcjach do flawonoli. Kwasy hydroksycynamonowe wydawały się jednak pozostawać bez większego wpływu na odpowiedź *A. montanum*, zaś odporność ekotypu M na metale była uwarunkowana wzrostem zawartości pochodnych kwasu hydrobenzoesowego o wysokiej aktywności przeciwutleniającej. W konsekwencji, ich wzmożona synteza zapewniła skuteczną ochronę aparatu fotosyntetycznego, którego wydajność pozostała na porównywalnym w stosunku do kontroli poziomie. Z kolei, w kulturach NM zidentyfikowano dwufunkcyjny PAL (tzw. PTAL),

wykorzystujący tyrozynę jako substrat do produkcji kwasu *p*-kumarowego lub fenyloalaninę przekształcaną w kwas cynamonowy, którego podwyższonej akumulacji względem kontroli nie obserwowano jednak w pędach traktowanych metalami. Dalsze losy kwasu *p*-kumarowego u NM także były odmienne niż w ekotypie M, gdyż nie prowadziły do syntezy flawonoidów, a najprawdopodobniej do tworzenia innych związków drugorzędowych (np. lignin i lignanów), ograniczających przemieszczanie się metali z komórki do komórki. W pędach NM rosnących w obecności Zn, Pb i Cd nie zidentyfikowano również istotnego wzrostu zawartości kwasu benzoowego i jego pochodnych.

Wśród licznych badań z zakresu metabolicznych adaptacji metalofitów, informacje na temat równowagi hormonalnej u tej grupy roślin są raczej ubogie, chociaż analiza porównawcza profilu endogennych fitohormonów związanych ze stresem pomiędzy kontrastującymi ekotypami może rzucić nowe światło na mechanizmy tolerancji na metale. W przypadku *A. montanum* stwierdzono, że odpowiedź roślin na Zn, Pb i Cd związana była z regulacyjną rolą kwasu jasmonowego u ekotypu M oraz kwasu abscysynowego (w postaci wolnej i związanej) u ekotypu NM (**praca P8**). Rola tego pierwszego polegała na łagodzeniu uszkodzeń oksydacyjnych, podczas gdy kwas abscysynowy mógł być zaangażowany w ograniczenie transpiracji, a tym samym w minimalizowanie translokacji jonów metali. Podsumowując, reakcja ekotypu M związana była z indukcją mechanizmów, umożliwiających naprawę negatywnych skutków stresu, zaś ekotypu NM - z opóźnianiem działania czynnika stresowego, co okazało się być niewystarczającą strategią obronną.

#### **d) powiązanie aktywności enzymów proteolitycznych z potencjalnymi mechanizmami radzenia sobie z toksycznością metali ciężkich**

Enzymy proteolityczne zlokalizowane w wakuoli wykazują aktywności w ściśle określonym pH, które są hamowane przez specyficzne dla poszczególnych grup inhibitory. Na podstawie wyników opublikowanych w **pracy P4** stwierdzono, że w pędach NM *S. vulgaris* traktowanych metalami ciężkimi nastąpił wzrost aktywności zarówno proteinaz (proteaz) cysteinowych (o optymalnym pH działania około 5) jak i serynowych (aktywnych w pH zbliżonym do obojętnego), który korespondował ze zwiększoną karbonylacją i spadkiem zawartości białka rozpuszczalnego. Z kolei, zawartość białka w kulturach osobników metalotolerancyjnych zmniejszyła się jedynie u GAL, ale pozostawało to bez wpływu na poziom ich utlenienia. Co ciekawe, pędy GAL charakteryzowała prawie czterokrotnie wyższa aktywność proteinaz serynowych niż pędy SER, chociaż w obu przypadkach ich aktywność była niezależna od obecności toksycznych jonów w pożywce. Przeciwnie,

aktywność proteinaz cysteinowych była dwukrotnie niższa u GAL niż u SER, aczkolwiek u ekotypu GAL pierwiastki metaliczne stymulowały aktywność proteaz w pH = 5.2 w porównaniu do kontroli, zaś w pędach SER tendencja ta była odwrotna. Ograniczenie aktywności proteinaz u SER mogło być wynikiem interakcji jonów metali z grupami -SH enzymu, prowadzącej do zmniejszenia lub utraty jego zdolności hydrolitycznych. Bardziej szczegółowe badania nad proteolizą z wykorzystaniem zymografii ujawniły jednak, że osobniki GAL wykazywały aktywność innych proteinaz niż SER i NM. Przy obu wartościach pH w pędach GAL nie wykryto aktywności w przedziale 35 – 40 kDa, podczas gdy zaobserwowano wyraźną aktywność proteaz o masie powyżej 100 kDa i w okolicach 70 kDa. Dodatkowo, ich obecność była niezależna od traktowania metalami. Niewątpliwie oznacza to, że u ekotypu GAL te same proteazy biorą udział zarówno w odpowiedzi na pierwiastki metaliczne, jak i w regulacji procesów fizjologicznych w komórce, chociaż ich całkowita aktywność może czasowo wzrosnąć w warunkach stresowych. Z kolei, w pędach NM traktowanych metalami stwierdzono zwiększoną aktywność proteolityczną w obu pH przy 35 kDa i nieco poniżej 40 kDa oraz przy około 85 kDa jedynie w pH = 6.8. Podobny zakres od 25 do 40 kDa i 85 kDa stwierdzono u SER, ale tylko w odniesieniu do proteinaz serynowych aktywnych w pędach kontrolnych, podczas gdy w pędach traktowanych metalami dopiero dodatek EDTA (chelator kationów dwuwartościowych) ujawnił stymulację aktywności proteinaz o masie 35 kDa. Zaobserwowany wzrost aktywności proteaz o masie 35 kDa dotyczył również pędów kontrolnych SER, pędów GAL w obu traktowaniach, jak i pędów NM rosnących na pożywce z metalami. Uzyskany wynik sugeruje, że aktywność niektórych proteinaz mogła być hamowana pod wpływem pierwiastków metalicznych (głównie u NM), ale także wskazywać na obecność proteinaz zależnych od dwuwartościowych jonów metali, które zostały uwolnione z miejsc aktywnych enzymu po dodaniu EDTA. Nie można zatem wykluczyć, że metabolizm osobników metalotolerancyjnych jest mocno zależny od obecności metali. Oprócz opisanych wyżej różnic, większość aktywności proteolitycznej u wszystkich ekotypów została zidentyfikowana między 70 a 140 kDa.

Końcowymi produktami rozkładu białek są wolne aminokwasy. Aby zatem dowiedzieć się więcej o kierunku przebudowy proteomu podczas traktowania metalami, w eksperymencie wykonano pomiar aktywności dwóch enzymów ich metabolizmu – arginazy (ARG) i dehydrogenazy glutaminianowej (GDH). We wszystkich ekotypach *S. vulgaris* stwierdzono spadek aktywności ARG pod wpływem metali, co mogło być wynikiem zmniejszenia dostępności substratu – argininy do przeprowadzenia reakcji. Pula tego aminokwasu mogła zostać wykorzystana w przemianach prowadzących do produkcji poliamin, które uważane

są za inne cząsteczki obronne zaangażowane w reakcje roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Szczególnie interesująca wydaje się jednak znacznie podwyższona w stosunku do pozostałych ekotypów aktywność ARG w pędach kontrolnych SER. W połączeniu z wysoką zawartością prolina, jest wysoce prawdopodobne, że u tego ekotypu prolina powstaje na drodze przemian argininy/ornityny. Z kolei, w pędach GAL synteza prolina może przebiegać innym szlakiem wykorzystującym kwas glutaminowy, gdyż wzrostowi zawartości prolina towarzyszył spadek aktywności ARG. Co więcej, kwas glutaminowy mógł zostać także zużyty do produkcji zredukowanego glutationu (jego obecność zlokalizowano w doświadczeniu z zastosowaniem jonów Pb aplikowanych oddzielnie) i dlatego aktywność GDH u GAL zmniejszała się pod wpływem metali. Przeciwnie, dostępność glutaminianu w pędach SER i NM traktowanych metalami stymulowała GDH, która katalizuje reakcję jego przekształcenia w 2-oksoglutaran włączany do cyklu Krebsa. Uzyskany wynik skłania zatem ku hipotezie o zwiększeniu wydajności produkcji energii u NM i SER, która mogła zostać spożytkowana na uruchomienie mniej lub bardziej efektywnych mechanizmów obronnych u tych ekotypów.

Aktywność proteolityczną oceniono również w pędach *A. montanum* (**praca P7**). Podobnie, jak u ekotypu NM *S. vulgaris*, także w przypadku pędów NM *A. montanum* traktowanych  $1\times$  HMs stwierdzono wzrost utlenienia białek, które kierowane były na drogę wakuolarnej degradacji proteolitycznej i dlatego ich poziom zmniejszył się o prawie 1/3 w porównaniu do kontroli. Z kolei, zawartość białka w pędach M utrzymywała się na stałym poziomie niezależnie od traktowania, chociaż dodatek metali do pożywki powodował nieznaczny wzrost ich karbonylacji. Co ciekawe, u tego ekotypu aktywność proteinaz o optymalnym pH działania około 5 nie zwiększyła się pod wpływem metali, a aktywność proteinaz w pH obojętnym wręcz zmniejszyła w stosunku do kontroli. Niezależnie od ekotypu, większość aktywności proteolitycznej w obu pH została zlokalizowana między 100 a 140 kDa. Wyjątek stanowiły proteazy cysteinowe o masie około 70 kDa i proteazy serynowe nieco poniżej 100 kDa, których aktywność stwierdzono jedynie w pędach kontrolnych NM i M, odpowiednio. Z kolei, w oparciu o zastosowane inhibitory wykazano, że pasma aktywności wyróżnione w pH = 6.8 należą do proteaz serynowych zależnych od metali, a ich obecność wykryto w pędach obu ekotypów traktowanych pierwiastkami metalicznymi oraz w pędach kontrolnych ekotypu NM. Podsumowując, badania wykazały, że u ekotypu NM główną rolę w odpowiedzi na metale odgrywają wakuolarne enzymy proteolityczne, podczas gdy u ekotypu M obniżona proteoliza wakuolarna może być kompensowana przez inne szlaki degradacji białek.



### ***Podsumowanie i wnioski***

Dotychczasowy stan wiedzy na temat prezentowanego zagadnienia nie pozostawia wątpliwości o złożoności strategii adaptacyjnych do podwyższonych stężeń metali ciężkich. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, można jednak wnioskować, że przemiany reaktywnych form tlenu i wydajnie działające mechanizmy ich neutralizacji stanowią wspólne podłoże tolerancji niespokrewnionych taksonomicznie gatunków - *S. vulgaris* i *A. montanum* na pierwiastki metaliczne. Po raz pierwszy wykazałam, że zróżnicowane związki antyoksydacyjne są zaangażowane w swoistą odpowiedź badanych gatunków na stres, a ich wewnątrzkomórkowy poziom modyfikuje reakcje poszczególnych ekotypów na metale.

### **Najważniejsze osiągnięcia rozprawy habilitacyjnej**

1. Populacje *S. vulgaris* porastające hałdy galmanowe i serpentynitowe różnią się istotnie od populacji referencyjnej występującej na terenie nieskażonym metalami pod względem cech morfologicznych, anatomicznych, fizjologicznych i genetycznych. Podobieństwo obu populacji hałdowych między sobą, pomimo ich przestrzennej izolacji, sugeruje niezależne wykształcenie mechanizmów tolerancji u ekotypu GAL i SER podczas kolonizacji zanieczyszczonych terenów.
2. Dla wszystkich zbadanych ekotypów *S. vulgaris* opracowano ujednolicone metody uprawy *in vitro*, pozwalające na prowadzenie dalszych eksperymentów w ściśle określonych, standaryzowanych warunkach laboratoryjnych przy zachowaniu satysfakcjonującej żywotności i zdolności morfogenetycznej kultur.
3. Wyniki uzyskane na podstawie krótko- i długotrwałej ekspozycji na jony Pb lub Ni wskazują na regulacyjną rolę reaktywnych form tlenu (RFT), które uruchamiają kaskadę sygnałową u osobników metalotolerancyjnych *S. vulgaris*, prowadzącą do aktywacji zależnych od ekotypu wewnątrzkomórkowych mechanizmów obronnych, zanim jeszcze szkodliwe jony zostaną przetransportowane do istotnych metabolicznie miejsc.
4. Odpowiedź kultur *S. vulgaris* na pierwiastki metaliczne była związana głównie z aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Pędy GAL i SER wykazywały podobny wzór aktywności peroksydaz podczas wzrostu na pożywce z dodatkiem stężenia metali odpowiadającego warunkom naturalnym, podczas gdy zastosowanie wyższych dawek metali wywoływało u SER reakcję analogiczną do NM. Natomiast, odpowiedź *A. montanum* na metale wiązała się głównie z przemianami związków fenolowych, które u ekotypu M prowadziły

do syntezy kwasów fenolowych o wysokiej zdolności do zmiatania RFT, zaś u ekotypu NM – do tworzenia innych związków niezaangażowanych w niwelowanie stresu oksydacyjnego.

5. Spośród badanych enzymów, aktywność peroksydazy gwajakolowej stanowiła wspólne podłoże odpowiedzi antyoksydacyjnej osobników metalotolerancyjnych *S. vulgaris* i *A. montanum*. Niemniej, znaczenie GOPX w reakcji na metale różnicowało ekotypy galmanowe od serpentynitowego. U tych pierwszych, wzmożona aktywność enzymu korelowała ze zwiększoną akumulacją fenylopropanoidów, które współdziałając biorą udział w tworzeniu zlignifikowanej ściany komórkowej zabezpieczającej przed swobodnym wnikaniem jonów do protoplastu. Z kolei, u ekotypu SER aktywność enzymu była związana jedynie z neutralizacją RFT.

6. Ekspozycja pędów GAL *S. vulgaris* na stężenie pierwiastków metalicznych odzwierciedlające ich poziom w podłożu cynkowo-ołowiowym skutkowała istotnym podwyższeniem wydajności wszystkich analizowanych składników aparatu antyoksydacyjnego. W konsekwencji, badane jony stymulowały wzrost kultur tego ekotypu. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że jony pierwiastków śladowych w dawkach, do których ekotyp GAL przystosował się w procesie selekcji odgrywają ważną rolę fizjologiczną, być może nawet jako mikro- lub ultraelementy.

7. Ograniczenie wzrostu kultur SER *S. vulgaris* traktowanych  $1\times$  HMs mogło wynikać z kosztów energetycznych poniesionych na aktywację mechanizmów obronnych przed jonami Zn, Pb i Cd, względem których ekotyp ten nie wykształcił adaptacji w toku ewolucji.

8. U osobników NM obu gatunków traktowanych metalami obserwowano przewagę degradacji białek nad procesami ich biosyntezy. Przeciwnie, wzrost aktywności proteinaz wakuolarnych w odpowiedzi osobników metalotolerancyjnych *S. vulgaris* prowadził do przebudowy proteomu, jednakże osobniki GAL wykazywały aktywność innych proteaz niż osobniki SER i NM. Stwierdzono również, że u ekotypu GAL te same proteazy uczestniczą w przemianach białek, zachodzących zarówno w obecności jak i przy braku metali w podłożu. Z kolei, odpowiedź M osobników *A. montanum* na pierwiastki metaliczne wiązała się ze zmniejszoną indukcją proteolizy wakuolarniej, która najprawdopodobniej była kompensowana innym szlakiem degradacji białek.

9. Niezależnie od gatunku, efekt antagonizmu jonów Zn i Pb/Cd stanowił wspólną reakcję obronną ekotypów metalotolerancyjnych przed niekontrolowanym napływem pierwiastków balastowych do pędów.

### **Dalsze perspektywy badawcze**

Przeprowadzone do tej pory badania łączą w sobie ważne wyniki dla nauk podstawowych z możliwością ich praktycznego zastosowania. Z jednej strony, stanowią kompleksowe opracowanie mechanizmów antyoksydacyjnych funkcjonujących u metalofitów należących do odrębnych taksonów dominujących na terenach przemysłowych. Z drugiej, stwarzają perspektywy prowadzące do uzyskania roślin o zwiększonym potencjale fitoremediacyjnym poprzez modyfikację genów kodujących składniki systemu antyoksydacyjnego, które mogą zapewnić odporność na stres abiotyczny. Z tego względu, eksperymenty na poziomie genetycznej regulacji odpowiedzi na metale ciężkie warte są podjęcia w niedalekiej przyszłości.

Biorąc pod uwagę, szereg nowych pytań, które postawiłam podczas realizacji założonych celów rozprawy habilitacyjnej, w najbliższym czasie interdyscyplinarne badania z zakresu tolerancji na metale będą kontynuowane. Planuję zgłębić zagadnienie stymulującego wpływu niskich stężeń pierwiastków metalicznych na organizmy i poszukiwać mechanizmów leżących u podstaw zjawiska hormezy. Swoją uwagę chciałabym również poświęcić określeniu roli apoplastu w odpowiedzi na stres metaliczny, którego rearanżacja może zapewnić fizyczną i chemiczną barierę zapobiegającą przenikaniu jonów do wnętrza komórki. W badaniach tych zamierzam wykorzystać m. in. nowoczesne metody mikroanalizy rentgenowskiej (do lokalizacji metali) oraz metody immunocytochemiczne (identyfikujące składniki ściany komórkowej, takie jak np. pektyny i białka). Dodatkowo, w związku ze stwierdzeniem różnic w poziomie tolerancji konstytutywnej u badanych gatunków, istotnym zagadnieniem będzie sprawdzenie czy ich reakcja na metale jest związana z występowaniem mikroorganizmów endofitycznych o zróżnicowanym w zależności od gatunku i ekotypu składzie.

Nowym, interesującym mnie nurtem badawczym jest określenie sposobów radzenia sobie metalofitów z więcej niż jednym rodzajem stresu. W tym zakresie planuję zastosować dodatkowo czynniki pochodzenia biotycznego, których aplikacja być może przybliży nas do poznania odpowiedzi na pytanie po co rośliny akumulują metale i czy wynikają z tego korzyści, np. obronne przed roślinożercami.

### **Piśmiennictwo**

ALI, S.; GILL, R.A.; MWAMBA, T.M.; ZHANG, N.; LV, M.T.; UL HASSAN, Z.; ISLAM, F.; ALI, S.; ZHOU, W.J. 2018. Differential cobalt-induced effects on plant growth, ultrastructural modifications, and antioxidative response among four *Brassica napus* (L.) cultivars. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 2685–2700.

- ANJUM, N.A., SOFO, A., SCOPA, A., ROYCHOUDHURY, A., GILL, S.S., IQBAL, M., LUKATKIN, A.S., PEREIRA, E., DUARTE, A.C., AHMAD, I. 2015. Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4099–4121.
- BOTHE, H.; SŁOMKA, A. 2017. Divergent biology of facultative heavy metal plants. *J. Plant Physiol.* 219, 45–61.
- BROADHURST C., TAPPERO R., MAUGEL T., ERBE E., SPARKS D., CHANEY R. 2004. Interaction of nickel and manganese in accumulation and localization in leaves of Ni hyperaccumulators *Alyssum murale* and *Alyssum corsicum*. *Plant Soil.* 314, 35–48.
- BRUNKARD, J.O.; RUNKEL, A.M.; ZAMBRYSKI, P.C. 2015. Chloroplasts extend stromules independently and in response to internal redox signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 10044–10049.
- CABAŁA J. 2009. Metale ciężkie w środowisku glebowym olkuskiego rejonu eksploatacji rud Zn-Pb. *Prace Naukowe UŚ, Zeszyt 2729*, 134.
- CHANDRA R.; KUMAR V. 2017. Phytoextraction of heavy metals by potential native plants and their microscopic observation of root growing on stabilised distillery sludge as a prospective tool for in situ phytoremediation of industrial waste. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 2605–2619.
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 104, 332–338.
- DUBERT F., PŁĄZEK A. 2007. Kultury *in vitro* jako model w badaniach procesów fizjologicznych u roślin. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych.* 523, 93–103.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspensor culture of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50, 151–168.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- GODZIK B. 1993. Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference areas. *Pol. Bot. Stu.* 5, 113–132.
- GREGERSEN, P.L.; HOLM, P.B.; KRUPINSKA, K. 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biol.* 10, 37–49.
- KABATA-PENDIAS A. 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*; 4th ed.; CRC Press .
- KARMAKAR D.; PADHY P.K. 2019. Metals uptake from particulate matter through foliar transfer and their impact on antioxidant enzymes activity of *S. robusta* in a tropical forest, West Bengal, India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 605–616.
- KASOWSKA D., KOSZELNIK-LESZEK A. 2014. Ecological features of spontaneous vascular flora of serpentine post-mining sites in Lower Silesia. *Arch Environ Prot.* 40(2), 33–52.
- KISA D., ELMASTAŞ M., ÖZTÜRK L., KAYIR Ö. 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *App. Biol. Chem.* 59(6), 813–820.
- KRZESŁOWSKA M., TIMMERS A.C.J., MLECZEK M., NIEDZIELSKI P., RABĘDA I., WOŹNY A., GOLINSKI P. 2019. Alterations of root architecture and cell wall modifications in *Tilia cordata* Miller (Linden) growing on mining sludge. *Environ. Pollut.* 248, 247–259.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3), 473–497.
- MUSZYŃSKA E., LABUDDA M. 2019. Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology-From Negative to Beneficial Impact on Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3117.
- MUSZYŃSKA E., HANUS-FAJERSKA E. 2015. Why are heavy metal hyperaccumulating plants so amazing?. *BioTechnologia.* 96(4), 265–271.
- MUSZYŃSKA E., WISZNIEWSKA A., HANUS-FAJERSKA E. 2015. Roślinność terenów wzbogaconych w metaliczne pierwiastki śladowe jako unikatowe źródło bioróżnorodności. Bajguz A., Ciereszko I. (Red).

Monografia. Różnorodność biologiczna - od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko - eksperyment – edukacja. Polskie Towarzystwo Botaniczne, Białystok, 63 - 77.

**MUSZYŃSKA E.**, HANUS-FAJERSKA E., CIARKOWSKA K. 2013. Evaluation of seed germination ability of native calamine plant species on different substrata. *Pol. J. Environ. Stud.* 22(6), 1775-1780.

NAGAJYOTI P. C., LEE K. D., SREEKANTH T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199-216.

PHILLIPS D.P.; HUMAN L.R.D.; ADAMS J.B. 2015. Wetland plants as indicators of heavy metal contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 227–232.

POLGE C., JAQUINOD M., HOLZER F., BOURGUIGNON J., WALLING L., BROUQUISSE R. 2009. Evidence for the existence in *Arabidopsis thaliana* of the proteasome proteolytic pathway activation in response to cadmium. *J. Biol. Chem.* 284, 35412–35424.

PRZEDPEŁSKA E., WIERZBICKA M. 2007. *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from lead – zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant Soil.* 299, 43-53.

SARASWAT S., RAI J. P. N. 2011. Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. *Rev. Environm. Sci. Biotechnol.* 10, 327-339.

SALAS-MORENO M., CONTRERAS-PUENTES N., RODRÍGUEZ-CAVALLO E., JORRÍN-NOVO J., MARRUGO-NEGRETE J., M'ENDEZ-CUADRO D. 2019. Protein carbonylation as a biomarker of heavy metal, Cd and Pb, damage in *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Flügge. *Plants.* 8 (11), 513.

SHARMA P.; JHA A.B.; DUBEY R.S.; PESSARAKLI M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26.

SŁOMKA A., JĘDRZEJCZYK-KORYCIŃSKA M., ROSTAŃSKI A., KARCZ J., KAWALEC P., KUTA E. 2012. Heavy metals in soil affect reproductive processes more than morphological characters in *Viola tricolor*. *Environ. Exp. Bot.* 75, 204-211.

SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., GRODZIŃSKA K. 2008. Naturalna roślinność w rejonach starych zwałowisk odpadów po górnictwie rud Zn-Pb w okolicy Bolesławia i Bukowna (region śląsko-krakowski; południowa Polska). *Przegląd Geologiczny.* 56, 528-531.

TERRÓN-CAMERO L.C., PELÁEZ-VICO M.A., DEL-VAL C., SANDALIO L.M., ROMERO-PUERTAS M. C. 2019. Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production. *J. Exp. Bot.* 70 (17), 4477–4488.

TOKARZ K.M., MAKOWSKI W., TOKARZ B., HANULA M., SITEK E., **MUSZYŃSKA E.**, JĘDRZEJCZYK R., BANASIUK R., CHAJEC Ł., MAZUR S. 2020. Can Ceylon Leadwort (*Plumbago zeylanica* L.) Acclimate to Lead Toxicity?-Studies of Photosynthetic Apparatus Efficiency. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1866.

VAN HOOFF N.A.L.M., HASSINEN V.H., HAKVOORT H.W.J., BALLINTIJN K.F., SCHAT H., VERKLEIJ J.A.C., ERNST W.H.O., KARENlampi S.O., TERVAHauta A.I. 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* 126(4), 1519–1526.

WĄSOWICZ P., PIELICHOWSKA M., PRZEDPEŁSKA-WĄSOWICZ E.M., BEDNAREK P., SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., ABRATOWSKA A., WIERZBICKA M. 2014. Physiological and genetic differentiation between metallicolous and non-metallicolous diploid populations of Alpine *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) in the Tatra Mountains and the Northern Carpathian Foreland. *Ann. Bot. Fenn.* 51(4), 227-239.

WELCH M.E., DARNELL M.Z., MCCAULEY D.E. 2006. Variable populations within variable populations: quantifying mitochondrial heteroplasmy in natural populations of the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Genetics.* 174, 829–837.

WIERZBICKA M., PIELICHOWSKA M., BEMOWSKA-KAŁABUN O., WĄSOWICZ P. 2017. Microevolution on Anthropogenically Changed Areas on the Example of *Biscutella laevigata* Plants from Calamine Waste Heap in Poland. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 7, 4.

WIERZBICKA M., POTOCKA A. 2002. Lead tolerance in plants growing on dry and moist soils. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 44, 21–28.

WIERZBICKA M., ROSTAŃSKI A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz Poland: a review. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 44, 7–19.

WÓJCIK M., DRESLER S., TUKIENDORF A. 2015. 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.* 390, 237–250.

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.

ŻOŁNIERZ L. 2007. Zbiorowiska trawiaste występujące na dolnośląskich serpentynitach – wybrane aspekty ekologii. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.* 555: 2–18.

## **VI. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ**

Oprócz prac omówionych powyżej, które stanowiły podstawę osiągnięcia naukowego, **od wielu lat prowadzę lub uczestniczę w badaniach związanych z oddziaływaniem stresorów abiotycznych i biotycznych na rośliny o różnej przynależności systematycznej i ekologicznej, a także z możliwościami minimalizowania negatywnych skutków stresu przy użyciu mikroorganizmów lub związków pochodzenia naturalnego. Dorobek naukowy, nie włączając prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, obejmuje w sumie 10 rozdziałów w monografiach naukowych i 51 publikacji oryginalnych, w których w 29 jestem pierwszym autorem. Ich sumaryczny Impact Factor zgodny z rokiem 2019 wynosi 64,881, a liczba punktów MNiSW – 1675 (w tym przed 2019 r. 633). Mój Indeks Hirsha według bazy Scopus to 12 (stan na dzień 13. 02. 2021).**

W pierwszym etapie pracy badawczej, na poziomie studiów magisterskich realizowanych na **Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**, analizowałam przebieg procesów embriologicznych *Lepidium ruderales* porastającej pobocza szlaków komunikacyjnych skażonych metalami ciężkimi oraz solanką stosowaną do zimowego utrzymania dróg. Pod kierunkiem **Pani prof. dr hab. Romany Izmailow** udowodniłam, że wymienione czynniki stresowe mogą obniżać sukces reprodukcyjny nawet u taksonu charakterystycznego dla pionierskich zespołów ruderalnych. Rezultaty opisanych wyżej badań zostały **przedstawione w jednej monografii (załącznik 4, poz. I.1) oraz zaprezentowane w formie dwóch doniesień konferencyjnych (zał. 4, poz. III.1-2).**

Mając na uwadze chęć poszerzenia wiedzy teoretycznej o zagadnienia praktyczne, jeszcze podczas jednolitych studiów magisterskich na UJ, rozpoczęłam edukację na **Wydziale**

**Ogrodniczym Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie** (obecnie Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa). Zarówno podczas studiów inżynierskich, jak i magisterskich **współpracowałam z dr hab. inż. Ewą Hanus-Fajerską**, prof. UR, która zaszczepiła we mnie zainteresowanie metalofitami i możliwościami ich praktycznego zastosowania w technikach fitoremediacji. Pod przewodnictwem Pani Profesor poszukiwałam wydajnych metod generatywnego rozmnażania unikatowych przedstawicieli rodzimej flory galmanowej o szczególnych predyspozycjach do wzrostu i rozwoju na terenach zniszczonych chemicznie. Wyniki z tego okresu mojej działalności zostały **opisane w czterech recenzowanych artykułach** (zał. 4, poz. II.9, 11, 14, 30) i **przedstawione w formie czterech doniesień konferencyjnych** (zał. 4, poz. III.3, 11, 23, 26).

Od 2011 r. kontynuowałam pracę badawczą w **Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa UR** na studiach III stopnia. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej dotyczyły określenia przydatności różnych gatunków roślin do odbudowy biologicznej oraz fitoremediacji odpadów zdeponowanych po wydobywaniu i flotacji rud cynkowo-ołowiowych. Szczególną uwagę poświęciłam roślinności galmanowej Olkuskiego Rejonu Rudnego. **Przeprowadzone eksperymenty obejmowały cztery główne nurty tematyczne:**

- 1) optymalizacja metodyki mikrorozmnażania galmanowych ekotypów *Alyssum montanum* i *Biscutella laevigata* należących do rodziny *Brassicaceae* oraz *Dianthus carthusianorum* i *Gypsophila fastigiata* z rodziny *Caryophyllaceae*;
- 2) określenie reakcji kultur wymienionych metalofitów na podwyższone stężenia jonów ołowiu lub kadmu w pożywce oraz laboratoryjna selekcja gatunków do badań *in situ*;
- 3) biometryczna i fizjologiczna ocena przydatności wybranych gatunków do rekultywacji biologicznej i fitoremediacji podłoża zanieczyszczonego metalami ciężkimi;
- 4) ocena możliwości przyspieszenia odbudowy szaty roślinnej na terenach zdegradowanych przy użyciu nawożenia mineralnego (N, P, K) i organicznego (komunalne osady ściekowe).

Rezultaty związane z badaniami prowadzonymi podczas studiów doktoranckich zostały **opisane w sześciu pracach eksperymentalnych** (zał. 4, poz. I.5; II.12-13, 16, 21, 24) oraz w **dziwięciu pracach przeglądowych** (zał. 4, poz. I.4, 7-8; II.23, 25, 29; III.34-36), a także **zaprezentowane podczas kilkudziesięciu konferencji** o zasięgu krajowym i międzynarodowym (zał. 4, poz. IV. 4, 6, 8, 10, 12, 16-17, 19, 25, 27-28, 30, 32, 34-35, 39-40, 42-47). Wymiernym efektem przeprowadzonych podczas studiów III stopnia badań było **stworzenie unikatowej w Polsce kolekcji *in vitro* rodzimych gatunków roślin**

**metalatolerancyjnych**, która może służyć następnym pokoleniom do prowadzenia badań zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym.

Realizowane podczas studiów III stopnia eksperymenty z jednej strony dotyczyły wykorzystania kultur *in vitro* jako technologii umożliwiającej intensyfikację stosunkowo niskiego w warunkach naturalnych współczynnika rozmnażania, a także produkcji roślin o podwyższonym stopniu odporności na metale ciężkie, z drugiej zaś **poszukiwałam alternatywnych sposobów zwiększających prawdopodobieństwo przeżycia organizmów roślinnych w trudnych warunkach siedliskowych**. Z tego zakresu **zrealizowałam projekt badawczy nr 4562/2013 finansowany z dotacji celowej** na prowadzenie badań naukowych dla młodych pracowników oraz uczestników studiów doktoranckich pt. „Ocena efektu zastosowania tlenku azotu podczas mikrorozmnażania galmanowego ekotypu *Gypsophilla fastigiata* - gatunku ciepłolubnych muraw przydatnego do stabilizacji odpadów o wysokiej zawartości metali ciężkich”, a także **opublikowałam trzy artykuły**, w których opisałam korzystne oddziaływanie tlenku azotu, nadtlenu wodoru oraz kwasu giberelinowego na kiełkowanie nasion i wzrost siewek gatunków o różnej przynależności taksonomicznej (zał. 4, poz. I.6; II.15, 20). Wyniki powyższych badań **zaprezentowałam również na trzech konferencjach** krajowych i międzynarodowych (zał. 4, poz. III. 9, 18, 29).

Oprócz roślinności zielnej, **sporo uwagi poświęciłam roślinom drzewiastym o szczególnych predyspozycjach do rekultywacji terenów skażonych chemicznie**. Przeprowadziłam szczegółowe studium literaturowe, które przyczyniło się do powstania **kilku artykułów przeglądowych** (zał. 4, poz. I.3; II.17-18), a także **prac badawczych** dotyczących kondycji fizjologicznej pionierskich gatunków lasotwórczych, takich jak *Betula pendula* czy *Hippophaë rhamnoides* stosowanych do zalesiania najuboższych obszarów (zał. 4, poz. II.10, 19, 22, 27, 33). Co więcej, problematykę odbudowy biologicznej z wykorzystaniem drzew i krzewów oraz możliwości ich zastosowania w terenach zieleni podejmowałam także **podczas licznych konferencji** (zał. 4, poz. III.5, 13, 20-22, 24, 31, 33, 36, 41; VI.6).

Współpraca podczas studiów doktoranckich z zespołem **Pani dr hab. inż. Iwony Kowalskiej, prof. UR oraz Pana dr. hab. inż. Macieja Gąstoła, prof. UR przy realizacji dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki** (nr NN 310 725040 pt. "Wpływ mikoryzy i zawartości fosforu w pożywce na stan odżywienia oraz ekspresję genów transporterów fosforu w roślinach pomidora" oraz nr NN 310 163338 pt. "Wybrane aspekty odżywiania mineralnego winorośli (*Vitis* sp.) oraz ich wpływ na wzrost, plonowanie, wartość biologiczną owoców oraz odporność na mróz") zaowocowała moją fascynacją układami symbiotycznymi i korzyściami



płynącymi ze związku pomiędzy mikrobiotą hałd a roślinnością zasiedlającą zdegradowane tereny. Podsumowaniem tego etapu działalności naukowej były **artykuły recenzowane** (zał. 4, poz. I.2; II.26, 28, 31) oraz **doniesienia konferencyjne** (zał. 4, poz. III.7, 14, 38; VI.5).

Mój dorobek naukowy **przed uzyskaniem stopnia doktora** obejmuje: **osiem rozdziałów w monografiach, piętnaście oryginalnych prac eksperymentalnych, trzynaście prac przeglądowych**, których sumaryczna liczba punktów MNiSW (wg ujednoliconego wykazu czasopism zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **143**.

Od dnia 1 marca 2016 r. do chwili obecnej zawodowo związana jestem ze **Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**. Podjęta przeze mnie praca w nowej placówce naukowej po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych (dyplom z wyróżnieniem) umożliwiła mi **zbudowanie zespołu badawczego**, który zajmuje się nie tylko oceną procesów metabolicznych, ale także wykorzystuje metody mikroskopowe do obrazowania mechanizmów cytologicznych i ultrastrukturalnych, kontrolujących odpowiedź roślin na stres. Nasza **działalność zespołowa została doceniona w 2020 r. Nagrodą III stopnia JM Rektora SGGW za osiągnięcia naukowe w roku 2019**. Z kolei, w marcu 2018 roku zostałam **indywidualnie nagrodzona przez JM Rektora SGGW okresowym zwiększeniem wynagrodzenia za osiągnięcia naukowe i dydaktyczne, które znacząco wpływają na rozwój, promocję oraz prestiż Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**.

Wyniki aktywności naukowej w okresie pracy w SGGW, którą prowadziłam równolegle do badań stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego, po krótko opisałam zgodnie z podejmowaną problematyką badawczą. Mój udział empiryczny w przedstawionych badaniach, wynikających ze współpracy naukowej zarówno z pracownikami jednostek SGGW, jak i z innych Uniwersytetów i Instytucji Nauki, polegał między innymi na wykonywaniu oceny kondycji roślin na podstawie oznaczeń parametrów fizjologicznych i biochemicznych, ale także na prowadzeniu obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem metod mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej i elektronowej. Z kolei, wkład teoretyczny obejmował tworzenie i dyskusowanie koncepcji badań oraz interpretowanie uzyskanych wyników.

### ***Oddziaływanie metali ciężkich na organizmy roślinne***

**Główny nurt moich zainteresowań badawczych z okresu zatrudnienia na stanowisku asystenta z doktoratem i adiunkta naukowo/badawczo-dydaktycznego obejmuje tematykę stanowiącą kontynuację zagadnień podejmowanych na wcześniejszych etapach edukacji.**

Badania reakcji roślin, umożliwiające dostarczenie cennych informacji o poziomie tolerancji różnych genotypów na określone jony metali ciężkich oraz o mechanizmach aktywowanych w walce z silnym stresem abiotycznym, prowadzone są zarówno na wyselekcjonowanym *in vitro* materiale roślinnym, jak i na osobnikach rosnących w warunkach naturalnych. Opublikowane dotychczas artykuły wykazały, że przedstawiciele rodziny *Caryophyllaceae* - *Gypsophilla fastigiata* oraz *Dianthus carthusianorum* cechuje wyższy poziom tolerancji na jony Cd niż Pb związany ze wzmożoną produkcją związków fenolowych w pędach traktowanych pierwiastkami metalicznymi. Z kolei, aklimatyzacja aparatu fotosyntetycznego do podwyższonych stężeń Pb, polegająca na aktywacji alternatywnych dróg transportu elektronów oraz/i zwiększeniu jego efektywności, należą do strategii obronnych obserwowanych u *Plumbago zeylanica* i *Anthyllis vulneraria* uprawianych *in vitro*. Dodatkowo, u tego ostatniego gatunku, analizy mikroskopowe naturalnie występujących populacji - hałdowej i referencyjnej, ujawniły istotne różnice na poziomie anatomicznym i ultrastrukturalnym liści (m. in. w składzie chemicznym ścian komórkowych), które z pewnością nie pozostają bez znaczenia w odpowiedzi roślin na metale ciężkie. **Wyniki badań z zakresu oddziaływania metali ciężkich na rośliny zostały opublikowane w formie artykułów naukowych (zał. 4, poz. V.10-12, 21-22) oraz doniesień konferencyjnych (zał. 4, poz. VI.3-4, 7-9, 12, 16-19, 26).**

Mając na uwadze korzyści płynące z zastosowania roślinnych kultur *in vitro* jako układów modelowych do prowadzenia badań o charakterze podstawowym, w ostatnim czasie podjęłam działania zmierzające do optymalizacji warunków prowadzenia kultury gatunków z rodzaju *Alyssum* o zróżnicowanym poziomie odporności na różne metale. Współpracując z Panem **prof. Rufusem Chaney z Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych - Służba Badań Rolniczych** (*ang.* the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service), Panią **dr Anną Koszelnik-Leszek z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**, a także Panią **dr inż. Katarzyną Sobkowicz z Ogrodu Roślin Leczniczych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**, pozyskałam nasiona, m. in. *A. murale*, *A. alyssoides* czy *A. wulfenianum* do prowadzenia eksperymentów z zakresu biologii stresu w ściśle kontrolowanych warunkach aseptycznych.

Dodatkowo, w ramach współpracy z Panią **dr Jagną Karcz**, emerytowanym pracownikiem **Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach**, kontynuuję badania nad rearanżacją apoplastu i lokalizacją metali w organach roślin metalotolerancyjnych z wykorzystaniem metod mikroanalizy rentgenowskiej (EDX).

***Zwiększanie odporności na Cd, Pb i Ni poprzez selekcję in vitro oraz suplementację dodatków organicznych***

W badaniach dotyczących selekcji linii o podwyższonym stopniu odporności na metale ciężkie uczestniczyłam jeszcze podczas studiów doktoranckich w Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. W tym zakresie **od lat współpracuję z Panią dr hab. Aliną Wiszniewską**, która włączyła mnie w prace swojego zespołu także po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora oraz zatrudnieniu w SGGW. Badania służące poznaniu mechanizmów reakcji morfogenetycznych, biochemicznych, fizjologicznych i ultrastrukturalnych związanych z krótkotrwałą oraz chroniczną ekspozycją na toksyczne pierwiastki prowadzone były na wyselekcjonowanych w kulturze pędowej liniach *Daphne jasminea* odpornych na Cd, Ni i Pb. Dodatkowo, wykonano liczne doświadczenia, obejmujące aplikację dodatków organicznych (na przykład ekstraktu z owocostanu ananasa, hydrolizatu agaru) lub egzogennych fitohormonów (brasinolidu, kwasu giberelinowego i jasmonowego), których celem było zwiększenie potencjału regeneracyjnego badanego gatunku przy jednoczesnym zmniejszeniu fitotoksyczności metali ciężkich. Co więcej, oceniono zawartość metali ciężkich w mnożonych kulturach, na podstawie której wyznaczono strategię dystrybucji i akumulacji Cd, Ni i Pb w organach, a tym samym określono przydatność *D. jasminea* w fitoremediacji. **Wyniki omówionych powyżej badań, prowadzonych na różnych poziomach organizacji organizmu, zostały podsumowane w czterech pracach eksperymentalnych (zał. 4, poz. V.4, 8, 13, 15) oraz zaprezentowane podczas dwóch konferencji krajowych i międzynarodowych (zał. 4, poz. VI. 11, 13).**

***Fitoremediacja i odbudowa biologiczna skażonego środowiska***

W ramach badań realizowanych we współpracy z **Katedrą Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa UR w Krakowie, Katedrą Gleboznawstwa i Agrofizyki Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego UR oraz Zakładami Górniczo-Hutniczymi „Bolesław”** wykazałam, że w rekonstrukcji zniszczonych siedlisk z powodzeniem można wykorzystać rodzime lokalne zasoby roślin metalotolerancyjnych, które spontanicznie opanowują miejsca, gdzie naturalna sukcesja jest niezwykle trudna i czasochłonna. W tym kontekście, zadarnienie z wykorzystaniem *Silene vulgaris* oraz *Dianthus carthusianorum* przyniosło najlepsze rezultaty podczas fitostabilizacji podłoża skażonych chemicznie, a także przyczyniło się do skutecznego zainicjowania procesów glebotwórczych. Co więcej, stwierdziliśmy, że dodatek komunalnych osadów ściekowych w trakcie przygotowywania podłoża poflotacyjnego do uprawy, może poprawić kondycję fizjologiczną

zastosowanych roślin, a tym samym zwiększyć ich przeżywalność na toksycznych odpadach. **Wyniki** opisanych wyżej badań **zostały przedstawione w pięciu publikacjach** (zał. 4, poz. V.5-7, 14, 23) **i w formie trzech doniesień konferencyjnych** (zał. 4, poz. VI.14-15, 21).

Prowadzone od lat badania nad galmanową populacją *Biscutella laevigata* sprawiły, że zostałam zaproszona do przygotowania fragmentu **monografii pod redakcją Pani Prof. Grażyny Szarek-Łukaszewskiej z Instytutu Botaniki PAN im. W. Szafera w Krakowie**. Rozdział zatytułowany „Phytoremediation as an antidote to environmental pollution” autorstwa Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K., a także rozdział “Utilization of biotechnological methods in studies on *Biscutella laevigata* ecotypes” autorstwa Wiszniewska A., Muszyńska E., Piwowarczyk B., Hanus-Fajerska E. stanowią integralną **część dwujęzycznej monografii - Buckler mustard (*Biscutella laevigata* L.) an extraordinary plant on ordinary mine heaps near Olkusz** [In English and Polish]. Szarek-Łukaszewska G. (ed.) 2020, W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków (zał. 4, poz. IV.1-2).

Nowatorskie podejście do fitoremediacji bazujące na lokalnych zasobach roślin zielnych zostało docenione przez organizatorów The Central and Eastern European Conference on Health and the Environment ‘Environmental and health issues in fast changing economies’, którzy zapewnili mi **bezkosztowy udział w konferencji i szkolenie z zakresu oceny ryzyka związanego z zanieczyszczenia środowiska różnymi związkami chemicznymi**.

Znajomość zagadnień fitoremediacyjnych umożliwiła mi także dołączenie do elitarnego zespołu pod kierownictwem **Pana prof. dr hab. Stanisława Gawrońskiego z Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii SGGW**. Przeprowadzone badania wstępne, dotyczące możliwości zastosowania wybranych gatunków roślin drzewiastych do akumulacji mikroplastików jako antropogenicznych produktów zanieczyszczających powietrze, zostały wykorzystane do przygotowania przez nas wspólnego wniosku o finansowanie w ramach konkursu Maestro 11, złożonego w 2019 roku do Narodowego Centrum Nauki.

### ***Strategie umożliwiające zwiększenie potencjału fitoremediacyjnego roślin***

Mając na uwadze konieczność stałego doskonalenia metod fitoremediacji, w międzyuczelnianym zespole przygotowaliśmy **przegląd najnowszej literatury na temat modyfikacji genetycznych, zmierzających w kierunku poprawy odporności roślin na metale ciężkie** poprzez modulowanie aktywności genów zaangażowanych w reakcje obronne, a w szczególności w mechanizmy naprawy DNA oraz usuwania nadmiaru wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Omówiliśmy także rolę nadekspresji genów kodujących

transportery i chelatory metali, jak również znaczenie transformacji genomu chloroplastowego i wyciszania genów w zwiększaniu zdolności roślin do pobierania, translokacji i sekwestracji jonów metali ciężkich.

Co więcej, w kolejnej pracy przeglądowej, przedyskutowaliśmy **aktualny stan wiedzy na temat możliwości zwiększenia zdolności fitoremediacyjnych roślin bez użycia metod inżynierii genetycznej**. Skupiając się na naturalnych dodatkach organicznych, takich jak biowęgiel, substancje humusowe, odpady z różnych gałęzi przemysłu (na przykład melasa powstająca jako produkt uboczny podczas produkcji cukru), które mogą być aplikowane do podłoża w celu poprawy warunków wzrostu roślin na terenach skażonych chemicznie, wykazaliśmy ich rolę zarówno w stabilizacji metali ciężkich w glebie, jak i w podwyższeniu biodostępności toksycznych jonów i ich translokacji do pędów.

Efekty dogłębnej analizy specjalistycznej literatury zostały **podsumowane w formie dwóch publikacji** (zał. 4, poz. V.3, 9).

#### ***Odpowiedź roślin na porażenie nicieniami***

W ostatnim okresie aktywności naukowej **włączyłam się w prace międzynarodowego zespołu badawczego, składającego się z przedstawicieli społeczności naukowej SGGW, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Międzynarodowego Centrum Doskonalenia Kukurydzy i Pszenicy (CIMMYT) w Turcji**, który zajmuje się fizjologicznymi i biochemicznymi mechanizmami reakcji roślin żywicielskich na infekcję nicieniami cystowymi. Eksperymenty laboratoryjne prowadzone na *Arabidopsis thaliana* oraz *Hordeum vulgare* wykazały, że podczas patogenezы dochodzi do systemicznej odpowiedzi roślin, przejawiającej się istotnymi zmianami w (i) metabolizmie reaktywnych form tlenu i azotu, (ii) aktywności wakuolarnych enzymów przetwarzających/legumain oraz (iii) funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego. Co więcej, zaobserwowano w jaki sposób roślina poddana działaniu nicieni cystowych radzi sobie z dodatkowo dotykającymi ją czynnikami stresowymi, takimi jak obecność jonów kadmu w podłożu oraz porażenie liści szpecielem. **Szczegółowe rezultaty tych badań zostały opisane w pięciu publikacjach** (zał. 4, poz. V.16-20), **a także zaprezentowane podczas trzech konferencji** (zał. 4, poz. VI.22-24).

#### ***Zastosowanie biopreparatów na bazie krzemu do poprawy zdrowotności roślin truskawki***

W trakcie pracy naukowej **współpracowałam także z interdyscyplinarnym zespołem dr. hab. inż. Macieja Gąstoła z obecnej Katedry Ogrodnictwa, Wydziału Biotechnologii**

**i Ogrodnictwa UR w Krakowie**, przy realizacji projektu pt. „Opracowanie innowacyjnych metod ochrony w ekologicznej uprawie truskawki” nr HORre-msz-078-24/16(242), finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Moja rola jako wykonawcy w projekcie polegała na ocenie wybranych parametrów fizjologicznych, budowy anatomicznej i ultrastrukturalnej liści truskawki traktowanych różnymi związkami krzemu, między innymi wyciągiem ze skrzypu polnego, szkłem wodnym czy preparatem biodynamicznym BD 501. Badania wykazały, że zmiany na poziomie komórkowym spowodowane zastosowaniem preparatów krzemowych w połączeniu z podwyższoną akumulacją związków polifenolowych w liściach wydają się leżeć u podstaw zwiększonej odporności roślin testowych na choroby grzybowe i szkodniki. **Wyniki eksperymentów zostały opisane w raporcie merytorycznym z realizacji grantu przygotowanym przez kierownika projektu** – dr. hab. inż. Macieja Gąstoła, prof. UR w Krakowie i zamieszczone na stronie Uniwersytetu.

#### ***Strukturalno-metaboliczna analiza dojrzałości zarodków haploidalnych***

Innym nurtem badań, w którym uczestniczę jest poszukiwanie przyczyn słabej konwersji zarodków haploidalnych owsa. Eksperymenty z tego zakresu od lat prowadzone są w **Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**, a moja rola w doświadczeniach Pani dr inż. Kingi Dziurki z Zakładu Biotechnologii IFR polega na prowadzeniu obserwacji mikroskopowych, mających na celu porównanie anatomii i ultrastruktury zarodków haploidalnych i diploidalnych odmian owsa, dodatkowo różniących się m.in. rozmiarem czy profilem endogennych fitohormonów. Obecnie, uzyskane przez nas wyniki są w trakcie opracowywania i przygotowywania do publikacji.

#### **INFORMACJA O PRZYGOTOWANYCH RECENZJACH WYDAWNICZYCH**

**Przygotowałam 25 recenzji wydawniczych manuskryptów dla krajowych i zagranicznych czasopism naukowych**, takich jak: *Acta Agrobotanica* (1), *Agronomy* (1), *Antioxidants* (2), *Ecotoxicology and Environmental Safety* (1), *Environmental Geochemistry and Health* (1), *Environmental Science and Pollution Research* (2), *Forests* (1), *International Journal of Molecular Sciences* (2), *International Journal of Phytoremediation* (1), *Journal of Hazardous Materials* (1), *Journal of Sustainable Agriculture* (1), *Molecules* (2), *Plants* (7), *Protoplasma* (1), *Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa* (1).

Jestem również jednym z **edytorów tematycznych w czasopiśmie Plants** (IF<sub>2019</sub> = 2,762), w którym pełnię również funkcję **redaktora gościnnego wydania specjalnego**, pt. ‘What make the life of stressed plants a little easier? Defense mechanisms against adverse

conditions'. Do współpracy nad numerem specjalnym zaprosiłam dr inż. Kingę Dziurkę z Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie oraz dr. Mateusza Labuddę z Instytutu Biologii SGGW.

## **NAGRODY I WYRÓŻNINIA ZA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZĄ**

**Stypendium dla najlepszych studentów i doktorantów** przyznawane corocznie od 2004 roku (zarówno na Uniwersytecie Jagiellońskim jak i Uniwersytecie Rolniczym podczas studiów I-, II- i III-go stopnia).

**Stypendium doktoranckie w zwiększonej wysokości** przyznane na rok akademicki 2012/2013, 2013/2014 oraz 2014/2015 za szczególne osiągnięcia w pracy badawczej z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych.

**Trzykrotna Nagroda Rektora Uniwersytetu Rolniczego** im. H. Kołłątaja w Krakowie za szczególne osiągnięcia naukowe i wzorowe wypełnianie obowiązków studenta w roku akademickim 2009/2010 oraz za szczególne osiągnięcia naukowe i wzorowe wypełnianie obowiązków doktoranta (styczeń 2014 roku i marzec 2015 roku).

**Okresowe zwiększenie wynagrodzenia zasadniczego** za osiągnięcia naukowe i dydaktyczne, które znacząco wpływają na rozwój, promocję oraz prestiż Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (marzec 2018 roku).

**Nagroda zespołowa III stopnia Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie** za osiągnięcia naukowe w roku 2019.

### **Nagrody i wyróżnienia na konferencjach:**

III miejsce za najlepszy referat podczas XII Konferencji Doktorantów i Młodych Uczonych. Interdyscyplinarne zagadnienia w górnictwie i geologii. Szklarska Poręba, 17 – 20.V. 2012.

Wyróżnienie za zaprezentowany poster podczas Konferencji nt. Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki. Wrocław, 1. XII. 2012.

II miejsce za zaprezentowany poster podczas I Międzynarodowej Konferencji Młodych Naukowców “Przyroda – Las – Technologia”. Poznań, 6 – 8. IX. 2013.

I miejsce za zaprezentowany poster podczas 8<sup>th</sup> International Conference of Young Naturalists. From Biotechnology to Environmental Protection - Interdisciplinary Meeting of Young Naturalists. Zielona Góra, 7 – 9. XI. 2013.

I miejsce za zaprezentowany poster podczas 57 Zjazdu Polskiego Towarzystwa Botanicznego “Botanika- tradycja i nowoczesność”. Lublin, 27. VI. – 3. VII. 2016.

## **VII. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ**

**DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA** obejmuje prowadzenie zajęć laboratoryjnych i terenowych z Botaniki, Cytologii i Anatomii, Systematyki roślin, Botaniki

dla biotechnologów, Podstaw botaniki i biologii, dla studentów następujących kierunków: Biologia, Inżynieria Ekologiczna, Rolnictwo, Ogrodnictwo, Bezpieczeństwo Żywności, Międzywydziałowe Studia Biotechnologiczne. Dodatkowo, **opracowałam autorski program nauczania** dla obowiązkowego przedmiotu „**Kultury *in vitro***”, skierowanego do studentów pierwszego roku biologii studiów magisterskich (dwóch specjalności – biologia eksperymentalna oraz mikrobiologia), którego jestem również koordynatorem. Wykłady oraz ćwiczenia z tego przedmiotu realizuję wspólnie z pracownikami Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW, którzy zajmują się częścią zwierzęcą kultur *in vitro*. Od 2017 roku prowadzę także wykłady i ćwiczenia terenowe z przedmiotu „**Dendrologia**” dla studentów drugiego roku I stopnia studiów na kierunku Inżynieria Ekologiczna, a od 2020 r. jestem dodatkowo koordynatorem tego przedmiotu.

**Wypromowałam czterech absolwentów studiów stacjonarnych I stopnia oraz jednego studiów II stopnia.** Obecnie sprawuję opiekę nad dwoma kolejnymi dyplomantami (planowany termin ukończenia obu prac - licencjackiej i magisterskiej – 2022 r.). **Przygotowałam także recenzje sześciu prac dyplomowych** absolwentów studiów 1 stopnia (pięć recenzji prac licencjackich na kierunku biologia, jedna recenzja pracy inżynierskiej na kierunku biotechnologia).

Dowodem uznania dla mojej pracy dydaktycznej była **nominacja do nagrody dla najbardziej cenionych i lubianych nauczycieli w Warszawie** w plebiscycie NAUCZYCIEL NA MEDAL organizowanym przez gazetę „Polska The Times”. Nominacja w kategorii nauczyciel akademicki została zgłoszona w 2018 r. przez anonimowych studentów. W wyniku głosowania uplasowałam się w pierwszej dziesiątce na ponad 160 kandydatur z różnych ośrodków naukowych miasta stołecznego.

**DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA** obejmuje członkostwo w różnych komisjach i zespołach zadaniowych oraz towarzystwach naukowych. Dotychczas, **byłam członkiem zespołu ds. modernizacji programu kształcenia na studiach I stopnia**, kierunek biologia Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW. Zespół ten został powołany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza, Edukacja, Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Społecznego Unii Europejskiej i działał przy realizacji projektu „Sukces z natury - kompleksowy program podniesienia jakości zarządzania procesem kształcenia i jakości nauczania Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (POWER.03.05.00-00-Z033/17)”.



Decyzją Dziekana Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie zostałam **powołana na członka Komisji Egzaminacyjnej z Praktyk Zawodowych** studentów biologii w latach 2016-2020, a także na **opiekuna roku studentów**, rozpoczynających studia na tym kierunku w roku akademickim 2017/2018 oraz 2019/2020. Dodatkowo, w roku 2019 byłam członkiem **zespołu pracującego nad weryfikacją prac dyplomowych** na kierunku biologia.

Od 2016 r. **jestem aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Botanicznego (PTB)**. W latach 2016 – 2019 pełniłam funkcję **zastępcy przewodniczącego sekcji Kultur Tkankowych PTB**, zaś 17 października 2019 r., głosami członków Oddziału Warszawskiego PTB, zostałam wybrana do **Zarządu Oddziału**, w którym pełnię do dziś funkcję **sekretarza**. W ramach działalności Towarzystwa zostałam również powołana na **stanowisko delegata Oddziału Warszawskiego PTB do Walnego Zgromadzenia Delegatów**, na lata 2019 – 2022.

Chętnie włączam się również w przygotowania konferencji naukowych, zarówno o zasięgu krajowym jak i międzynarodowym. Już podczas studiów doktoranckich na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, brałam **udział w organizacji Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Ziemia – Roślina – Człowiek”** (Kraków, 11 – 12. IX. 2013 r.) oraz **11<sup>th</sup> Conference of the European Foundation for Plant Pathology „Healthy plants – healthy people”** (Kraków, 8 – 13. IX. 2014 r.). Po uzyskaniu stopnia doktora, byłam członkiem komitetu organizacyjnego **XV Ogólnopolskiej Konferencji Kultur *in vitro* i Biotechnologii Roślin** „Biotechnologiczne wykorzystanie zmienności w warunkach kultur *in vitro*” (Rogów 17 – 20. IX. 2018r.). Aktywnie uczestniczę także w przygotowaniach do **Jubileuszu 100-lecia PTB**, jak również pracuję przy organizacji **59 Zjazdu PTB**, który odbędzie się tuż po obchodach Jubileuszu 100-lecia (planowany termin: 29. VI. – 3. VII. 2022 r.). Dodatkowo, podczas 58 Zjazdu PTB w Krakowie (1 – 7. VII. 2019 r.) miałam przyjemność prowadzić sesję plakatową w ramach obrad Sekcji Kultur Tkankowych.

Dostrzegając potrzebę propagowania wiedzy w społeczeństwie, a w szczególności wśród młodych ludzi, z przyjemnością angażuję się w **DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKĄ**, przejawiającą się przede wszystkim aktywnym udziałem w organizacji otwartych imprez popularnonaukowych. Kilukrotnie uczestniczyłam w przygotowaniach, pokazach i warsztatach prowadzonych w ramach (i) **Festiwalu Nauki** pod hasłem „Z nauką przez wieki” (21 – 24. V. 2014 r.) oraz „Oświeć się!” (20 – 23. V. 2015 r.) oraz (ii) **Małopolskiej Nocy Naukowców** (27. IX. 2013 r., 26. IX. 2014 r. i 25. IX. 2015 r.), a od momentu zatrudnienia w SGGW zaangażowałam się w coroczne przygotowania (iii) **Dni**

**SGGW.** Oprócz planowania i prowadzenia inspirujących doświadczeń biologicznych na stanowisku Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW, w latach 2018 – 2019 opracowywałam także pytania z zakresu botaniki do prestiżowego konkursu „**Start po indeks**”, odbywającego się podczas Dni SGGW wśród maturzystów zainteresowanych podjęciem studiów na SGGW.

Od dwóch lat prowadzę **zajęcia z biologii na kursie wyrównawczym** dla chętnych nowoprzyjętych studentów SGGW, który odbywa się przed rozpoczęciem każdego roku akademickiego. Jego celem jest powtórzenie, usystematyzowanie i uzupełnienie wiedzy biologicznej, a także uzmysłowienie przyszłym studentom, że nauka może być przyjemna i pożyteczna. **Zamiłowanie do nauk biologicznych** staram się również krzawić **wśród uczniów warszawskich szkół średnich odwiedzających uczelnię**, którym pokazuję fascynujący świat przyrody, zachęcając jednocześnie do podjęcia studiów biologicznych.

Jako członek Polskiego Towarzystwa Botanicznego – najstarszej w Polsce organizacji przyczyniającej się do upowszechniania szeroko rozumianej wiedzy botanicznej, **uczestniczę w organizacji seminariów otwartych dla wszystkich członków i sympatyków Oddziału**, a na jednym ze spotkań wygłosiłam zaproszony referat pt. „Rośliny galmanowe - możliwość zastosowania w fitoremediacji” (16. III. 2016 r.). Aktywność na rzecz PTB wpisała się w zakres moich codziennych czynności zawodowych. Od momentu przyjęcia funkcji sekretarza Oddziału Warszawskiego PTB **współprowadzę stronę Oddziału** na jednym z internetowych portali społecznościowych (<https://www.facebook.com/Polskie-Towarzystwo-Botaniczne-Oddzial%C5%82-Warszawski-907101382688178/>), gdzie zamieszczam bieżące informacje, między innymi na temat różnych wydarzeń i inicjatyw naukowych, ciekawostek botanicznych, relacji z sesji terenowych, promując tym samym naukę wśród szerokiego grona odbiorców.

Dodatkowo, **przygotowałam i opublikowałam dwa artykuły popularno-naukowe**. Pierwszy z nich, pt. „Callus induction and rhizogenesis in *Lathyrus sativus* L.”, ukazał się w 2016 roku na łamach Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis (zał. 4, poz. V.24). Z kolei w czasopiśmie Wiadomości Botaniczne, w ramach sprawozdania z XV Ogólnopolskiej Konferencji Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin, wydrukowany został artykuł z moim współautorstwem, który przedstawia obszerne omówienie tematyki kultur *in vitro* roślin zarówno w historycznym jak i aktualnym ujęciu tej dziedziny nauki (zał. 4, poz. V.25).

**PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO****Tab. 1. Parametryczna ocena dorobku naukowego.**

|  | <b>przed<br/>doktoratem</b> | <b>po doktoracie</b> | <b>łącznie</b> |
|--|-----------------------------|----------------------|----------------|
| <b>IF</b>  | 1,152                       | 86,295               | <b>87,447</b>  |
| <b>IF<sub>2019</sub></b>   | 1,999                       | 97,352               | <b>99,351</b>  |
| <b>IF<sub>5-letni</sub></b>  | 2,136                       | 89,531               | <b>91,667</b>  |
| <b>MNiSW</b>   | 143                         | 2312                 | <b>2455</b>    |
| <b>Liczba cytowań (wg SCOPUS)</b><br>stan na 13.02.2021 r.                 | 2                           | 377                  | <b>379</b>     |
| <b>Liczba cytowań bez autocytowań</b><br>(wg SCOPUS) stan na 13.02.2021 r. | 2                           | 264                  | <b>266</b>     |
| <b>Indeks Hirscha (wg SCOPUS)</b><br>stan na 13.02.2021 r.                 | <b>1</b>                    | <b>12</b>            | -----          |

**Tab. 2. Liczba, miejsce i rodzaj publikacji naukowych.**

| <b>Miejsce opublikowania</b>                                | <b>przed<br/>doktoratem</b> | <b>po doktoracie</b> | <b>łącznie</b> |
|---|-----------------------------|----------------------|----------------|
| w czasopismach posiadających IF                             | 2                           | 28                   | <b>30</b>      |
| w czasopismach nieposiadających IF<br>(dawną listą B MNiSW) | 17                          | 1                    | <b>18</b>      |
| rozdziały w monografiach                                    | 8                           | 2                    | <b>10</b>      |
| inne  | 9                           | 2                    | <b>11</b>      |
| <b>suma:</b>  | <b>36</b>                   | <b>33</b>            | <b>69</b>      |
| w tym jako pierwszy autor                                   | 23                          | 14                   | <b>37</b>      |
| jako autor korespondencyjny                                 | 23                          | 13                   | <b>36</b>      |
| <b>Rodzaj publikacji</b>                                    |                             |                      |                |
| prace oryginalne  | 17                          | 27                   | <b>44</b>      |
| prace przeglądowe   | 19                          | 6                    | <b>25</b>      |
| streszczenia konferencyjne                                  | 48                          | 26                   | <b>74</b>      |

  
 .....  
 (podpis wnioskodawcy)