

Planowane w projekcie badania mają na celu ustalenie roli komórek w mechanizmie tolerancji na metale ciężkie dominujące w glebach galmanowych (cynk i ołów) u gatunków z rodzaju *Viola*. Gleby galmanowe są kolonizowane przez gatunki należące do różnych rodzin roślin okrytonasiennych, które charakteryzują się wysoką odpornością na ekstremalne stężenia metali ciężkich w glebie. Rośliny takie nazywa się metalofitami. W rodzinie *Violaceae*, szczególnie w rodzaju *Viola* (fiołek) wiele gatunków jest metalofitami, które występują na glebach galmanowych bogatych w cynk, ołów i kadm, serpentynowych o wysokich stężeniach magnezu i niklu, miedzionośnych oraz bogatych w arsen. Najbardziej odporne są różne gatunki bratków, które kolonizują gleby galmanowe np. fiołek trójbarwny (*Viola tricolor*), tzw. fiołki cynkowe - niebieski (*Viola lutea* ssp. *westfalica*) i żółty (*V. lutea* ssp. *calaminaria*), liczne gatunki albańskich bratków gleb serpentynowych czy fiołek polny (*Viola arvensis*), który przygodnie zasiedla tereny metalonośne. Wśród fiołków są także gatunki, które nie występują na glebach o podwyższonych stężeniach metali ciężkich np. fiołek błotny (*Viola uliginosa*), gatunek w Polsce zagrożony wyginięciem. Wśród metalofitów wyróżnia się metalofity obligatoryjne rosnące wyłącznie na terenach zanieczyszczonych, do których zaliczyć można niebieskiego fiołka cynkowego, występującego na jedynym stanowisku w Niemczech (Blankenrode) oraz metalofity fakultatywne tworzące liczne populacje na terenach pohutniczych hałd, a także na glebach niezanieczyszczonych jak np. fiołek trójbarwny oraz fiołek polny, przy czym ten ostatni gatunek w Polsce występuje jedynie na glebach nieskażonych, podczas gdy w niektórych krajach europejskich ma swoje stanowiska na glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Planowane w ramach projektu badania pozwolą na ustalenie roli komórek w mechanizmie tolerancji roślin na działanie wysokich stężeń metali ciężkich. Modelem do badań będzie zawiesina komórkowa uzyskana z wybranych gatunków fiołków reprezentujących różny poziom tolerancji ustalony na podstawie ich miejsc występowania (stanowiska metalonośne vs. niemetalonośne).

Dotychczas badania nad tolerancją roślin na metale ciężkie dotyczyły analizy reakcji całej rośliny bądź jej organów czy tkanek na działanie stresów abiotycznych. W niniejszym projekcie działaniu metali ciężkich zostaną poddane pojedyncze komórki w zawieszynie. Uzyskanie stabilnej kultury zawiesinowej w warunkach kultur *in vitro* wymaga odpowiedniego przygotowania tkanki, która zostanie użyta do założenia kultury. Zwykle kultura zawiesinowa komórek zakładana jest z tkanki przyrannej – kalusowej, która indukowana jest z liści rośliny, na pożywce zawierającej odpowiedni stosunek hormonów roślinnych (auksyn/cytokinin). Poziom tolerancji na poziomie komórki został określony w badaniach wstępnych, poprzez aplikację różnych stężeń cynku i ołowiu bezpośrednio do kultury. W projekcie zostanie oznaczony poziom akumulacji cynku i ołowiu w biomasie komórek i ich lokalizacja w strukturach komórki. Przeprowadzony zostanie test na programowaną śmierć komórki (PCD) przez oszacowanie aktywności kaspazy-1 oraz zastosowanie jej inhibitora, co pozwoli ustalić czy zmniejszająca się frekwencja żywotnych komórek pod działaniem metali jest wynikiem zmian nekrotycznych, czy uruchomieniem mechanizmu PCD. Inhibicja kaspazy-1 mająca na celu hamowanie szlaku programowanej śmierci komórki, będzie wstępem do dalszych badań nad indukcją wyższej tolerancji. Komórki które przeżyją najwyższe stężenia metali będą wyłożone na pożywkę stałą w celu sprawdzenia czy są zdolne do podziałów, w wyniku których wytworzy się tkanka kalusowa, w obrębie której powstaną zawiązki pędów przybyszowych (organogeneza), z których po ukorzenieniu będzie można uzyskać zregenerowane rośliny o wysokim stopniu tolerancji na metale ciężkie. Uzyskane wyniki pozwolą oszacować w jaki sposób pojedyncza komórka jest zdolna do uruchomienia mechanizmów tolerancji przed ponadprogowymi stężeniami metali ciężkich.

Wykorzystanie do badań w projekcie gatunków/genotypów o różnym stopniu tolerancji na wysokie stężenia metali ciężkich pozwoli ustalić czy w rodzaju *Viola* istnieje podwyższona tolerancja na metale ciężkie, czy nawet komórki roślin nie występujących na glebach zanieczyszczonych czyli potencjalnie nietolerancyjne są zdolne pod wpływem bezpośredniego abiotycznego stresu do uruchomienia mechanizmów tolerancyjnych i przeżycia w ekstremalnych warunkach.