

Planowane w pracy doktorskiej badania mają na celu ustalenie roli komórek roślinnych w mechanizmie tolerancji na metale ciężkie dominujące w glebach galmanowych (cynk i ołów) u gatunków z rodzaju *Viola* L. 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 zanieczyszczonych np. fiołek błotny (*Viola uliginosa*), gatunek w Polsce zagrożony wyginięciem. Wśród metalofitów wyróżnia się metalofity obligatoryjne rosnące wyłącznie na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, metalofity fakultatywne tworzące populacje na terenach metalonośnych oraz niemetalonośnych, a także metalofity przygodne, sporadycznie zasiedlające tereny zanieczyszczone.

Modelem do badań w ramach pracy doktorskiej są komórki uzyskane z wybranych gatunków fiołków reprezentujących różny poziom tolerancji ustalony na podstawie ich miejsc występowania (stanowiska metalonośne vs. niemetalonośne): *V. lutea* ssp. *westfalica* (metalofit obligatoryjny), *V. tricolor* (metalofit fakultatywny – zarówno z populacji metalicznej jak i niemetalicznej), *V. arvensis* (metalofit przygodny) i *V. uliginosa* (niemetalofit – gatunek nie występujący na terenach zanieczyszczonych). Celem badań jest ustalenie poziomu tolerancji i reakcji komórek roślinnych (akumulacja metali, zdolność do podziałów i organogenezy, uleganie programowanej śmierci komórki, biosynteza cyklotydów) na obecność różnych stężeń cynku i ołowiu aplikowanych do zawiesiny komórkowej wybranych gatunków z rodzaju *Viola* L., w warunkach kultur *in vitro*.

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 zawieszinowej w warunkach kultur *in vitro* wymaga odpowiedniego przygotowania tkanki, która zostanie użyta do założenia kultury. Zwykle kultura zawieszinowa komórek zakładana jest z tkanki przyrannej – kalusowej, która indukowana jest z liści rośliny, na pożywce zawierającej odpowiedni stosunek hormonów roślinnych (auksyn/cytokinin). Poziom tolerancji komórek został określony w badaniach wstępnych, poprzez aplikację różnych stężeń cynku i ołowiu bezpośrednio do kultury zawiesziny komórkowej i jest on stosunkowo wysoki dla wszystkich wybranych do badań gatunków *Viola*. Oszacowano lokalizację cynku i ołowiu w strukturach komórkowych z użyciem mikroskopii elektronowej z mikroanalizą rentgenowską, co potwierdza gromadzenie się złogów metali głównie w ścianie komórkowej i wakuoli. W projekcie został oznaczony także poziom akumulacji cynku i ołowiu w biomasie komórek, które przeżyły traktowanie najwyższymi stężeniami metali, wskazując na gromadzenie dużych ilości zarówno Zn jak i Pb. Przeprowadzony zostanie test na programowaną śmierć komórki (PCD) przez oszacowanie aktywności kaspazy 1 (odgrywającej kluczową rolę w PCD u roślin) i wykonanie testu TUNEL. Wyniki pozwolą ustalić czy zmniejszająca się frekwencja żywotnych komórek pod działaniem metali jest wynikiem zmian nekrotycznych czy uruchomienia mechanizmu PCD i będą wstępem do badań nad indukcją zwiększonej tolerancji na metale przez działanie inhibitorem kaspazy 1. Tolerancyjne komórki, które przeżyją najwyższe stężenia metali, po wyłożeniu na pożywkę są zdolne do podziałów, tworzenia mikrokalusów, a następnie sprawdzona zostanie ich zdolność do tworzenia pędów przybyszowych, z których po ukorzenieniu będzie można uzyskać zregenerowane rośliny o wysokim stopniu tolerancji na metale ciężkie.

W ramach planowanego stażu w konkursie ETIUDA 7 planuję oszacować poziom biosyntezy cyklicznych peptydów – cyklotydów w komórkach wybranych gatunków, po aplikacji cynku i ołowiu do zawiesziny komórkowej. Cyklotydy są nową klasą związków o unikatowej strukturze, występują tylko w sześciu rodzinach, przy czym liczne gatunki *Viola* L. (*Violaceae*) biosyntetyzują cyklotydy. Mają one szerokie spektrum właściwości biologicznych przez co są wykorzystywane w farmakologii i medycynie. W roślinach przyjmuje się, że pełnią funkcję ochronną przed czynnikami biotycznymi i abiotycznymi np. metalami ciężkimi.

Wykorzystanie do badań w projekcie gatunków/genotypów o różnym stopniu tolerancji na wysokie stężenia metali ciężkich pozwoli ustalić czy gatunki z rodzaju *Viola*, w toku ewolucji, wykształciły konstytutywną tolerancję na metale ciężkie. Ważnym wynikiem będzie wykazanie, że 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.