

## **Załącznik IIa**

**Załącznik IIa. Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych albo artystycznych, w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy – w sposób jednoznacznie wyróżniony w autoreferacie, w formie papierowej i elektronicznej, w języku polskim i angielskim.**

### **1. Imię i Nazwisko**

Aneta Słomka (*de domo Siuta*)

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

Doktor nauk biologicznych, Kraków, 2009

Tytuł rozprawy: Procesy mikroewolucyjne roślin w warunkach skażonego środowiska na przykładzie *Viola tricolor* L. (sekcja *Melanium* Ging. *Violaceae*)

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

styczeń 2013 - obecnie

Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie\*, \*\*

styczeń 2011 - grudzień 2012

Asystent naukowo-dydaktyczny, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

lipiec 2009 - grudzień 2010

Asystent naukowy, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie\*\*\*

\* - Urlop naukowy (październik 2016-marzec 2017)

\*\* - Urlop macierzyński (sierpień 2013-luty 2014)

\*\*\* - Urlop macierzyński (sierpień 2010-grudzień 2010)

### **4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

#### **a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

Pochodzenie i przystosowania europejskich bratków (*Viola* sect. *Melanium*, *Violaceae*) gleb metalonośnych na podstawie badań cech anatomiczno-morfologicznych, embriologicznych oraz genetycznych

#### **b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)**

- i. **Słomka-A.**, Żabicka J., Shuka L., Bohdanowicz J., Kuta E. 2018. Lack of correlation between pollen aperture number and environmental factors in pansies (*Viola* L., sect. *Melanium* Ging.) – pollen heteromorphism re-examined. *Plant Biology* 20: 555-562. **Punkty MNiSW<sub>2018</sub>: 35, IF<sub>2018</sub>: 2,156.**

- ii. **Słomka A.** Kwiatkowska M., Bohdanowicz J., Shuka L., Jędrzejczyk-Korycińska M., Borucki W., Kuta E. 2017a. Insight into “serpentine syndrome” of Albanian, endemic violets (*Viola* L., *Melanium* Ging. section) – Looking for unique, adaptive microstructural floral, and embryological characters. *Plant Biosystems* 151: 1022-1034.  
**Punkty MNiSW<sub>2017</sub>: 25, IF<sub>2017</sub>: 1,390.**
- iii. Bothe H., **Słomka A.** 2017. Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology* 29: 45-61.  
**Punkty MNiSW<sub>2017</sub>: 35, IF<sub>2017</sub>: 2,833.**
- iv. **Słomka-A.**, Godzik B., Szarek-Łukaszewska G., Shuka L., Hoef-Emden K., Bothe H. 2015. Albanian violets of the section *Melanium*, their morphological variability, genetic similarity and their adaptations to serpentine or chalk soils. *Journal of Plant Physiology* 174: 110-123.  
**Punkty MNiSW<sub>2015</sub>: 35, IF<sub>2015</sub>: 2,557.**
- v. Kuta E., Bohdanowicz J., **Słomka A.**, Pilarska M., Bothe H. 2012. Floral structure and pollen morphology of two zinc violets (*Viola lutea* ssp. *calaminaria* and *V. lutea* ssp. *westfalica*) indicate their taxonomic affinity to *Viola lutea*. *Plant Systematics and Evolution* 298: 445-455.  
**Punkty MNiSW<sub>2012</sub>: 25, IF<sub>2012</sub>: 1,312.**
- vi. **Słomka A.**, Kuta E., Szarek-Łukaszewska G., Godzik B., Kapusta P., Tylko G., Bothe H. 2011a. Violets of the section *Melanium*, their colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and their occurrence on heavy metal heaps. *Journal of Plant Physiology* 168: 1191-1199.  
**Punkty MNiSW<sub>2011</sub>: 35, IF<sub>2011</sub>: 2,791.**

**Sumaryczne punkty MNiSW: 190**  
**Sumaryczny IF: 13,039**

### c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Pogrubioną czcionką z podkreśleniem wyróżniłam publikacje mojego autorstwa wchodzące w skład osiągnięcia naukowego; pogrubioną czcionką wyróżniłam pozostałe (wybrane) publikacje mojego autorstwa.

#### I. WPROWADZENIE

Opisane w tej części autoreferatu badania naukowe dotyczą sekcji *Melanium* Ging. rodzaju *Viola* L. – modelu, który wybrałam, do badań nad adaptacją, tolerancją i pochodzeniem metalofitów, czyli roślin kolonizujących gleby o podwyższonych stężeniach metali ciężkich. Badania te były prowadzone we współpracy międzynarodowej z profesorem Hermannem Bothe (Uniwersytet w Kolonii, Niemcy), fizjologiem roślin, ekspertem w badaniach adaptacji roślin do zanieczyszczonego metalami ciężkimi środowiska, autorem licznych prac oryginalnych, przeglądowych, rozdziałów w książkach z tego zakresu, który był kilkakrotnie gościem Uniwersytetu Jagiellońskiego a także umożliwił mi odbycie kilku krótkoterminowych staży w Uniwersytecie w Kolonii. W tej kwestii współpracowałam również z profesorem Lulëzimem Shuka z Uniwersytetu w Tiranie (Albania), taksonomem i ekofizjologiem roślin, znawcą flory Półwyspu Bałkańskiego, z którym uczestniczyłam w wyprawie w góry albańskie w celu poznania flory gleb serpentynowych, w tym gatunków z rodzaju *Viola*. W zakresie współpracy krajowej, badania prowadzone były z Zakładem Ekologii Instytutu Botaniki PAN w Krakowie (prof. dr hab. Barbara Godzik, prof. dr hab. Grażyna Szarek-Łukaszewska, dr hab. Paweł Kapusta), z Katedrą Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego (prof. dr hab. Jerzy Bohdanowicz), z Katedrą Botaniki i Ochrony Przyrody Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (dr Monika Jędrzejczyk-Korycińska) oraz z Katedrą Botaniki SGGW w Warszawie (dr hab. Wojciech Borucki). Finansowe wsparcie otrzymałam ze środków MNiSW – projekt realizowany w latach 2012-2014 – w ramach którego odbyłam wyprawę do Albanii, zebrałam materiał i przeprowadziłam badania pozwalające na ustalenie pochodzenia, adaptacji, sukcesu reprodukcyjnego albańskich gatunków gleb serpentynowych (serpentyniofitów).

#### 1) Metale ciężkie, tereny metalonośne, metalofity

Metale ciężkie są pierwiastkami o gęstości powyżej 5 g/cm<sup>3</sup>, będące dla roślin zarówno niezbędnymi mikroelementami (np. Zn, Cu, Fe) oraz pierwiastkami niepotrzebnymi (balastowymi) (np. Pb, Cd, Cr). Zaliczane są do nich również pierwiastki o mniejszej gęstości, ale wykazujące toksyczne działanie (np. Al). Nawet niezbędne mikroelementy, jeśli występują w podwyższonej dawce, mogą wpływać negatywnie na rośliny, na drodze bezpośredniej (obecność metali w komórkach, tkankach *per se*) i/lub pośredniej poprzez generowanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (stres oksydacyjny). Efekty toksyczności metali na skutek ich aplikacji w eksperymentach *in vitro* lub w doświadczeniach doniczkowych w kontrolowanych warunkach, są widoczne na różnych poziomach funkcjonowania roślin. Metale mogą wpływać na podziały komórkowe; zaburzać przebieg mitozy i mejozy czego konsekwencjami są: ograniczony wzrost i problemy z rozmnażaniem generatywnym. Skutkiem ich działania mogą być także zaburzenie równowagi między poziomem wolnych rodników i reaktywnych form tlenu a ich usuwaniem, czyli stres oksydacyjny, prowadzący w dłuższej perspektywie czasowej do śmierci rośliny (Przedpeńska-Wąsowicz i Wierzbicka 2015). W glebie metale występują w sposób naturalny w postaci rud metali, obecnie rzadko, bowiem najczęściej są one przetworzone. Eksploatacja Zn, Ni, Pb, Au prowadzona była w Europie już w czasach prehistorycznych, a szczególnie rozwijała się w okresie średniowiecza. Od tego czasu stężenia metali ciężkich w glebie w wielu miejscach są bardzo przekroczone. Na takich

terenach wyewoluowała specyficzna flora z taksonami roślin, które wykształciły mechanizmy tolerancji pozwalające przetrwać w zanieczyszczonym metalami środowisku. Kilka rodzin roślin okrytonasiennych jest szczególnie bogatych w metalofity, m.in. Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Fabaceae, Poaceae, Violaceae. W rodzinie Violaceae, kilkanaście gatunków w rodzajach *Viola* L., *Rinorea* Aubl., *Hybanthus* Jacq., *Agatea* A. Gray, nie tylko charakteryzuje się podwyższoną tolerancją na metale, ale zdolnością do ich akumulacji w ponadprogowych stężeniach w częściach nadziemnych. Gatunki o takich właściwościach nazywa się hiperakumulatorami metali (Prasad i de Oliveira Freitas 2003; **Słomka i Kuta 2015**). W rodzaju *Viola*, obejmującym ok. 600 gatunków zasiedlających różne strefy klimatyczne na półkuli północnej, ewolucja tolerancji na metale ciężkie przebiegała na różnych szczeblach hierarchii taksonomicznej; procesy mikroewolucyjne i specjacja prowadziły do powstania lokalnych ekotypów/genotypów (np. *Viola tricolor*), podgatunków (np. *V. lutea* subsp. *westfalica*), gatunków (np. *V. dukadjinica*). Wśród nich wyróżnia się metalofity obligatoryjne (gatunki występujące wyłącznie na glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi) oraz metalofity fakultatywne (gatunki, których populacje zasiedlają zarówno gleby zanieczyszczone jak i niezanieczyszczone) (**Słomka i Kuta 2015; Słomka i in. 2015, Bothe i Słomka 2017**). Zdecydowana większość metalofitów w rodzaju *Viola* należy do jednej z 17 sekcji tego rodzaju, sekcji *Melanium* Ging. (bratki) (Fan i in. 2015; Marcussen i in. 2015; **Słomka i Kuta 2015**).

## **2) Sekcja *Melanium* w rodzaju *Viola* – model w badaniach tolerancji/adaptacji do zanieczyszczonego metalami środowiska**

Wiele gatunków bratków występuje w Europie na glebach galmanowych bogatych w Zn/Pb (np. *Viola lutea* subsp. *westfalica*, *V. lutea* subsp. *calaminaria*, *V. tricolor*), serpentynowych o wysokich stężeniach Ni/Cr/Fe/Mg (np. *V. albanica*, *V. raunsiensis*, *V. dukadjinica*), miedzionośnych bogatych w Cu (np. *V. tricolor*) i w As (np. *V. arsenica*) (**Słomka i in. 2015, 2017a i cyt. tam lit. Bothe i Słomka 2017**). Zbiorowiska roślinne terenów metalonośnych w Europie zachodniej i centralnej włączane są do rzędu Violetalia calaminariae, ze względu na reprezentujący je gatunek *Viola lutea* subsp. *calaminaria* (Ging.) Nauenb. (= *V. calaminaria* (Lej.) Ernst), potocznie nazywany żółtym fiołkiem cynkowym. Na zanieczyszczonych terenach południowej Westfalii (Niemcy), na jedynym stanowisku (Blankenrode) występuje *V. lutea* subsp. *westfalica* (Ernst) Hildebrandt (= *V. guestphalica* Nauenb.), tzw. niebieski fiołek cynkowy (Ellenberg 2009). Bratki obejmują grupę ok. 120 gatunków rozmieszczonych głównie w zachodniej Eurazji (wyjątek, północnoamerykański *V. bicolor*), wyraźnie zróżnicowaną kariologicznie (zakres liczb chromosomów  $n = 2-64$ ). Jest to taksonomicznie bardzo trudna grupa. Tworzą ją dobrze wyodrębnione gatunki morfologiczne, słabiej zróżnicowane genetycznie, co prowadzi do powstawania w tej grupie wielu płodnych międzygatunkowych mieszańców. Brak barier uniemożliwiających krzyżowanie i niskie międzygatunkowe zróżnicowanie genetyczne próbowano tłumaczyć młodym wiekiem sekcji *Melanium*. Przeczy temu najnowsza filogeneza rodzaju oparta o analizę genów (jądrowych i chloroplastowych) o niskiej liczbie powtórzeń datująca wiek braków na 17 mln lat, przy czym wiek całego rodzaju *Viola* szacuje się na 31 mln lat (Marcussen i in. 2015). Autorzy wskazują na dysploidalność zstępującą i wstępującą (efekt mutacji strukturalnych chromosomów) jako mechanizm odpowiedzialny za zróżnicowanie w liczbach podstawowych chromosomów w omawianej sekcji, czego konsekwencją jest brak wyraźnego związku między liczbami chromosomów a poziomami ploidalności. Według Erbena (1996) duże zróżnicowanie liczb chromosomów u bratków wynika z tego, że taksony sekcji *Melanium*, wśród których są nieliczne gatunki

rodzicielskie, zdominowane są przez mieszańce  $F_1$ , a głównie przez formy introgresywne (powstałe na skutek krzyżowań wstecznych z jednym z gatunków rodzicielskich).

Biorąc pod uwagę fakt, że bratki są w rodzaju *Viola* sekcją najliczniej reprezentowaną przez taksony występujące na glebach metalonośnych, można stawiać hipotezę, że w toku długotrwałej presji selekcyjnej wykształciły mechanizmy adaptacyjne pozwalające im na zasiedlanie takich terenów, przetrwanie, rozmnażanie się.

## II. GATUNKI DO BADAŃ ORAZ CELE BADAWCZE

Dwa fiołki (bratki) cynkowe, żółty i fioletowy, kolonizują tereny galmanowe (Zn/Pb) w Europie centralnej, żółty w Niemczech, Belgii, Holandii, niebieski jest endemitem Blankenrode (Niemcy, Westfalia). Pochodzenie obu gatunków było przedmiotem dyskusji w literaturze od lat 70-tych ubiegłego stulecia. Obszerne opracowanie Nauenburga (1986), oparte o analizę cech morfologiczno-anatomicznych, wskazywało, że oba gatunki są odrębne morfologicznie, a zatem, według Autora, niebieski fiołek cynkowy powinien mieć rangę osobnego gatunku (*V. guestphalica* Nauenburg spec. nova), zwłaszcza że, jak zauważa Nauenburg, jego liczba chromosomów wynosi  $2n = 52$  ( $2n = 48$  w przypadku żółtego fiołka), co mogłoby wskazywać na autoploidalne pochodzenie od *V. tricolor* ( $2n = 26$ ). Takie ujęcie obu fiołków, jako odrębnych gatunków, występuje we współczesnych opracowaniach, florach roślin naczyniowych, np. niemieckiej (Schmeil i Fitschen 2010). Weryfikacja stanowiska Nauenburga w oparciu o inne, nowocześniejsze metody badawcze, stała się przedmiotem moich badań.

Oba fiołki cynkowe występują na nizinach Europy. Musiały zatem najpewniej „przywędrować” na te obszary z rejonów wysokogórskich Bałkanów, które uważane są za centrum bioróżnorodności i miejsce różnicowania się sekcji *Melanium* (Erben 1996). Z kolei, na obszarach górskich i wysokogórskich Bałkanów na glebach serpentynowych o wysokich stężeniach Ni, Cr, Fe, Co oraz Mg wykształciła się specyficzna flora serpenetynowa. W ujęciu syntaksonomicznym, według najnowszej klasyfikacji, zaliczana do klasy Festuco-Brometea, składnikiem której jest wiele gatunków endemicznych bratków (Stevanović i in. 2003, Leuschner i Ellenberg 2018). W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w badaniach geobotanicznych na tych terenach, wciąż jednak gatunki tam występujące są słabo przebadane, zwłaszcza na terenach krajów byłej Republiki Jugosławii, ze względu na uwarunkowania polityczne i społeczne (Brady i in. 2005). W zakresie biologii taksonów gleb serpentynowych wiadomo jeszcze mniej. Znany jest tylko fakt, że ze względu, nie tylko na wysokie stężenia metali, ale niską dostępność Ca, N, P w glebie, przesuszenie terenu, rośliny z gleb serpentynowych rozwijają tzw. syndrom serpentynowy, są niewysokie, ich organy nadziemne są pokryte gęstymi włoskami, grubą kutykulą, posiadają szaro-zielone lub niebiesko-nabiegłe liście o cechach kseromorficznych, silnie rozwinięty system korzeniowy (Kazakou i in. 2008). Brak badań i danych na temat procesów reprodukcyjnych (prawdopodobnie upośledzonych pod wpływem skrajnych warunków), cech przystosowawczych w budowie kwiatu umożliwiających sukces reprodukcyjny, roli mikoryzy w adaptacji roślin do tych terenów, skłonił mnie do podjęcia intensywnych badań, którymi objęłam kilka gatunków albańskich bratków: *V. albanica*, *V. dukadjinica*, *V. raunsiensis* (obligatoryjne metalofity) oraz *V. tricolor* subsp. *macedonica*, *V. schariensis* (fakultatywne metalofity).

Przedstawione jako dzieło habilitacyjne publikacje naukowe obejmują badania *in situ* nad wymienionymi gatunkami bratków zasiedlającymi gleby galmanowe Europy centralnej i zachodniej (tzw. fiołki cynkowe) oraz gleby serpentynowe Europy południowej (fiołki albańskie) i koncentrują się na ich: (1) pochodzeniu i pokrewieństwach; (2) strategiach względem metali ciężkich (akumulacja vs wykluczanie)

oraz roli mikoryzy w adaptacji do warunków gleb metalonośnych; (3) sukcesie reprodukcyjnym oraz cechach organów generatywnych o charakterze adaptacyjnym.

### III. WYNIKI I WNIOSKI

#### Ad. 1. Pochodzenie i pokrewieństwo metalofitów

##### a) *Fiołki cynkowe gleb galmanowych*

Wyniki wcześniejszych moich badań nad pochodzeniem tzw. fiołków cynkowych, w których użyte zostały markery jądrowego DNA, ITS (*ang. Internal Transcribed Sequence*), wykazały duże pokrewieństwo obydwu fiołków cynkowych ze sobą i z *Viola lutea* (fiołek żółty), natomiast brak pokrewieństwa z *V. tricolor* (fiołek trójbarwny) (**Hildebrandt i in. 2006**). To podważało stanowisko Nauenburga (1986) o pochodzeniu niebieskiego fiołka cynkowego od *V. tricolor* i nadaniu mu rangi gatunku. W dalszych badaniach (włączonych w **osiągnięcie**), wykorzystywałam cechy mikrostrukturalne kwiatu, które potwierdziły wyniki badań molekularnych (**Kuta i in. 2012, Bothe i Słomka 2017**). W doborze cech mikrostrukturalnych kwiatu, wykorzystywałam głównie cechy słupka (znamienia i szyjki), które uznawane są za ważne cechy diagnostyczne w rodzaju *Viola* (Clausen 1927, 1931, Beattie 1974 i cyt. tam lit., **Słomka i in. 2013**). Badania zmienności międzygatunkowej (wewnątrz-sekcyjnej) cech kwiatu w rodzaju *Viola* nie były prowadzone, za wyjątkiem pewnych aspektów związanych z biologią zapylania (Freitas i Sazima 2003), moje badania są zatem nowością w tym względzie. Kompleksowa analiza cech kwiatu (oprócz znamienia słupka - płatków, wyrostków pręcików, nektarników) wykazała podobieństwo pomiędzy *V. lutea* oraz żółtym i niebieskim fiołkiem cynkowym w takich cechach jak: sposób użytkowania dolnych i bocznych płatków (linie wskaźnikowe dla zapylaczy, *ang. nectar guides*), sposób ułożenia płatków górnych, kształt i wielkość włosków oraz brodawek na nektarnikach. Tymi cechami różniły się oba fiołki cynkowe od pozostałych dwóch domniemyanych rodziców - *V. tricolor*, *V. arvensis* (fiołek polny), włączonych w moje badania (**Kuta i in. 2012**).

Na podstawie wykazanego przeze mnie pokrewieństwa/podobieństwa fiołków cynkowych z fiołkiem żółtym, stwierdzam, że jest to gatunek ancestralny dla fiołków cynkowych, zatem obydwie fiołki cynkowe powinny być utrzymane w randze jego podgatunków, jak to miało miejsce wcześniej, tj. *V. lutea* subsp. *calaminaria* (Ging.) Nauenb. (żółty fiołek cynkowy), *V. lutea* subsp. *westfalica* (Ernst) Hildebrandt (niebieski fiołek cynkowy) (**Hildebrandt i in. 2006, Kuta i in. 2012, Bothe i Słomka 2017**). Zasięg *V. lutea* obecnie jest stosunkowo wąski, występuje jedynie w górach Europy (Wogezy, Sudety) oraz na nizinach Wielkiej Brytanii. Możliwe są zatem dwie drogi powstania (pochodzenia) fiołków cynkowych: (i) są gatunkami, które wyewoluowały na glebach metalonośnych z *V. lutea*, zakładając że zasięg tego gatunku w przeszłości był dużo szerszy niż obecnie, (ii) nasiona *V. lutea* zostały przeniesione z gór na niziny przez pasterzy wypasających owce i tam następowała ewolucja tych gatunków.

##### b) *Bratki albańskie gleb serpentynowych*

Albańskie gatunki bratków różniły się między sobą wyraźnie w takich cechach morfologicznych jak: pokrój rośliny (np. *V. raunsiensis* z pędem rozgałęziającym się nad ziemią vs *V. albanica* i *V. dukadjinica* z podziemnymi rozgałęzieniami pędu), kształt liści i przylistków, budowa kwiatu, natomiast nie wykazywały różnic genetycznych na poziomie markerów molekularnych ITS. Cała grupa przebadanych albańskich bratków zawierająca, oprócz ww. również *V. aetolica*, gatunek gleb wapiennych, na drzewie filogenetycznym znalazła się pomiędzy *V. lutea* a *V. arvensis* (**Słomka i in. 2015**). Według Clausena (1927, 1931), *V. arvensis* (oprócz *V. tricolor*) jest gatunkiem wyjściowym dla sekcji *Melanium*. *Viola lutea*, z kolei, co zostało już powiedziane, jest taksonem wyjściowym dla obu

fiolzków cynkowych (Kuta i in. 2012, Bothe i Słomka 2017). Podobnie jak w przypadku fioletów cynkowych, gatunek *V. tricolor* nie brał udziału w powstaniu bratków z Albanii, a wykazany został ich związek z *V. lutea*, gatunkiem górskim. Jest to o tyle ciekawe odkrycie, że włącza metalofity z rodzaju *Viola* w krąg gatunków, które wywodzą się z gatunków górskich (Bothe i Słomka 2017). W obszarach górskich zawartość metali w glebie jest niejednokrotnie podwyższona ze względu na skład mineralny takich gleb (Słomka i in. 2011a). Wydaje się zatem, że preadaptacja do tolerancji na metale ciężkie istniała już u gatunków górskich (wyjściowych dla metalofitów), zanim zaczęły one zajmować położone niżej tereny metalonośne.

## **Ad. 2. Strategie względem metali ciężkich (akumulacja vs wykluczanie), rola mikoryzy w adaptacji do warunków gleb metalonośnych**

### **a) Strategia wykluczania**

Interesujące, oprócz pochodzenia fioletów cynkowych oraz albańskich, było zbadanie, jakie cechy uwarunkowały przystosowanie się tych taksonów do wysokiego poziomu zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi. Analizowano zatem akumulację metali ciężkich w organach roślin, w przypadku fioletów cynkowych w porównaniu do niemetalofitów (dwa podgatunki *V. lutea*) i metalofita fakultatywnego (*V. tricolor*), w przypadku fioletów albańskich w odniesieniu do niemetalofita *V. aetolica* w celu ustalenia strategii (akumulacja vs wykluczanie) oraz stopień kolonizacji korzeni przez grzyby mikoryzowe jako jeden z mechanizmów obronnych przed metalami ciężkimi.

Gleby terenów, na których występują fiołki cynkowe zawierają bardzo wysokie stężenia cynku (4500-42000 mg/kg s.m.) oraz ołowiu (2800-10269 mg/kg s.m.) (Słomka i in. 2011a). Zdolność do hiperakumulacji fioletów cynkowych była dyskutowana wcześniej przez innych badaczy, aczkolwiek nie została dobrze udokumentowana (Jędrzejczyk i in. 2002). Wykorzystując płuczkę ultradźwiękową usuwającą nawet najdrobniejsze cząsteczki gleby przylegające do powierzchni roślin, wykazałam, stosując metodę AAS (*ang. Atomic Absorption Spectrophotometry*), że żółty fiołek cynkowy gromadzi Zn, Pb i Cd przede wszystkim w korzeniach, tylko niewielki procent tych metali przemieszczany jest do liści. Niebieski fiołek cynkowy, z kolei, wykazuje strategię przemieszczania Zn - dwukrotnie więcej cynku było w liściach niż w korzeniach (3719 mg/kg s.m. vs 1819 mg/kg s.m.), natomiast gromadzenia w korzeniu Pb i Cd. Oba fiołki cynkowe są jednak roślinami wykluczającymi metale, bowiem akumulują metale w korzeniach i pędach poniżej stężeń oznaczonych dla tych pierwiastków w glebie (niskie współczynniki bioakumulacji) (Słomka i in. 2011a). Ponadto, fiołki cynkowe nie wymagają metali ciężkich do prawidłowego wzrostu i rozwoju, a ich niedobór nie powoduje upośledzenia wzrostu i rozwoju, tak jak ma to miejsce w przypadku niektórych obligatoryjnych halofitów (Siuta i in. 2005, Słomka i in. 2011a). Fioletki albańskie (metalofity obligatoryjne) rosły również na glebie o wyraźnie podwyższonych stężeniach metali, chociaż oczywiście dominowały inne, ze względu na specyfikę podłoża, tj. Ni (2097-3453 mg/kg s.m.), Cr (289-971 mg/kg s.m.) oraz o wysokim stosunku Mg/Ca (8,5 - 43,2), typowym dla gleb serpentynowych. Wszystkie przebadane, podobnie jak fiołki cynkowe, wykluczały metale z części nadziemnych, gromadząc je w korzeniach w ilościach nieprzekraczających zawartości w glebie (strategia wykluczania) (Słomka i in. 2015).

### **b) Mikoryza arbuskularna**

Głównym przystosowaniem jakie rozwinęły fiołki cynkowe oraz bratki albańskie w odniesieniu do metali ciężkich w glebie, jest wytwarzanie silnie rozbudowanej mikoryzy arbuskularnej (powyżej 48%, metoda przecinających się linii siatki, *ang. gridline intersect method*) w przypadku wszystkich gatunków za wyjątkiem *V. albanica* (7,5%), z widocznymi arbuskulami i wezykulami. Stopień kolonizacji korzeni przez grzyby



mikoryzowe, u fiołków cynkowych jest pozytywnie skorelowany z poziomem zanieczyszczenia gleby metalami, u bratków albańskich nie obserwuje się takiej korelacji (Hildebrandt i in. 1999; **Słomka i in. 2011a**; Bothe i in. 2013, **Słomka i in. 2015**). Mimo, że tworzenie arbuskularnej mikoryzy, jest zjawiskiem dość częstym w rodzaju *Viola* (Wang i Qiu 2006), nie było wiadomo czy istnieje jakikolwiek związek stopnia zmikoryzowania roślin z zanieczyszczeniami gleb metalami ciężkimi. Uzyskane wyniki są o tyle ciekawe, że podaje się, że wysokie stężenia metali powodują spadek liczby spor oraz spadek bioróżnorodności gatunkowej i zróżnicowania wewnątrzgatunkowego grzybów mikoryzowych (Del Val i in. 1999), nawet według nowszych doniesień (np. Gucwa-Przepióra i in. 2013), opublikowanych po ukazaniu się moich prac. Wysoki stopień zmikoryzowania korzeni fiołków cynkowych i gatunków albańskich na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi może wskazywać na występowanie wysoce tolerancyjnych szczepów *Glomus*, które podnoszą tolerancję roślin na metale. Ponadto, mikoryza pełni rolę ograniczającą i ochronną w transporcie metali do części nadziemnych, pozwalając tym samym brątkom na wzrost oraz sukces reprodukcyjny na terenach metalonośnych (**Słomka i in. 2011a, 2015**).

### **Ad. 3. Sukces reprodukcyjny, cechy organów generatywnych o charakterze adaptacyjnym do warunków zanieczyszczonego metalami środowiska**

Na podstawie moich badań, okazało się, że pewne cechy związane z budową kwiatów, oprócz znaczenia taksonomicznego (patrz pkt. 1), mogą być u bratków także cechami adaptacyjnymi do skrajnych warunków wysokogórskich, w tym gleb serpentynowych. Do takich cech zaliczyłam: obecność włosków głęboko w ostrodze (turkowata struktura utworzona przez płatek dolny, do której u gatunków *Viola* wchodzi wyrostki - nektarniki dwóch z pięciu pręcików), silnie rozbudowaną warstwę tanin w integumencie zewnętrznym zalążków pełniącą rolę ochronną przed roślinożercami oraz silnym nasłonecznieniem, występowanie heteromorfizmu pyłku (w pylnikach tego samego kwiatu występują ziarna pyłku z różną liczbą apertur, 3-6) zapewniającego produkcję ziaren pyłku o różnym czasie trwania jego żywotności oraz różnym tempie kiełkowania (**Słomka i in. 2017a**). Są to cechy, które dodatkowo zwiększają sukces reprodukcyjny bratków rosnących w takich stresowych warunkach, nie występowały bowiem lub występowały z mniejszym nasileniem u gatunków z gleb nieserpentynowych.

Uważa się, że populacje z terenów metalonośnych ponoszą tzw. koszty tolerancji, co oznacza, że produkują mniejszą liczbę nasion w stosunku do swoich odpowiedników z terenów niemetalonośnych. Tłumaczy się to faktem, że zużywają dużo energii na zniwelowanie negatywnego wpływu metali w tkankach, która tym samym nie może być spożytkowana na sukces rozrodczy albo też tym, że metale negatywnie (bezpośrednio lub pośrednio) wpływają na przebieg procesów reprodukcyjnych, upośledzając je. W obu przypadkach prowadzi to do stwierdzanych degeneracji i zaburzeń rozwojowych w zalążkach, pylnikach, a w konsekwencji do obniżenia produkcji nasion (**Słomka i in. 2012a**). Wysoka żywotność pyłku (średnio 87%) oraz jego heteromorfizm, obecność włosków w ostrodze, dzięki którym pyłek danego kwiatu jest gromadzony w większych ilościach w celu przeniesienia go przez owada, ochrona rozwijających się zalążków zawierających „cenne” gametofity żeńskie oraz zarodki przez warstwę tanin, skutkują wysoką frekwencją rozwijających się nasion u badanych gatunków, średnio 65% zalążków przekształca się w nasiona (**Słomka i in. 2017a**). Procent degeneracji megasporocytów, megaspor, gametofitów żeńskich, zarodków u badanych obligatoryjnych serpentyniofitów jest różny (33-63%), spowodowany prawdopodobnie innymi czynnikami (m.in. wysokością n.p.m., wpływem silnego nasłonecznienia, niedoborem substancji odżywczych, wewnętrznymi czynnikami związanymi z genetyczną niestabilnością

taksonów), niż obecność metali ciężkich w organach generatywnych (**Słomka i in. 2017a**). Wynika to z omówionych wcześniej wyników, wskazujących, że wszystkie przebadane bratki albańskie wykluczają metale z części nadziemnych, gromadzą je w korzeniach w ilościach nieprzekraczających zawartości w glebie (strategia wykluczania) (**Słomka i in. 2015**).

Jedną ze wspólnych cech budowy kwiatów uznaną za zwiększającą dostosowanie bratków albańskich był heteromorfizm pyłku (**Słomka i in. 2017a**). Prowadzone wcześniej badania wykazały, że u bratków dominującym typem ziaren pyłku są ziarna 4-aperturowe, podczas gdy w pozostałych sekcjach rodzaju *Viola*, ziarna 3-aperturowe. Na podstawie badań *in vivo* oraz *in vitro* wykazano również, że w przypadku 4-aperturowych ziaren czas po jakim kiełkują wyłożone na pożywkę jest krótszy, ale za to łagiewka 3-aperturowych ziaren rośnie szybciej, a same 3-aperturowe ziarna przez dłuższy czas (w porównaniu z 4-aperturowymi) zachowują potencjalną zdolność do kiełkowania. Zatem produkcja różnych proporcji 3- i 4-aperturowych ziaren pyłku mogłaby być zależna od warunków ekologicznych (Dajoz i in. 1991, 1993). Istotnie, u *V. calcarata*, następuje spadek średniej liczby apertur (wzrost liczby ziaren trójaperturowych) wraz z wysokością n.p.m., spowodowany stwierdzonym spadkiem liczby zapylaczy w wyżej położonych rejonach (Till-Bottraud i in. 1999). Czy taka zmiana średniej liczby apertur występuje na skutek zmiany wysokości n.p.m. oraz w zależności od obecności/braku metali ciężkich w glebie u innych gatunków? W swoich badaniach wykorzystując pyłek 24 gatunków bratków z 46 populacji pochodzących z 8 krajów europejskich, ze stanowisk metalonośnych, niemetalonośnych, położonych na różnej wysokości nad poziomem morza (2-2386 m n.p.m), analizowałam wpływ tych warunków na średnią liczbę apertur oraz żywotność pyłku. Własne badania, ograniczone początkowo wyłącznie do polskich okazów *V. tricolor*, wykazywały występowanie pyłku 3-aperturowego (obok 4- i 5-aperturowego) u roślin rosnących na zanieczyszczonych metalami glebach, którego obecności nie potwierdzałam u roślin z terenów niezanieczyszczonych metalami ciężkimi (**Słomka i in. 2014b**). Nie wiadomo było na ile może to być istotny trend u innych gatunków i czy rzeczywiście dochodzi do zmiany proporcji w produkcji 3-, 4-, 5- aperturowych ziaren, a zatem do zmiany średniej liczby apertur u gatunków sekcji *Melanium* w takich warunkach. Na podstawie tak obszernych badań oraz wnikliwej analizy korelacji stwierdziłam, że generalnie u bratków, na średnią liczbę apertur nie wpływają takie czynniki jak występowanie na glebach metalonośnych oraz wysokość n.p.m. Wykazałam jedynie negatywny wpływ wysokości n.p.m. na żywotność pyłku; występowała negatywna korelacja między żywotnością pyłku a wysokością n.p.m. Żywotność pyłku nie była natomiast obniżona w populacjach metalicznych w stosunku do niemetalicznych (**Słomka i in. 2018**). W kolejnych badaniach, nie ustając w poszukiwaniach odpowiedzi na pytanie dlaczego gatunki tej sekcji różnią się między sobą średnią liczbą apertur wykazałam, że jest to związane z wielkością genomu, im większy genom ma dany gatunek, tym większą średnią liczbę apertur wytwarza (**Migdalek i in. 2018**).

**Podsumowując swoje nowe dla badań podstawowych wyniki, uzyskane w ramach osiągnięcia naukowego, stwierdzam, że europejskie bratki gleb metalonośnych (galmanowych i serpentynowych):**

- wywodzą się z *Viola lutea*, gatunku górskiego, a nie nizinnego, *V. tricolor*, jak uważano dotychczas;
- wszystkie, w przeciwieństwie do innych gatunków rodziny Violaceae, nie wykazują strategii akumulacji/hiperakumulacji metali, a ich wykluczania;
- są silnie mikoryzowe, mimo, wysokich stężeń metali w glebie, które nie wpływają negatywnie na grzyby mikoryzowe;

- ponoszą niskie koszty tolerancji wyrażone upośledzeniem przebiegu procesów reprodukcyjnych, odnosząc wysoki sukces reprodukcyjny;
- wykształciły wspólne (bratki serpentynowe) cechy morfologiczno-anatomiczne w budowie kwiatu adaptujące je do warunków wysokogórskich, w tym serpentynowych.

**Nowością jest również wykazanie, że:**

- cechy budowy kwiatu u bratków wykazują nie tylko przydatność w identyfikacji gatunków (znaczenie taksonomiczne), ale również w poszukiwaniach adaptacji do określonych warunków ekologicznych (wysokogórskich, serpentynowych);
- średnia liczba apertur nie ma wartości adaptacyjnej w metalicznych i wysokogórskich populacjach bratków, w przeciwieństwie do wcześniej podawanego wpływu wysokości na średnią liczbę apertur;
- wysoka żywotność pyłku u bratków z terenów metalonośnych, podobnie jak z terenów niemetalicznych, wskazuje na wysoki poziom dostosowania gatunków tej grupy do warunków zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Na podkreślenie zasługuje charakter moich badań, w których łączę ważne wyniki dla nauk podstawowych z ich praktycznym wykorzystaniem. Z jednej strony uzyskane wyniki są kompleksowym opracowaniem biologii metalofitów należących do sekcji *Melanium* rodzaju *Viola* w odniesieniu do ich tolerancji na metale ciężkie. Z drugiej, cechy badanych roślin pozwalają na wskazanie tych gatunków jako potencjalnych kandydatów do wykorzystania w celach rekultywacyjnych europejskich obszarów zdegradowanych przez przemysł wydobywczy i przetwórczy. Dodatkowo, walory estetyczne fiołków, ich wieloletni charakter, predestynują te rośliny do ich wykorzystania do celów fitostabilizacji, bądź szerzej, restytucji przemysłowej (renaturyzacji), prowadzących do ograniczania rozprzestrzeniania metali na dalsze odległości oraz tworzenia trwałej pokrywy roślinnej.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

*Lista publikacji uwzględnia formatowanie (publikacje a, b, c z tego samego roku) publikacji mojego autorstwa tj. spis publikacji w załączniku III (Wykaz opublikowanych prac naukowych).*

1. Beattie A.J. 1974. Floral evolution in *Viola*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61(3): 781-793.
2. Bothe H., **Słomka A.** 2017. Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology* 29: 45-61.
3. Bothe H., Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Likar M., Stepic N., Pelicon P., Vavpetic P., Jeromel L., Regvar M. 2013. Metallophyte status of violets of the section *Melanium*. *Chemosphere* 93: 1844-1855.
4. Brady K.U., Kruckeberg A., Bradshaw jr. H.D. 2005. Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36: 243-266.
5. Clausen J. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. *Annals of Botany* XLI (CLXIV): 677-714.
6. Clausen J. 1931. Cytogenetic and taxonomic investigations in *Melanium* violets. *Hereditas* 15: 219-308.
7. Dajoz I., Gouyon P.H., Till-Bottraud I. 1991. Evolution of pollen morphology. *Science* 253: 66-68.

8. Dajoz I., Till-Bottraud I., Gouyon P.H. 1993. Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution* 47: 1080-1093.
9. Del Val C., Barea J.M., Azcón-Aguilar C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 718-723.
10. Ellenberg H. 2009. *Vegetation Ecology of Central Europe*, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
11. Erben M. 1996. The significance of hybridization on the forming of species in the genus *Viola*. *Bocconeia* 5: 113-118.
12. Fan Q., Chen S., Wang L., Chen Z., Lio W. 2015. A new species and new section of *Viola* (Violaceae) from Guangdong, China. *Phytotaxa* 197: 15-26.
13. Freitas L., Sazima M. 2003. Floral biology and pollination mechanisms in two *Viola* species-from nectar to pollen flowers? *Annals of Botany* 91: 311-317.
14. Gucwa-Przepióra E., Błaszowski J., Kurtyka R. 2013. Arbuscular mycorrhiza of *Deschampsia cespitosa* (Poaceae) at different soil depths in highly metal-contaminated site in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82: 251-258.
15. Havran J.C., Sytsma K.J., Ballard H.E. 2009. Evolutionary relationships, interisland biogeography, and molecular evolution in the Hawaiian violets (*Viola*: Violaceae). *American Journal of Botany* 96: 2087-2099.
16. Hildebrandt U., Hoef-Emden K., Backhausen S., Bothe H., Božek M., **Siuta A.**, Kuta E. 2006. The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Plant Systematics and Evolution* 257(3-4): 205-222.
17. Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* 154: 709-717.
18. Jędrzejczyk M., Rostański A., Małkowski E. 2002. Accumulation of zinc and lead in selected taxa of the genus *Viola* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 44: 49-55.
19. Kazakou E., Dimitrakopoulos P.G., Baker A.J.M., Reeves R.D., Troumbis A.Y. 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: From species to ecosystem level. *Biological Reviews* 83: 495-508.
20. Kuta E., Bohdanowicz J., **Slomka A.**, Pilarska M., Bothe H. 2012. Floral structure and pollen morphology of two zinc violets (*Viola lutea* ssp. *calaminaria* and *V. lutea* ssp. *westfalica*) indicate their taxonomic affinity to *Viola lutea*. *Plant Systematics and Evolution* 298: 445-455.
21. Leuschner Ch., Ellenberg H. 2018. Communities on heavy metal-rich soils. [W:] Leuschner Ch., Ellenberg H. (red.). *Ecology of central European non-forest vegetation: coastal to alpine, natural to man-made habitats. Vegetation ecology of central Europe. Tom II.* Springer, Szwajcaria, pp. 733-764.
22. Marcussen T., Heier L., Brysting A.K., Oxelman B., Jakobsen K.S. 2015. From gene trees to a dated allopolyploid network: Insights from the angiosperm genus *Viola* (Violaceae). *Systematic Biology* 64: 84-101.
23. Marcussen T., Jakobsen K.S., Danihelka J., Ballard H.E., Blaxland K., Brysting A.K., Oxelman B. 2012. Inferring species networks from gene trees in high-polyploid North American and Hawaiian violets (*Viola*, Violaceae). *Systematic Biology* 61: 107-126.
24. Migdałek G., Żabicka J., Kwiatkowska M., **Slomka A.**, Bohdanowicz J., Śliwińska E., Marcussen T., Ballard jr. H., Kuta E. 2018. Is pollen heteromorphism in *Viola* L. correlated with species ploidy? – the current hypothesis re-examined. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 60 suppl. 1: 39.
25. Nakamura K., Denda T., Kokubugata G., Huang Ch., Peng Ch.-I., Yokota M. 2015. Phylogeny and biogeography of the *Viola iwagawae-tashiroi* species complex

- (Violaceae, section *Plagiostigma*) endemic to the Ryukyu Archipelago, Japan. *Plant Systematics and Evolution* 301: 337-351.
26. Nauenburg J.D. 1986. Untersuchungen zur Variabilität, Ökologie und Systematik der *Viola tricolor* – Gruppe in Mitteleuropa. Praca doktorska, Göttingen, Niemcy.
  27. Prasad M.N.V., de Oliveira Freitas H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 285-321.
  28. Przedpeńska-Wąsowicz E.M., Wierzbicka M. 2015. Mechanizm toksycznego działania metali ciężkich. [W:] Wierzbicka M. (red.). Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale. Warszawa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, pp. 52-57.
  29. Schmeil O., Fitschen J. 2010. Flora von Deutschland und angrenzender Länder: Ein Buch zum Bestimmen der wildwachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen. Quelle & Meyer Verlag, Niemcy.
  30. **Siuta A.**, Bożek M., Jędrzejczyk M., Rostański A., Kuta E. 2005. Is the blue zinc violet (*Viola guestphalica* Nauenb.) a taxon of hybrid origin? Evidence from embryology. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47: 237-245.
  31. **Słomka A.**, Bohdanowicz J., Kuta E., Shuka L., Bothe H. 2013. Floral structure and pollen morphology are important characters in taxonomy of the genus *Viola* (Violaceae). *Modern Phytomorphology* 4: 37.
  32. **Słomka A.**, Bohdanowicz J., Poznańska E., Kwiatkowska M., Pilarska M., Struebig M., Shuka L., Kuta E. 2014b. Usefulness and limitations of pollen characters in environmental studies based on *Viola* L. species (sect. *Melanium* Ging.). *Modern Phytomorphology* 5: 31-34.
  33. **Słomka-A.**, Godzik B., Szarek-Łukaszewska G., Shuka L., Hoef-Emden K., Bothe H. 2015. Albanian violets of the section *Melanium*, their morphological variability, genetic similarity and their adaptations to serpentine or chalk soils. *Journal of Plant Physiology* 174: 110-123.
  34. **Słomka A.**, Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., Karcz J., Kawalec P., Kuta E. 2012a. Heavy metals in soil affect reproductive processes more than morphological characters in *Viola tricolor*. *Environmental and Experimental Botany* 75: 204-211.
  35. **Słomka A.**, Kuta E. 2015. Fiołek trójbarwny – *Viola tricolor*. [W:] Wierzbicka M. (red.). Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, pp. 392-410.
  36. **Słomka A.**, Kuta E., Szarek-Łukaszewska G., Godzik B., Kapusta P., Tylko G., Bothe H. 2011a. Violets of the section *Melanium*, their colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and their occurrence on heavy metal heaps. *Journal of Plant Physiology* 168: 1191-1199.
  37. **Słomka A.**, Kwiatkowska M., Bohdanowicz J., Shuka L., Jędrzejczyk-Korycińska M., Borucki W., Kuta E. 2017a. Insight into “serpentine syndrome” of Albanian, endemic violets (*Viola* L., *Melanium* Ging. section) – Looking for unique, adaptive microstructural floral, and embryological characters. *Plant Biosystems* 151: 1022-1034.
  38. **Słomka-A.**, Żabicka J., Shuka L., Bohdanowicz J., Kuta E. 2018. Lack of correlation between pollen aperture number and environmental factors in pansies (*Viola* L., sect. *Melanium* Ging.) – pollen heteromorphism re-examined. *Plant Biology* 20: 555-562.
  39. Stevanović V., Tan K., Gregoris I. 2003. Distribution of the endemic Balkan flora on serpentine I. - Obligate serpentine endemics. *Plant Systematics and Evolution* 242: 149-170.
  40. Till-Bottraud I., Vincent M., Dajoz I., Mignot A. 1999. Pollen aperture heteromorphism. Variation in pollen-type proportions along altitudinal transects in *Viola calcarata*. *Comptes Rendus de l’des Sciences* 322: 579-589.

41. Wang B., Qiu Y.-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

**Pogrubiona czcionka z podkreśleniem** wyróżniłam publikacje mojego autorstwa wchodzące w skład osiągnięcia naukowego; **pogrubioną czcionką** wyróżniłam pozostałe publikacje mojego autorstwa.

### I. WPROWADZENIE

Jako absolwentka V Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie, klasy o profilu matematycznym pod patronatem Uniwersytetu Jagiellońskiego, z Uniwersytetem jestem związana już od czasów swojej edukacji na poziomie szkoły średniej. Uczestniczyłam w lekcjach matematyki (Geometrii oraz Analizy Matematycznej) prowadzonych przez pracowników naukowo-dydaktycznych z ówczesnego Wydziału Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego (obecnie Wydział Matematyki i Informatyki UJ), brałam udział w seminariach naukowych. Jestem również współautorką dwóch publikacji z zakresu geometrii euklidesowej (**Pawłowska i Siuta 1999a,b**). W trakcie trwania studiów biologicznych, interesowały mnie problemy związane z ewolucją roślin, szczególnie procesy mikroewolucyjne i specjacja zachodzące pod wpływem ekstremalnych warunków środowiskowych. Zagadnieniami dotyczącymi wpływu metali ciężkich na rośliny zaczęłam się zajmować już w czasie III roku studiów i kontynuowałam badania z tego zakresu w czasie przygotowywania pracy magisterskiej, rozpoczynając współpracę z prof. dr hab. Elżbietą Kutą z Zakładu Cytologii i Embriologii Roślin UJ, która była promotorem mojej pracy magisterskiej, następnie doktorskiej. Nasza współpraca jest kontynuowana do chwili obecnej. Pierwsze dwa artykuły naukowe z tego zakresu (obejmujące m.in. wyniki mojej pracy magisterskiej) dotyczyły analizy przebiegu procesów reprodukcyjnych *Viola lutea* subsp. *westfalica*, endemicznego gatunku gleb metalonośnych w Niemczech, które wskazały, że przyczyną zaburzeń i degeneracji w zalążkach i pylnikach jest, nie podejrzewany, wpływ metali ciężkich, a genetyczne nieustabilizowanie tego taksonu (**Siuta i in. 2005, Hildebrandt i in. 2006**).

Mój dorobek publikacyjny **nie stanowiący podstawy do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego** z okresu studiów doktoranckich oraz z czasu zatrudnienia na stanowisku asystenta naukowego, naukowo-dydaktycznego oraz adiunkta (do chwili obecnej) obejmuje wiele zagadnień, w tym duża część dotyczy rodzaju *Viola* L.

### II. VIOLA L. JAKO MODEL DO BADAŃ PODSTAWOWYCH I APLIKACYJNYCH

#### 1) Procesy mikroewolucyjne na glebach metalonośnych – adaptacja fizjologiczna, zróżnicowanie morfologiczno-anatomiczne, kariologiczne, genetyczne, reprodukcja

##### a) *Viola tricolor* L.

Jednym z dominujących gatunków roślin na glebach metalonośnych Polski, oprócz *Arabidopsis halleri*, *Dianthus carthusianorum*, *Armeria maritima*, *Silene vulgaris* subsp. *humilis*, jest fiołek trójbarwny (*Viola tricolor*). Na wiosnę łądy metalonośne (Zn/Pb) pokryte są roślinami o żółtych i żółto-niebieskich kwiatach (populacje M). Gatunek ten jest również dosyć pospolity w całej Polsce, rośnie na glebach piaszczystych, kwaśnych, ubogich w wapń i azot (populacje NM). Stanowił on zatem bardzo dobry obiekt do badania adaptacji, tolerancji, procesów mikroewolucyjnych na podstawie różnic między roślinami z terenów M i NM. Wyniki badań w ramach pracy

doktorskiej oraz projektu promotorskiego MNiSW, zostały zebrane w pięciu oryginalnych artykułach opublikowanych w międzynarodowych czasopismach z listy A MNiSW (Słomka i in. 2008, 2010, 2011b, 2011c, 2012a), w jednej oryginalnej pracy z listy B (Słomka i in. 2014a), trzech artykułach o charakterze przeglądowym spoza listy MNiSW (Słomka i Kuta 2011, 2015; Kuta i Słomka 2013). Do najważniejszych wyników z tego zakresu badań zaliczam wykazanie:

- braku stresu oksydacyjnego mierzonego poziomem zawartości nadtlenu wodoru oraz wzmożonej aktywacji systemu antyoksydacyjnego mierzonej aktywnością katalazy, peroksydaz, dysmutazy ponadtlenkowej u roślin z kilku populacji M, co świadczy o wysokiej tolerancji tego gatunku na metale ciężkie (Słomka i in. 2008).
- braku wpływu zanieczyszczonego środowiska metalami ciężkimi na morfologię roślin. Osobniki z populacji NM nie różniły się od roślin z populacji M, co wykazano na podstawie pomiarów wielu cech ocenialnych i mierzalnych poddanych analizie korespondencji. Podobnie, nie stwierdzono różnic międzypopulacyjnych w cechach mikrostrukturalnych liści i ogonka liściowego analizując w SEM (ang. *Scanning Electron Microscope*) I-rzędową strukturę, czyli ułożenie i kształt komórek (Słomka i in. 2012a).
- wpływu zanieczyszczonego środowiska metalami ciężkimi na zróżnicowanie genetyczne i kariologiczne (odmienne rozmieszczenie loci 5SrDNA i 25SrDNA, kariotypy, frekwencja aneuploidalnych i poliploidalnych komórek) przy braku tego wpływu na wielkość genomu (2C DNA). Populacje M różniły się pod względem genetycznym oraz kariologicznym od populacji NM. Markery molekularne ISSR rozdzieliły populacje M od NM, co uprawniało do wydzielenia populacji M jako ekotypy gleb metalonośnych (Słomka i in. 2011b,c, 2014a).
- upośledzenia przebiegu procesów reprodukcyjnych u roślin z populacji M w fazie przed zapłodnieniem, czyli na etapie rozwoju gametofitu żeńskiego i męskiego (zaburzenia w przebiegu mejozy, obniżenie żywotności pyłku), a także degeneracje w zalążkach, w zakresie maksymalnie kilkunastu procent więcej, w stosunku do wartości uzyskanych dla roślin z terenów NM, co jednak nie prowadziło do występowania istotnych różnic między populacjami w żywotności zarodków i kiełkowaniu nasion (faza pozapłodnieniowa) (Słomka i in. 2010, 2012a).

**b) Fiołki leśne (*Viola reichenbachiana* Jordan ex Bor., *V. riviniana* Rchb.)**

Na zalesionych terenach metalonośnych (Zn/Pb/Fe) Polski południowej występują osobniki o cechach morfologicznie pośrednich między *Viola riviniana* (fiołek rivina) i *V. reichenbachiana* (fiołek leśny), co wskazywało na ich mieszańcowe pochodzenie i/lub na zmienność fenotypową opisywaną u roślin na obszarach o podwyższonych stężeniach metali ciężkich w glebie (Migdalek i in. 2013b). Indeks mieszańcowy (Anderson 1949) ustalony na podstawie cech budowy kwiatów chasmogamicznych (otwartych, samo- i obcopylnych w przeciwieństwie do klejstogamicznych, wyłącznie samopylnych, tworzonych na tych samych roślinach w różnych okresach ich kwitnienia) wykazał dużo większe podobieństwo kwiatów hipotetycznych mieszańców do *V. riviniana* niż do *V. reichenbachiana*. Takie okazy rozmnażały się płciowo bez zakłóceń, zarówno w linii męskiej jak i żeńskiej; mikrosporogeneza, rozwój pyłku, megasporogeneza, megagametofitogeneza oraz rozwój zarodka i bielma przebiegały prawidłowo (Migdalek i in. 2013a,b). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki oraz fakt, że hybrydyzacja jest częstym zjawiskiem w rodzaju *Viola* postawiliśmy hipotezę, że są to introgresywne formy (mieszaniec F<sub>1</sub> krzyżuje się wstecznie z jednym z gatunków rodzicielskich) w kierunku *V. riviniana*. W celu weryfikacji tej hipotezy prowadziliśmy badania w ramach projektu MNiSW w latach 2009-2012, we współpracy z pracownikami Katedry Botaniki i Ochrony Przyrody Uniwersytetu Śląskiego (prof. dr

hab. Adam Rostański, dr Monika Jędrzejczyk-Korycińska), którego byłąm głównym wykonawcą. Wyniki oparte o analizę cech morfologicznych (liści, łodygi i kwiatu), wielkość genomu oraz zróżnicowania genetycznego na podstawie markerów AFLP wykazały, że rośliny z terenów metalonośnych reprezentują ustabilizowane formy introgresywne powstałe na drodze jednokierunkowych krzyżowań w kierunku *V. riviniana* (Kuta i in. 2014).

## 2) Wpływ metali ciężkich na komórki w kulturach zawieszinowych

Kultury zawieszinowe komórek od niedawna służą do badań wpływu metali ciężkich na organizmy roślinne. W kilku przypadkach roślin tolerancyjnych na metale (np. *Prosopis laevigata*, *Thlaspi caerulescens*), stwierdzono, że reakcje komórek roślinnych na metale ciężkie są podobne jak roślin, z których została wyprowadzona zawieszina komórkowa (Sychta i in. 2018b i cyt. tam lit.). W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Klaudii Sychty, której jestem promotorem pomocniczym oraz we współpracy z pracownikami Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, realizujemy badania nad wpływem Zn i Pb aplikowanych do płynnej pożywki na komórki zawiesziny wyprowadzonej z kalusa kilku gatunków fiołków, metalofita obligatoryjnego (*V. lutea* subsp. *westfalica*, populacja M), fakultatywnego (*V. tricolor*, populacje M i NM), przygodnego (bardzo rzadko występującego na glebach metalonośnych, *V. arvensis*, populacja NM) oraz niemetalofita (*V. uliginosa*, populacja NM). Ważnym osiągnięciem w tych badaniach było opracowanie metodyki aplikowania do pożywki soli metali, szczególnie ołowiu. W przypadku azotanu ołowiu (II) dodawanego do pożywki, w której znajdują się aniony siarczanowe, fosforanowe, chlorkowe i in. następuje jej zmętnienie obniżające: (1) ilość dochodzącego do komórek światła oraz (2) pH nawet o ponad 2 jednostki (w przypadku najwyższej stosowanej dawki 2000  $\mu\text{M}$ ) i w takich warunkach nie obserwuje się żadnego wpływu tego pierwiastka na żywotność komórek. Problem ten nie był wcześniej podnoszony przez żadnego badacza. Aby wyniki były wiarygodne należy przed dodaniem komórek do pożywki zawierającej metale, dostosować ilość dochodzącego światła zaciemniając kolby z pożywką względem zaciemnienia przy najwyższym zastosowanym stężeniu oraz dostosować pH do wartości 5,7-5,8. Przy tak prowadzonym doświadczeniu, żywotność komórek spada proporcjonalnie do zastosowanego stężenia  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  i czasu traktowania ołowiem (Sychta i in. 2017). Jest to ważne odkrycie, świadczące o tym, że wpływ warunków hodowli komórek na ich żywotność może być, równie a nawet bardziej, znaczący aniżeli sama dawka ołowiu oraz czas traktowania tym pierwiastkiem.

Wpływ cynku na żywotność komórek u metalofitów i niemetalofitów w rodzaju *Viola* jest nieco mniejszy niż wpływ ołowiu (podawanego we właściwych warunkach oświetlenia oraz pH), bowiem w przypadku trzech gatunków/genotypów, żywotność po 72 godz. traktowania 2000  $\mu\text{M}$  Zn wynosiła 70-85%, dwóch 20-50%, podczas gdy w przypadku ołowiu spadała u trzech gatunków/genotypów do 10-20%, u dwóch do 70-80%. W żadnym z przypadków, mimo tak wysokiej dawki cynku i ołowiu, żywotność komórek, mierzona testem AlamarBlue nie spadała poniżej 10%. Ołów w żywych komórkach akumulowany był przede wszystkim w wakuoli i w ścianie komórkowej, oba pierwiastki w zdecydowanie większych ilościach stwierdzane były w komórkach aniżeli w pożywce (współczynniki bioakumulacji dla Zn i Pb znacznie powyżej 1) (Sychta i in. 2018a). Jest to o tyle zaskakujące, że w naturze badane gatunki/genotypy *Viola* przejawiają strategię wykluczania metali, tzn. gromadzą je przede wszystkim w korzeniach w ilościach mniejszych niż ich stężenia w glebie (Słomka i in. 2011a). Zdolności hiperakumulacyjne komórek fiołków, mogą świadczyć o silnie rozwiniętych wrodzonych mechanizmach detoksyfikacyjnych w tym rodzaju i wymagają dalszych badań.



### 3) Zróżnicowanie genetyczne i udział hybrydyzacji w kompleksie *Viola reichenbachiana-V. riviniana*

Na terenach M Polski południowej, wykazaliśmy występowanie form introgresywnych w kierunku *Viola riviniana*, co popierało ogólnie przyjętą tezę, że obydwa gatunki są blisko spokrewnione i łatwo krzyżują się w naturze (Migdalek i in. 2013a,b). Szerzej zakrojone badania zróżnicowania genetycznego, z wykorzystaniem markerów AFLP, wielu europejskich populacji przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej, obecnie już dra. Grzegorza Migdałka (Uniwersytet Pedagogiczny, Kraków), której byłam promotorem pomocniczym, nie wykazały powszechnego występowania mieszańców, nawet w populacjach sympatrycznych (obydwa gatunki rodzicielskie występują na jednym obszarze). Współczynniki pokrewieństwa nie wskazywały współczesnego przepływu genów między tymi gatunkami. Gatunek *V. riviniana* wykazywał większe zróżnicowanie międzypopulacyjne niż *V. reichenbachiana*, a występowanie wspólnego haplotypu między obydwooma gatunkami, ustalonego na podstawie sekwencjonowania zmiennego regionu chloroplastowego *trnH-psbA*, potwierdziło hipotezę o powstaniu *V. riviniana* z udziałem *V. reichenbachiana* oraz innego, nieznanego gatunku (Migdalek i in. 2017). Praca ta ma duże naukowe znaczenie, bowiem podważa powszechnie cytowane w literaturze przykłady tych gatunków jako łatwo krzyżujących się ze względu na słabe mechanizmy izolacyjne. Zostało wykazane, że ich krzyżowanie się w szerokim zasięgu, nie jest istotnym zjawiskiem prowadzącym do różnicowania się tego kompleksu (Migdalek i in. 2017).

### 4) Pozycja taksonomiczna, zróżnicowanie genetyczne zagrożonego w Polsce gatunku *Viola uliginosa* Besser

Rzadki gatunek, *Viola uliginosa* (fiołek bagienny), w literaturze, był włączony do monotypowej podsekcji *Repentes* w obrębie sekcji *Viola*. Nasze badania oparte o analizę taksonomicznie ważnych cech kwiatów chasmo- i klejstogamicznych, genealogię wielu genów (*ang. Multigene Multispecies Coalescent Analysis*), a dokładnie siedmiu jądrowych loci (geny o niskiej liczbie powtórzeń oraz ITS), dokonały rewolucji w taksonomii włączając *V. uliginosa* do podsekcji *Rostratae*. Nowym odkryciem było również stwierdzenie u tego gatunku występowania tzw. równoczesnej klejstogamii (samopłodne kwiaty klejstogamiczne produkowane są równocześnie – w tym samym czasie – na tym samym osobniku obok kwiatów chasmogamicznych), rzadkiego typu klejstogamii w rodzaju *Viola*. Wcześniej gatunek ten był opisywany we florach jako nie rozwijający kwiatów klejstogamicznych (Małobęcki i in. 2016). Badania te były prowadzone we współpracy międzynarodowej z dr. Thomasem Marcussenem z University of Oslo (Norwegia), niekwestionowanym ekspertem od filogenezy rodzaju *Viola* (Marcussen i in. 2015).

Według najnowszych danych *V. uliginosa* jest gatunkiem zagrożonym (EN) w Polsce na skutek zanikania wilgotnych siedlisk na jakich występuje (Kaźmierczakowa i in. 2016). Podjęte we współpracy z pracownikami Instytutu Botaniki PAN w Krakowie (dr Wojciech Paul) badania kilku populacji z Polski południowej, gdzie gatunek ten jeszcze występuje, miały na celu zdefiniowanie poziomu zróżnicowania genetycznego wewnątrz- i międzypopulacyjnego w aspekcie przewidywania przetrwania tego gatunku. Wykazano bardzo niski ( $H_T = 0,048$ ) poziom zróżnicowania na podstawie profilów prążkowych AFLP, na co niewątpliwie ma wpływ wegetatywny (rozłogi) sposób rozmnażania oraz samopylność (kwiaty klejstogamiczne). Taki system rozmnażania sprawia, że genetyczne zróżnicowanie międzypopulacyjne jest dużo wyższe niż wewnątrzpopulacyjne ( $G_{ST} = 0,583$  vs  $H_S = 0,020$ , odpowiednio). Bardzo ważnym wnioskiem płynącym z tych badań

jest zwrócenie szczególnej uwagi na lokalne populacje tj. np. *locus classicus* w Rzęsco koło Krakowa, gdzie niewielka liczba osobników wykazuje ekstremalnie niskie różnicowanie genów ( $H_j = 0,009$ ) (Paul i in. 2016).

## 5) Kultury *in vitro* jako technika *ex situ* ochrony rzadkich i zagrożonych wyginięciem gatunków

### a) *Viola uliginosa* Besser

We florze Polski kilka gatunków *Viola* jest zagrożonych wyginięciem (Każmierczakowa i in. 2016). Poza ustaleniem pozycji taksonomicznej oraz zbadaniem różnicowania genetycznego polskich populacji *V. uliginosa*, w celu ochrony gatunkowej *ex situ* gatunku prowadziliśmy działania mające na celu namnożenie roślin w warunkach kultur *in vitro* z fragmentów blaszek liściowych oraz ogonków liściowych. Wysoką (nawet 87%, w zależności od pożywki i użytego eksplantatu) wydajność regeneracji uzyskaliśmy na pożywce MS (Murashige i Skoog 1962) z dodatkiem regulatora wzrostu TDZ (tidiazuron) oraz kombinacji kinetyny i syntetycznej auksyny 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) na drodze regeneracji bezpośredniej (wzrost wierzchołków wprost na eksplantacie) i pośredniej (wzrost wierzchołków z kalusa rozwijającego się na eksplantacie) (Slazak i in. 2015a). Wiele roślin zostało ukorzenionych i zaaklimatyzowanych do warunków polowych i do tej pory jest hodowanych na poletku doświadczalnym, gdzie kwitną, zawiązują owoce i wydają nasiona.

Niewątpliwym sukcesem jest opracowanie wydajnego protokołu mikropropagacji i uzyskanie roślin, które w większości wykazywały podobieństwo genetyczne do roślin wyjściowych i miały taką samą wielkość genomu (2C DNA), co świadczyło o tym, że warunki kultury nie doprowadziły do zwielokrotnienia genomu lub aneuploidalności. Takie rośliny mogą być wprowadzane do hodowli w stacjach badawczych, do ogrodów botanicznych, a także za zgodą regionalnych dyrekcji ochrony przyrody do miejsc ich naturalnego występowania. Badania te mają zatem ważny aspekt aplikacyjny (Slazak i in. 2015a).

### b) *Viola stagnina* Kit.

*Viola stagnina* jest podobnie jak *V. uliginosa* gatunkiem zagrożonym wyginięciem we florze Polski. Wartością badań nad tym gatunkiem, jest nie tylko opracowanie pierwszego dla gatunku, powtarzalnego protokołu mikropropagacji na drodze bezpośredniej i pośredniej organogenezy z fragmentów liści i ogonków liściowych na pożywce MS wzbogaconej TDZ i aklimatyzacji zregenerowanych roślin, ale szczegółowa analiza genetyczna zregenerowanych roślin. Wyniki różnicowania genetycznego i wielkości genomu regeneratów w odniesieniu do roślin wyjściowych i różnicowania genetycznego gatunku w naturalnych populacjach, pozwoliło na podjęcie ryzykownej dyskusji czy zmienność somaklonalna indukowana przez warunki kultury *in vitro* może odgrywać pozytywną rolę w praktykach ochronnych *ex situ* gatunków zagrożonych wyginięciem? Wykazaliśmy, że jeżeli różnicowanie genetyczne zregenerowanych roślin wchodzi w zakres zmienności naturalnych populacji, to jest to korzystniejsze aniżeli wprowadzanie do natury somaklonów (Żabicki i in. 2019).

## 6) Cyklotydy jako system obronny roślin przed czynnikami biotycznymi oraz ich produkcja w warunkach kultur *in vitro*

Cyklotydy są kolistymi polipeptydami zbudowanymi z 27-37 aminokwasów połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi, opisanymi u roślin należących do kilku rodzin Angiospermae, w tym u przedstawicieli rodziny fiołkowatych (Violaceae). Na świecie prowadzone są przede wszystkim badania na ludzkich liniach komórkowych wykazujące przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, hemolityczne, uterotoniczne działanie

cyklotydów. Ich rola ochronna u roślin została udokumentowana przez wykazanie negatywnego działania cyklotydów na nicienie, ślimaki, owady, bakterie, wirusy. Biologiczne mechanizmy działania tych polipeptydów pozostają jednak niewyjaśnione (Słazak i in. 2018 i cyt. tam lit.). W swoich wieloletnich badaniach prowadzonych we współpracy z Instytutem Botaniki PAN (dr Błażej Ślazak) oraz z prof. Ulfem Göranssonem z Uniwersytetu w Uppsali (Szwecja), na przykładzie *V. odorata*, skoncentrowaliśmy się na zlokalizowaniu w roślinie (organach, tkankach, komórkach) cyklotydów, zbadaniu *ex vitro* ich potencjału cytotoksycznego przeciwko patogenom grzybowym oraz grzybom wyizolowanym z roślin, ich hamującemu działaniu przeciwko bakteriom. Jak stwierdziliśmy, analizując komórki w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, cyklotydy działają na zasadzie niszczenia błony komórkowej grzyba i nie są degradowane przez grzyba nawet po kilku dniach od ich zastosowania. Cyklotydy z grupy bracelet (cykloviolacyny) miały silniejsze działanie przeciwgrzybowe niż te z grupy Möbius. Wykorzystując wcześniej wyprodukowane przeciwciała przeciwko tym niskocząsteczkowym białkom z grupy bracelet (Słazak i in. 2016) wykazaliśmy preferencyjne ich gromadzenie się w epidermie liści, ogonków liściowych, szypulek, w ryzodermie, wiązkach przewodzących, protodermie i prokambium zarodków, ścianie zalążni i zewnętrznych osłonkach zalążków, co wskazuje na ich ochronną rolę przed atakami mikroorganizmów oraz roślinożerców (Słazak i in. 2018).

Chemiczna synteza cyklotydów jest mało wydajna i nieoptymalna. Wciąż najbardziej efektywnymi pozostają metody produkcji biologicznej. Wzór ekspresji cyklotydów może być regulowany na poziomie ekspresji genów oraz transkrypcji i translacji tych białek poprzez zastosowanie egzogennych regulatorów wzrostu w warunkach *in vitro* (Słazak i in. 2015b), jak również, co wykazaliśmy, w naszych badaniach poprzez zmianę stopnia ploidalności roślin, indukowaną warunkami kultury. Produkcja cyklotydów była znacząco większa u uzyskanych roślin autopoliploidalnych niż u roślin wyjściowych (diploidalnych) (Słazak i in. 2015a).

Nasze prace nad cyklotydami w aspekcie ich roli jako jednego z czynników systemu obronnego roślin, prowadzone na poziomie mikroskopii elektronowej, konfokalnej, w kulturach *in vitro* są nowatorskie i mają duże znaczenie nie tylko dla wiedzy podstawowej, ale również znaczenie aplikacyjne, bowiem kultury *in vitro* gatunków produkujących cyklotydy mogą być w przyszłości wykorzystane do masowej produkcji tych związków.

### 7) Uzyskanie nowych odmian roślin ozdobnych

Angażując się w projekty o charakterze rolniczym, mające na celu uzyskanie nowych odmian roślin ozdobnych, podjęłam współpracę z ośrodkiem w Chinach (Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang) w wyniku której, opracowaliśmy metodę uzyskiwania na drodze krzyżowania linii wsobnych międzygatunkowych mieszańców *Viola cornuta* oraz *V. × wittrockiana* nowych odmian ujawniających pozytywny efekt heterozji w zakresie wielkości kwiatów (11% – 66%), negatywny w zakresie wysokości roślin (-12% – -57%), obie cechy pożądane w hodowli bratków uprawnych. Stabilność mieszańców wyrażona wysoką frekwencją zawiązywania nasion i siłą ich kiełkowania, stosunkowo stałymi liczbami chromosomów oscylującymi u większości okazów nieznacznie wokół liczby stanowiących średnią arytmetyczną z liczb chromosomów rodziców ( $2n = 37$ ) pozwoli w przyszłości, po przeprowadzeniu analizy efektów fenotypowych w różnych warunkach i wielu powtórzeniach, na masową produkcję tych ozdobnych roślin (Du i in. 2018).

### III. BADANIA NAD GATUNKAMI Z INNYCH RODZAJÓW NIŻ RODZAJ *VIOLA* L.

#### 1) Systemy rozmnażania się roślin uprawnych

##### a) *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.

Ustalenie przyczyn sterility roślin ważnych ekonomicznie jest niezwykle poważnym problemem, bowiem można wskazać możliwości przełamania tej sterility lub ustalić genetyczne jej przyczyny, których pokonać się nie da. *Miscanthus* × *giganteus* (miskant olbrzymi) jest triploidalną rośliną ozdobną, wyprowadzoną jako mieszańiec między *M. sinensis* i *M. sacchariflorus*, rozmnażającą się jedynie wegetatywnie. Badając przyczyny braku zawiązywania nasion, w ramach projektu COST w latach 2011-2013, jako główny wykonawca, stwierdziłam występowanie zaburzeń rozwojowych w linii męskiej i żeńskiej. Tylko niespełna 10% zalążków wykazywało prawidłowy rozwój, przy nieco wyższej frekwencji normalnego, żywotnego pyłku (14-55%, w zależności od zastosowanego testu żywotności pyłku). Ustaliliśmy, że przyczyną sterility są bariery postzygotyczne, ponieważ nie obserwowaliśmy zarodków ani bielma w zalążkach, chociaż okazy tej wiatropylnej rośliny były hodowane na zewnątrz w warunkach umożliwiających zapylenie krzyżowe. Triploidalność (niestabilność cytologiczna) oraz występowania postzygotycznych barier rozwojowych leżą u podstaw zaburzeń przebiegu procesów reprodukcyjnych miskanta olbrzymiego (Słomka i in. 2012b).

Moje badania stały się podstawą do wnioskowania o przyczynach niepowodzenia regeneracji roślin w warunkach kultur *in vitro* na drodze androgenezy. Nie udało się zregenerować haploidalnych roślin z mikrospor. Mikrospory po trzech dniach kultury podejmowały rozwój, który jednak ustawał około trzeciego tygodnia, co spowodowane było niestabilnością cytologiczną wykładanych na pożywkę mikrospor (Żur i in. 2013).

##### b) *Fagopyrum esculentum* Moench

Badania nad niską wydajnością produkcji owoców gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum*), rośliny ważnej z ekonomicznego punktu widzenia, ze względu na wysoką światową konsumpcję owoców (zwanymi powszechnie nasionami) w formie kaszy, prowadziłam w ramach projektu MRiRW w latach 2014-2017, we współpracy z Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie (prof. dr hab. Agnieszka Płażek), obecnie projekt jest kontynuowany jako projekt NCN na lata 2018-2021. Dotychczasowe wyniki wykazały po raz pierwszy fakt występowania zaburzonego stosunku typu kwiatów ze słupkiem długo-szyjkowym (Pin) do krótko-szyjkowym (Thrum) (1:2,7 - 1:19, w zależności od odmiany) u tej heterostylicznej rośliny (samoniezdgodność heteromorficzna) (Słomka i in. 2017b). Tak poważne zaburzenie proporcji kwiatów w populacjach badanych dwóch odmian i dwóch linii hodowlanych nie wpływa na zawiązywanie nasion i męski sukces reprodukcyjny, jedynie ma wpływ na ograniczone dostarczanie pyłku do kwiatów krótko-szyjkowych. Przyczyną niskiego zawiązywania nasion (9,8-33,1%, w zależności od genotypu) jest obniżenie sukcesu reprodukcyjnego w linii żeńskiej obserwowane jako degeneracje zalążków oraz aborcje dojrzałych gametofitów żeńskich, prazarodków i zarodków (Słomka i in. 2017b). Biorąc pod uwagę fakt, że gryka jest rośliną samoniekończącą się (kwitnie i owocuje cały czas), prawdopodobną przyczyną obniżonej płodności jest wyczerpywanie się asymilatów oraz zaburzenia gospodarki hormonalnej. W celu potwierdzenia tej hipotezy, w ramach aktualnie realizowanego projektu NCN na lata 2018-2021, podjęte zostały badania wpływu substancji odżywczych i roślinnych regulatorów wzrostu na rozwój zalążków w warunkach kultur *in vitro*.

#### 2) Identyfikacja mieszańców międzygatunkowych

##### a) rodzaj *Gladiolus* L.

Udział hybrydyzacji w powstawianiu nowych gatunków jest jednym z mechanizmów powstawania różnorodności w wielu rodzajach. Mieczyki (*Gladiolus* sp.) są roślinami ozdobnymi. Krajowe gatunki znajdują się na liście zagrożonych roślin w Polsce (Kaźmierczkova i in. 2016). Postępujące wymieranie związane jest przede wszystkim z zanikaniem siedlisk. Nowe siedliska (mikronisze) mogą być zasiedlane przez taksony o charakterze mieszańcowym, które dzięki rozmnażaniu wegetatywnemu wspomaganemu rozmnażaniem płciowym mogą utrzymywać się w przyrodzie, co wykazałam w pracy **Szczepaniak i in. (2016)**, powstałej we współpracy z pracownikami Instytutu Botaniki PAN w Krakowie (dr hab. Elżbieta Cieślak, dr hab. Magdalena Szczepaniak). Na podstawie cech morfologicznych, zróżnicowania genetycznego (markery jądrowe - ITS, AFLP oraz markery chloroplastowe - *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*) oraz cech związanych z rozmnażaniem płciowym, udowodniliśmy, że *Gladiolus imbricatus* i *G. palustris* krzyżują się jednokierunkowo (*G. palustris* jako rośliny mateczne) w miejscach naturalnego występowania, powstają osobniki F<sub>1</sub> o cechach fenotypowych pośrednich między rodzicami lub bardziej podobnych do *G. imbricatus*. Addytywne dziedziczenie występuje również w przypadku markerów AFLP. Uzyskane wyniki pozwoliły na opisanie nowego gatunku mieszańcowego *G. × sulistrovicus* Kamiński, Szczepaniak et Cieślak, nothosp. nova (**Szczepaniak i in. 2016**).

#### **b) rodzaj *Solidago* L.**

Mieszańce mogą być zagrożeniem dla gatunków rodzicielskich, jeżeli wykazują lepsze dostosowanie do zaburzonych siedlisk, mogą też być zagrożeniem dla rodzimej flory, jeżeli powstają ze skrzyżowania obcych inwazyjnych gatunków z gatunkami rodzimymi i są bardziej ekspansywne niż gatunki wyjściowe. W Polsce występują co najmniej cztery gatunki nawłoci (*Solidago* sp.) uważane za gatunki inwazyjne, w tym *Solidago candensis*, który to krzyżuje się z rodzimym *S. virgaurea*, tworząc mieszańce F<sub>1</sub>.

Nasze badania nad płodnością tego mieszańca, wykazały znaczny procent obniżenia żywotności pyłku, do 65% w porównaniu z ponad 90% u gatunków rodzicielskich oraz bardzo niską (6%) produkcję nasion w porównaniu z ~90% u gatunków rodzicielskich. Zarówno średnica ziaren pyłku jak i długość owoców (niełupki) miały u mieszańca pośredni charakter w stosunku do *S. canadensis* i *S. virgaurea*. Mimo niskiego udziału rozmnażania płciowego, które jednak rekompensowane jest ekspansywną propagacją przez kłącza (rozmnażanie wegetatywne), mieszańiec rozprzestrzenia się w Polsce i może stać się w przyszłości również gatunkiem inwazyjnym (**Migdalek i in. 2014**).

### **3) Wpływ egzogennie stosowanych fitohormonów na łagodzenie skutków stresu metali ciężkich**

Różne fitohormony roślinne tj. etylen, auksyny, brassinosteroidy, kwas abscysynowy, kwas salicylowy, na drodze reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych regulują działanie systemu antyoksydacyjnego u roślin. Mechanizmy regulacji są jednak wciąż słabo poznane. W dalszej perspektywie, ich rozpracowanie może pozwolić na stosowanie fitohormonów w celu zwiększenia antyoksydacyjnego potencjału stresowanych metalami ciężkimi roślin. Z naszych badań wynika, że mechanizmy obronne na toksyczne działanie miedzi u kukurydzy (*Zea mays* L.), ważnej ekonomicznie rośliny, występują wyłącznie w korzeniu. Poprzez zmiany właściwości chemicznych ścian komórkowych roślina jest chroniona przed negatywnym wpływem Cu, aczkolwiek prowadzi to również do ograniczenia pobierania makro- i mikroelementów niezbędnych do jej normalnego wzrostu w takich warunkach. Wykazaliśmy również pozytywny wpływ kwasu salicylowego na obniżanie zawartości metalu w korzeniu oraz jego wpływ na niektóre enzymy systemu antyoksydacyjnego, jakkolwiek nie można wykluczyć również, że działa on bezpośrednio jako „wymiatacz” wolnych rodników (**Moravcová i in. 2018**).

#### IV. BIBLIOGRAFIA

Lista publikacji uwzględnia formatowanie (publikacje a, b, c z tego samego roku) publikacji mojego autorstwa tj. spis publikacji w załączniku III (Wykaz opublikowanych prac naukowych).

1. Anderson E. 1949. Introgressive Hybridization. Wiley, New York.
2. Du X., Wang M., **Słomka A.**, Liu H. 2018. Karyological and heterosis studies of the artificial inter- and intraspecific hybrids of *Viola × wittrockiana* and *V. cornuta*, *HortScience* 53(9): 1300-1305.
3. Hildebrandt U., Hoef-Emden K., Backhausen S., Bothe H., Bożek M., **Siuta A.**, Kuta E. 2006. The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Plant Systematics and Evolution* 257(3-4): 205-222.
4. Kaźmierczakowa R., Bloch-Orłowska J., Celka Z., Cwener A., Dajdok Z., Michalska-Hejduk D., Pawlikowski P., Szczeńsiak E., Ziarnek K. 2016. Polska czerwona lista paprotników i roślin kwiatowych. Polska Akademia Nauk, Instytut Botaniki im. W. Szafera, Instytut Ochrony Przyrody, Kraków.
5. Kuta E., Jędrzejczyk-Korycińska M., Cieślak E., Rostański A., Szczepaniak M., Migdałek G., Wąsowicz P., Suda J., Combik M., **Słomka A.** 2014. Morphological versus genetic diversity of *Viola reichenbachiana* and *V. riviniana* (sect. *Viola*, Violaceae) from soils differing in heavy metal content. *Plant Biology* 16(5): 924-934.
6. Kuta E., **Słomka A.** 2013. O inteligencji roślin. *Alma Mater* 158: 64-66.
7. Małobęcki A., Marcussen T., Bohdanowicz J., Migdałek G., **Słomka A.**, Kuta E. 2016. Cleistogamy and phylogenetic position of *Viola uliginosa* (Violaceae) re-examined. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 180-194.
8. Marcussen T., Heier L., Brysting A.K., Oxelman B., Jakobsen K.S. 2015. From gene trees to a dated allopolyploid network: insights from the angiosperm genus *Viola* (Violaceae). *Systematic Biology* 64: 84-101.
9. Migdałek G., Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., **Słomka A.**, Kuta E. 2013b. Usefulness of morphological characters in determination of intra-and interspecific diversity of violets (*Viola* L., Violaceae). *Modern Phytomorphology* 4: 35-36.
10. Migdałek G., Kolczyk J., Pliszko A., Kościńska-Pająk M., **Słomka A.** 2014. Reduced pollen viability and achene development in *Solidago × niedereideri* Khek from Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 83(3): 252-255.
11. Migdałek G., Nowak J., Saługa M., Cieślak E., Szczepaniak M., Ronikier M., Marcussen T., **Słomka A.**, Kuta E. 2017. No evidence of contemporary interploidy gene flow between the closely related European woodland violets *Viola reichenbachiana* and *V. riviniana* (sect. *Viola*, Violaceae). *Plant Biology* 19(4): 542-551.
12. Migdałek G., Woźniak M., **Słomka A.**, Godzik B., Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., Bothe H., Kuta E. 2013a. Morphological differences between violets growing at heavy metal polluted and non-polluted sites. *Flora* 208(2): 87-96.
13. Moravcová Š., Tůma J., Kovalíková Dučaiová Z., Waligórski P., Kula M., Saja D., **Słomka A.**, Bąba W., Libik-Konieczny M. 2018. Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 122: 19-30.
14. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
15. Paul W., Cieślak E., Ronikier M., Migdałek G., **Słomka A.**, Żabicka J. 2016. Low genetic diversity of declining *Viola uliginosa* (Violaceae) at its southern range limits in Poland. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 58(2): 71-82.

16. Pawłowska E., **Siuta A.** 1999a. Twierdzenie cosinusów i jego zastosowanie w zadaniach. W: *Koktajl matematyczny, czyli uczniowie piszą matematykę*. Wydawnictwo Szkolne Omega, Kraków, pp. 197-201.
17. Pawłowska E., **Siuta A.** 1999b. Wzory na pole trójkąta i ich zastosowanie. W: *Koktajl matematyczny, czyli uczniowie piszą matematykę*. Wydawnictwo Szkolne Omega, Kraków, pp. 203-209.
18. **Siuta A.**, Bożek M., Jędrzejczyk M., Rostański A., Kuta E. 2005. Is the blue zinc violet (*Viola guestphalica* Nauenb.) a taxon of hybrid origin? Evidence from embryology. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(1): 237-245.
19. Slazak B., Sliwińska E., Saługa M., Ronikier M., Bujak J., **Słomka A.**, Göransson U., Kuta E. 2015a. Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 179-190.
20. Slazak B., Jacobsson E., Kuta E., Göransson U. 2015b. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in *Viola uliginosa* (Violaceae). *Phytochemistry* 117: 527-536.
21. Slazak B., Kapusta M., Malik S., Bohdanowicz J., Kuta E., Malec P., Göransson U. 2016. Immunolocalization of cyclotides in plant cells, tissues and organ supports their role in host defense. *Planta* 244: 1029-1040.
22. Slazak B., Kapusta M., Strömstedt A., **Słomka A.**, Krychowiak M, Shariatgorji M., Andren P., Bohdanowicz J., Kuta E., Göransson U. 2018. How does the sweet violet (*Viola odorata* L.) fight pathogens and pests – cyclotides as a comprehensive plant host defense system. *Frontiers in Plant Science* 9: ID1296.
23. **Słomka A.**, Kuta E. 2011. Fiołek trójbarwny (*Viola tricolor*) na terenach metalonośnych Polski południowej. Centrum Kultury im. Marii Płońskiej w Bolesławiu, Bolesław, pp. 50-54.
24. **Słomka A.**, Kuta E. 2015. Fiołek trójbarwny – *Viola tricolor*. W: Wierzbička M (red.). Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, pp. 392-410.
25. **Słomka A.**, Libik-Konieczny M., Kuta E., Miszański Z. 2008. Metalliferous and non-metalliferous populations of *Viola tricolor* represent similar mode of antioxidative response. *Journal of Plant Physiology* 165: 1610-1619.
26. **Słomka A.**, Kawalec P., Kellner K., Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., Kuta E. 2010. Was reduced pollen viability in *Viola tricolor* L. the result of heavy metal pollution or rather the test applied? *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 52: 123-127.
27. **Słomka A.**, Kuta E., Szarek-Łukaszewska G., Godzik B., Kapusta P., Tylko G., Bothe H. 2011a. Violets of the section Melanium, their colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and their occurrence on heavy metal heaps. *Journal of Plant Physiology* 168: 1191-1199.
28. **Słomka A.**, Siwińska D., Wolny E., Kellner K., Kuta E. 2011b. Influence of a heavy-metal-polluted environment on *Viola tricolor* L. genome size and chromosome number. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 53(1): 7-15.
29. **Słomka A.**, Sutkowska A., Szczepaniak M., Malec P., Mitka J., Kuta E. 2011c. Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. (Violaceae) in metal-polluted environments. *Chemosphere* 83: 435-442.
30. **Słomka A.**, Jędrzejczyk-Korycińska M., Rostański A., Karcz J., Kawalec P., Kuta E. 2012a. Heavy metals in soil affect reproductive processes more than morphological characters in *Viola tricolor*. *Environmental and Experimental Botany* 75: 204-211.

31. **Słomka A.**, Kuta E., Płazek A., Dubert F., Żur I., Dubas E., Kopeć P., Żurek G. 2012b. Sterility of *Miscanthus × giganteus* results from hybrid incompatibility. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 54(1): 1-8.
32. **Słomka A.**, Wolny E., Kuta E. 2014a. *Viola tricolor* (Violaceae) is a karyologically unstable species. *Plant Biosystems* 148(4): 602-608.
33. **Słomka A.**, Bohdanowicz J., Poznańska E., Kwiatkowska M., Pilarska M., Struebig M., Shuka L., Kuta E. 2014b. Usefulness and limitations of pollen characters in environmental studies based on *Viola* L. species (sect. *Melanium* Ging.). *Modern Phytomorphology* 5: 31-34.
34. **Słomka A.**, Michno K., Dubert F., Dziurka M., Kopeć P., Płazek A. 2017b. Embryological background of low seed set in distylous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with biased morph ratios, and biostimulant-induced improvement of it. *Crop & Pasture Science* 68: 680-690.
35. Sychta K., **Słomka A.**, Kuta E. 2018a. Kultury zawiesinowe komórek jako model do badania tolerancji roślin na metale ciężkie. *Kosmos* 67(2): 335-346.
36. Sychta K., **Słomka A.**, Suski Sz., Fiedor E., Gregoraszczyk E., Kuta E. 2018b. Suspended cells of metallicolous and nonmetallicolous *Viola* species tolerate, accumulate and detoxify zinc and lead. *Plant Physiology and Biochemistry* 132: 666-674.
37. Sychta K., Szklarzewicz J., **Słomka A.**, Gregoraszczyk E., Kuta E. 2017. Critical factors besides treatment dose and duration need to be controlled in Pb toxicity tests in plant cell suspension cultures. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86(3): ID3555.
38. Szczepaniak M., Kamiński R., Kuta E., **Słomka A.**, Heise W., Cieślak E. 2016. Natural hybridization between *Gladiolus palustris* and *G. imbricatus* inferred from morphological, molecular and reproductive evidence. *Preslia* 88: 137-161.
39. Żabicki P., Sliwiska E., Mitka J., Sutkowska A., Tuleja M., Migdałek G., Żabicka J., **Słomka A.**, Kwiatkowska M., Kuta E. 2019. Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species?: comprehensive genetic studies of in vitro propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit. (Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136(2): 339-352.
40. Żur I., Dubas E., **Słomka A.**, Dubert F., Kuta E., Płazek A. 2013. Failure of androgenesis in *Miscanthus×giganteus* in vitro culture of cytologically unbalanced microspores. *Plant Reproduction* 26: 297-307.

**V. Podsumowanie efektów działalności naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i współpracy międzynarodowej w formie skróconej. Szczegółowe omówienie w załącznikach: III (wykaz opublikowanych prac naukowych) i IV (informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).**

**a) Działalność naukowa**

i. zestawienie publikacji naukowych

	Typ publikacji	Liczba publikacji		
		Przed uzyskaniem stopnia doktora (1)	Po uzyskaniu stopnia doktora (2)	Łącznie (1)+(2)
1.	Oryginalne artykuły naukowe z listy <i>Thomson Reuters Master Journal List</i> a) lista A MNiSW	3	27	30



	b) lista B MNiSW	0	2	2
2.	Oryginalne artykuły naukowe spoza listy <i>Thomson Reuters Master Journal List</i>	0	3	3
3.	Rozdziały w monografiach/podręcznikach akademickich	2	1	3
5.	Publikacje popularno-naukowe	0	2	2
	<b>Razem</b>	<b>5</b>	<b>35</b>	<b>40</b>

- ii. sumaryczny impact factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania; **60,479**
- iii. liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS); **280** (15.03.2019)
- iv. indeks Hirscha opublikowanych publikacji według bazy Web of Science (WoS); **11** (15.03.2019)
- v. kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi lub udział w takich projektach; **kierowanie: dwa projekty krajowe, wykonawca: pięć projektów krajowych i jeden międzynarodowy.**
- vi. międzynarodowe lub krajowe nagrody za działalność naukową: **dwie nagrody JM Rektora jednostki macierzystej, jedno stypendium Rektora jednostki macierzystej, jedno stypendium Fundacji Nauki Polskiej.**
- vii. wygłoszenie referatów na międzynarodowych lub krajowych konferencjach tematycznych; **konferencje krajowe: osiem, międzynarodowe: cztery (w tym jeden wykład zaproszony).**

**b) Działalność dydaktyczna, popularyzatorska oraz współpraca międzynarodowa**

- i. uczestnictwo w programach europejskich i innych programach międzynarodowych lub krajowych; **dwa programy, w tym jeden międzynarodowy Fundacji Fulbrighta.**
- ii. udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych lub udział w komitetach organizacyjnych tych konferencji;  
Udział w konferencjach (poza wygłoszonymi referatami wskazanymi w a)vii):
  - wyniki prezentowane przez współautorów w formie plakatu lub wystąpienia ustnego: **w sumie 46 konferencji międzynarodowych i krajowych.**
  - wyniki prezentowane osobiście w formie plakatu: **w sumie 14 konferencji międzynarodowych i krajowych.**Organizacje konferencji:
  - **cztery konferencje**, w tym jedna jako sekretarz oraz jedna jako członek Rady Naukowej
- iii. członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych; **cztery krajowe, trzy międzynarodowe członkostwa, w tym dwa jako sekretarz organizacji krajowych.**
- iv. osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki; **prowadzenie i organizowanie zajęć dydaktycznych** (wykłady, ćwiczenia, konwersatoria, zajęcia laboratoryjno-konwersatoryjne), **nauczanie pozauniwersyteckie** (etat nauczyciela w Liceach Ogólnokształcących, udział w programie edukacyjnym, prowadzenie zajęć podczas Festiwalów Święto Ogrodów, Noc Biologów i in.), **recenzowanie prac magisterskich i licencjackich, opieka naukowa nad licencjatami i magistrantami.**
- v. opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego; **promotor pomocniczy w przewodach doktorskich trzech osób, w tym jeden przewód zakończony.**

- vi. staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich; **trzydzieści staży krajowych, cztery staże w ośrodkach naukowych w Niemczech i Albanii.**
- vii. recenzowanie projektów międzynarodowych lub krajowych oraz publikacji w czasopiśmie międzynarodowych i krajowych; **piętnaście recenzji publikacji w czasopiśmie międzynarodowych.**

Kraków, 22.03.2019

