



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

Sławomir Samardakiewicz

Poznań, 2016

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61829 56 48
sas@amu.edu.pl

www.biologia.amu.edu.pl

I IMIĘ I NAZWISKO

Sławomir Samardakiewicz

II POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Tytuł zawodowy technika laboranta w zakresie chemii analitycznej, Policealne Studium przy Technikum Chemicznym w Poznaniu, 1988r.

Tytuł zawodowy magistra w zakresie biologii eksperymentalnej:

Praca magisterska pt. „Pobieranie ołowiu przez *Lemna minor* L.” wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Adama Woźnego w Zakładzie Botaniki Ogólnej Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, 1993r.

Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – biologia komórki:

Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza;

Praca doktorska pt.: „Strukturalne i funkcjonalne efekty oddziaływania ołowiu na korzenie” wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Adama Woźnego w Zakładzie Botaniki Ogólnej, 2000r.

Praca została wyróżniona.

III PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ

1. 1993-1994 słuchacz Studium Doktoranckiego, Wydział Biologii UAM
2. 1994-2000 asystent w Zakładzie Botaniki Ogólnej, Wydział Biologii UAM
3. 2000-2004 adiunkt w Zakładzie Botaniki Ogólnej, Wydział Biologii UAM
4. od 2004 - adiunkt, kierownik Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Wydział Biologii UAM

IV OSIĄGNIĘCIE WYNIKAJĄCE Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 ROKU O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Efekty oddziaływania wybranych stresorów na strukturę komórek różnych gatunków roślin

B) Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

1. **Samardakiewicz S.**, Krzeszowiec-Jeleń W., Bednarski W., Jankowski A., Suski S., Gabryś H., Woźny A. (2015) Pb-induced avoidance-like chloroplast movements in fronds of *Lemna trisulca* L. *PLOS ONE* 10(2): (1-34); e0116757; doi:10.1371/journal.pone.0116757 (IF 3,234; 40 pkt MNiSW)
2. **Samardakiewicz S.**, Krzesłowska M., Woźny A. (2009) Tubulin cytoskeleton in plant cell response to trace metals. In: Maksymiec W. (ed.) *Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False. Transworld Research Network*, Trivandrum, India, 149-162. (7 pkt MNiSW)
3. **Samardakiewicz S.**, Krzesłowska M., Bilski H., Bartosiewicz R., Woźny A. (2012) Is callose a barrier for lead ions entering *Lemna minor* L. root cells? *Protoplasma*, 249: 347-351. (IF 2,885; 20 pkt MNiSW)
4. Formeła M., **Samardakiewicz S.**, Marczak Ł., Nowak W., Narożna D., Bednarski W., Kasprowicz-Maluśki A., Morkunas I. (2014) Effects of endogenous signals and *Fusarium oxysporum* on the mechanism regulating genistein synthesis and accumulation in yellow lupine and their impact on plant cell cytoskeleton. *Molecules* 19(9): 13392-13421. (IF: 3,050; 35 pkt MNiSW)

C) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Na osiągnięcie naukowe składają się wyniki zawarte w czterech oryginalnych publikacjach naukowych: trzech opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (2012, 2014 i 2015) oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w wydawnictwie o zasięgu międzynarodowym *Transworld Research Network* (2009).

Omówienie osiągnięcia naukowego

Rośliny są nieustannie poddawane działaniu wielu różnorodnych czynników biotycznych i abiotycznych o charakterze bodźcowym. Część z nich odgrywa rolę pozytywną w rozwoju, funkcjonowaniu i strukturze roślin, część jednak wywołuje - bądź potencjalnie może wywoływać - zmiany niekorzystne, stając się tym samym czynnikami stresowymi. Rośliny dysponują jednak ogromnym bogactwem mechanizmów (wrodzonych lub nabytych), które umożliwiają im unikanie lub dostosowanie się do niekorzystnych warunków.

Od początku działalności naukowej pasjonowała mnie przede wszystkim struktura komórek roślinnych, zwłaszcza w kontekście oddziaływania na nie czynników stresowych. W swoich badaniach koncentrowałem się na strukturalnych aspektach reakcji roślin, ponieważ informacje z tego zakresu są jednym z podstawowych źródeł naszej wiedzy o symptomach i mechanizmach działania czynników stresowych oraz odpowiedziach roślin na te czynniki.

Celem naukowym wymienionych powyżej prac było określenie modyfikacji strukturalnych komórek wybranych gatunków roślin w odpowiedzi na działanie czynników stresowych o różnym charakterze. W swoich badaniach chciałem uzyskać odpowiedź przede wszystkim na pytanie, czy istnieją, a jeśli tak, to w jakim stopniu, podobieństwa w reakcjach komórek w odpowiedzi na różnorodne stresory.

Spośród analizowanych stresorów abiotycznych szczególnie interesowały mnie światło i ołów. Światło jest niezbędne roślinom jako źródło energii, czynnik sygnałowy, do aktywacji niektórych genów i wielu innych procesów. Zbyt wysoka lub zbyt niska jego dawka może jednak prowadzić, i często prowadzi, do niekorzystnych zmian w strukturze i funkcjonowaniu komórek roślinnych. Zmiany te mogą być efektem bezpośredniego oddziaływania światła na aparat fotosyntetyczny, bądź jego wpływu pośredniego, np. poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego. Z kolei nawet przy występowaniu

optymalnych warunków świetlnych obserwowano zakłócenia w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego spowodowane np. zbyt niską lub wysoką temperaturą (Kaiser i wsp. 2015). Z drugiej strony określone warunki świetlne mogą modyfikować, wzmacniać lub ograniczać, wpływ działania innych czynników stresowych np. toksycznego efektu metali śladowych, w tym ołowiu lub czynników biotycznych, np. patogenów grzybowych (Bechtold i wsp. 2005, Romanowska i wsp. 2006). W razie nagłego i krótkotrwałego stresu świetlnego rośliny wykorzystują mechanizmy adaptacyjne, które polegają na szybkich odpowiedziach fizjologicznych np. ruchach liści oraz kierunkowych reakcjach chloroplastów. Z kolei w stopniowo zmieniających się warunkach świetlnych reakcje obronne roślin mają charakter aklimatyzacji. Przykładem mogą być np. wywoływane przez światło reakcje wzrostowe roślin, zmiany anatomiczne liści oraz składu i struktury błon tylakoidów (Ruban 2009, Calzavara i wsp. 2015).

Pierwsza publikacja (**Praca 1. Samardakiewicz i wsp. 2015**) wchodząca w skład osiągnięcia naukowego nawiązuje do jednego z mechanizmów adaptacji komórek roślinnych do zmiennych warunków świetlnych, a mianowicie kierunkowych reakcji chloroplastów. Wykazano, że przy niskim natężeniu światła, chloroplasty gromadzą się przy ścianach prostopadłych (antyklinalnych) do kierunku jego padania przyjmując tzw. pozycję płaską określaną inaczej jako reakcja akumulacji. Z kolei silne światło powoduje ich przemieszczenie się pod ściany równoległe do kierunku jego padania (tzw. reakcja ucieczki) w wyniku czego chloroplasty przyjmują tzw. pozycję profilową. Uważa się, że dzięki temu pozycja płaska zapewnia chloroplastom maksymalizację ilości absorbowanej energii, natomiast pozycja profilowa jej minimalizację (**Praca 1.** i cytowana tam literatura).

Głównym celem **Pracy 1.** była odpowiedź na pytania, **czy powyższe reakcje chloroplastów na stres świetlny mogą ulec modyfikacjom w obecności innego stresora np. chemicznego i czy ten stresor może również wywołać reakcje kierunkowe chloroplastów.** W tym celu zastosowano jony ołowiu (Pb^{2+}). Dotychczas bowiem nie wykazano, aby ołów pełnił funkcje metaboliczne w komórkach roślinnych. Wiadomo natomiast, że metal ten jest toksyczny dla komórek roślinnych nawet w niewielkim stężeniu (Pourrut i wsp. 2011). Jednym z ważniejszych efektów oddziaływania ołowiu na rośliny jest ograniczenie ich aktywności fotosyntetycznej (Legocka i wsp. 2015). Stopień tych oddziaływań w dużej mierze zależy od warunków świetlnych, w jakich rosną rośliny. Na przykład *Pisum sativum* L. rosnący w warunkach słabego oświetlenia był bardziej wrażliwy na ołów niż rosnący w obecności światła o wysokim natężeniu, ponieważ miał

niższą zdolność do utylizacji nadmiaru zaabsorbowanej energii świetlnej (Romanowska i wsp. 2006). Nie wiadomo natomiast, czy może to być związane z modyfikacjami rozmieszczenia chloroplastów w komórce i wynikających z tego różnic w ich ekspozycji na światło.

W celu określenia wpływu ołowiu na rozmieszczenie chloroplastów (**Praca 1.**) przeprowadziłem badania ilościowe i jakościowe ich lokalizacji w komórkach mezofilu *Lemna trisulca* L. (rzęsy trójrowkowej, ang. *star duckweed*) rosnącej w różnych warunkach świetlnych. *L. trisulca* jest wodną rośliną kwiatową, wykorzystywaną jako model w badaniach dotyczących ruchów chloroplastów w komórkach roślinnych. Na podstawie obrazów przestrzennych uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego w komórkach mezofilu wyznaczony został odsetek chloroplastów znajdujących się w położeniu profilowym i płaskim. Dane te stanowiły podstawę do określenia w jakim stopniu reakcje chloroplastów na ołów są zbliżone do reakcji ucieczki, akumulacji lub położenia ciemnościowego. Z kolei pomiary fotometryczne, poprzez analizę amplitudy zmian położenia chloroplastów i prędkości ich przemieszczania, posłużyły do oceny wpływu ołowiu na dynamikę ruchów chloroplastów. W tych doświadczeniach wykorzystano fotometr dwuwiązkowy (Walczak i Gabryś 1980), za pomocą którego mierzono transmitancję światła pomiarowego przechodzącego przez frondy *L. trisulca*. Zmiany transmitancji zachodzące w trakcie naświetlania roślin światłem indukującym ruchy chloroplastów odzwierciedlały zmiany w rozmieszczeniu chloroplastów.

Wyniki zamieszczone w **Pracy 1.** wskazują, że zjawisko ruchów chloroplastów należy uwzględnić w badaniach wpływu ołowiu na aparat fotosyntetyczny roślin. Na przykładzie *L. trisulca*, **po raz pierwszy wykazałem** bowiem, że **jony ołowiu powodują istotne statystycznie zmiany w rozmieszczeniu chloroplastów w komórkach mezofilu.** Zmiany te polegały przede wszystkim na zwiększonym gromadzeniu się chloroplastów przy ścianach antyklinalnych (w pozycji profilowej). Zjawisko miało miejsce zarówno w warunkach niskiego natężenia światła jak i w ciemności. Jednocześnie obserwowałem spadek liczby chloroplastów znajdujących się w położeniu płaskim przy ścianach peryklinalnych. Jedynie w świetle białym o wysokim natężeniu, czyli w warunkach, w których pozycja profilowa jest typowym położeniem chloroplastów, nie występowały różnice między roślinami kontrolnymi i traktowanymi ołowiem.

W przeprowadzonych badaniach szczególnie interesująca była dla mnie zmiana położenia chloroplastów *L. trisulca* pod wpływem ołowiu stwierdzana w ciemności. W ciemności chloroplasty roślin kontrolnych przemieszczały się losowo do wszystkich

ścian przyjmując zarówno pozycje płaskie, jak i profilowe (tzw. położenie ciemnościowe). W obecności ołowiu natomiast, mimo braku światła, ułożenie chloroplastów bardziej niż położenie ciemnościowe przypominało ich położenie wywoływane reakcją ucieczki, jakie obserwowano w warunkach wysokiego natężenia światła. Zatem powstaje pytanie, jakie znaczenie dla funkcjonowania rośliny może mieć taka zmiana położenia chloroplastów w ciemności? **W obecności ołowiu ułożenie chloroplastów w ciemności, podobne do ich ułożenia przy wysokim natężeniu światła powoduje, że mają one dłuższą drogę do uzyskania optymalnej pozycji w reakcji akumulacji w razie pojawienia się słabego światła. Z drugiej strony, ułożenie takie może stanowić strategię obronną rośliny na wypadek nagłego pojawienia się wysokiego natężenia światła po okresie ciemności. Wówczas większość chloroplastów jest już bowiem rozmieszczona w bezpiecznej pozycji profilowej.**

Kolejna kwestia dotyczy kierunkowości reakcji chloroplastów na ołów. W przypadku ucieczki chloroplastów przy silnym oświetleniu, reakcja ta ma charakter kierunkowy, ponieważ chloroplasty przemieszczają się w kierunku przeciwnym do miejsc najsilniejszego oświetlenia (Zurzycki 1980). Nasuwa się więc pytanie, czy reakcja chloroplastów na ołów u *L. trisulca* miała również charakter reakcji kierunkowej, czyli „ucieczki” chloroplastów z miejsc występowania tego czynnika stresowego? W celu odpowiedzi na to pytanie przeprowadziłem porównanie zawartości ołowiu w rejonach gromadzenia się chloroplastów oraz w miejscach, gdzie nie stwierdzano obecności tych organelli. Na podstawie badań z użyciem mikroanalizy rentgenowskiej w mikroskopie elektronowym (EDS) nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi rejonami. **Położenie chloroplastów w obecności ołowiu przypominało wprawdzie wynik reakcji ucieczki na wysokie natężenie światła, jednak reakcja ta nie miała charakteru reakcji kierunkowej związanej z miejscami występowania tego pierwiastka w komórkach *L. trisulca*.** Zatem odpowiedź chloroplastów na obecność ołowiu należałoby nazywać jedynie reakcją podobną do reakcji ucieczki (z ang. *avoidance-like response*). Dotychczas reakcję podobną do reakcji na światło o wysokim natężeniu, zaobserwowano również w odpowiedzi chloroplastów na działanie stresu mechanicznego (Sato i wsp. 1999) i niskiej temperatury (Sato i wsp. 2003, Kodama i wsp. 2008, Ogasawara i wsp. 2013).

Postawiono pytanie, czy podobna odpowiedź chloroplastów na różne czynniki stresowe (silne światło, jony ołowiu – **Praca 1.**) może wynikać z wspólnego/ych mechanizmu/ów ich oddziaływania na rośliny np. poprzez takie same składniki łańcucha

transdukcji sygnałów oraz aparatu motorycznego? Jak dotąd w przypadku kierunkowych ruchów chloroplastów najlepiej poznano mechanizm odbioru sygnału i motorykę tego zjawiska. Kwestia przekazu sygnału nadal pozostaje jednak niewyjaśniona (Higa i Wada 2015). Wśród potencjalnych przekaźników sygnałów wymienia się m.in. jony wapnia (Tlałka i Gabryś 1993, Tlałka i Fricker 1999), enzymy szlaku fosfatydyloinozytolu (Grabalska i Malec 2004, Aggarwal i wsp. 2013), węglowodany (Banaś i wsp. 2007), a także nadtlenek wodoru (H_2O_2) (Wen i wsp. 2008).

Moją uwagę, w kontekście poszukiwań wspólnych mechanizmów reakcji ruchowych chloroplastów na stresory, wzbudził przede wszystkim H_2O_2 . Wiadomo bowiem, że wzmożone generowanie ROS (ang. *Reactive Oxygen Species* = reaktywne formy tlenu), w tym H_2O_2 , jest powszechną reakcją komórek roślinnych na różne czynniki stresowe. W przypadku H_2O_2 takimi czynnikami są m.in. silne światło (Goh i wsp. 2009, Oelze i wsp. 2012, Wang i wsp. 2013, Wituszyńska i Karpiński 2013), metale śladowe, w tym ołów (Przymusiński i wsp. 2007, Sytar i wsp. 2013), czynniki biotyczne, np. patogeny grzybowe (Morkunas i Gmerek 2007) oraz mszyce (Mai i wsp. 2013). Niekontrolowany wzrost zawartości ROS może prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu i strukturze komórek, a nawet do ich śmierci (Sytar i wsp. 2013). Z drugiej strony ROS stanowią ważny element w reakcjach obronnych komórek na działanie stresorów. Przykładem może być generowanie w obecności patogenów grzybowych nadtlenu wodoru, który bierze udział w rearanżacji ściany komórkowej, a tym samym w ograniczaniu ekspansji patogenu w komórkach gospodarza (Hardham i wsp. 2007, O'Brien i wsp. 2012). ROS mogą również pełnić funkcję cząsteczek sygnałowych w odpowiedzi na różne stresory (Hung i wsp. 2005). Przypuszcza się, że w reakcji ucieczki chloroplastów przy silnym oświetleniu rolę cząsteczki sygnałowej odgrywa m.in. H_2O_2 . Wykazano bowiem, że u *A. thaliana* generowanie H_2O_2 jest największe pod wpływem silnego światła niebieskiego (Wen i wsp. 2008, Wang i wsp. 2013), indukującego jednocześnie reakcje ucieczki chloroplastów (Zurzycki 1962, Han i wsp. 2013). Stwierdzono również, że egzogenne podawany H_2O_2 przyspieszał przemieszczanie się chloroplastów, a z kolei egzogenne wymiatacze H_2O_2 blokowały reakcję ich ucieczki (Wen i wsp. 2008). Powyższe wyniki mogą więc sugerować, że w reakcję ucieczki chloroplastów jest zaangażowany H_2O_2 . Za słusnością takiego wniosku przemawiają także wyniki doświadczeń z wykorzystaniem makrofitu *L. trisulca* przedstawione w **Pracy 1**. Wykazałem, że w frondach rośliny tego gatunku, traktowanych jonami ołowiu w ciemności, czyli w warunkach, w których indukowałem reakcję ucieczki chloroplastów, wzrastała również zawartość H_2O_2 . Ponadto stwierdziłem

podobieństwo pomiędzy reakcjami chloroplastów na podawane egzogennie - ołów lub H_2O_2 . W obu przypadkach odnotowałem znaczący wzrost liczby chloroplastów w ciemności w pozycji profilowej. Ponadto dostarczana egzogennie katalaza (zmiatacz H_2O_2) znosiła efekt wywołany przez Pb^{2+} . W warunkach kontrolnych natomiast egzogenna katalaza powodowała w ciemności znaczący wzrost liczby chloroplastów w pozycji płaskiej. Powyższe wyniki potwierdziły moje przypuszczenie, że **H_2O_2 jest zaangażowany w specyficzną reakcję ucieczki chloroplastów indukowaną ołowiem**. Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują na nową rolę H_2O_2 jako przekaźnika sygnału w reakcjach roślin na ołów.

Zmiany położenia chloroplastów wywołane przez jony ołowiu mogą być związane z przekształceniami w strukturze cytoszkieletu aktynowego pełniącego rolę motoryczną ruchów chloroplastów u roślin okrytozależkowych. Świadczyć o tym może zahamowanie ruchów pod wpływem inhibitorów cytoszkieletu aktynowego i miozyny oraz wyniki prac nad mutantami (Malec i wsp. 1996, Krzeszowiec i Gabryś 2007). Dotychczas w literaturze brak informacji o oddziaływaniu ołowiu na cytoszkielet aktynowy w kontekście ruchów kierunkowych chloroplastów.

Na przykładzie badań komórek *L. trisulca* **po raz pierwszy wykazałem (Praca 1.)**, że **ołów powoduje zaburzenia w strukturze cytoszkieletu aktynowego**. Przejawiały się one w postaci fragmentacji mikrofilamentów, a w niektórych przypadkach lokalnym lub nawet całkowitym zanikiem mikrofilamentów przylegających do chloroplastów. Dodatkowo pojawiały się punktowe skupiska aktyny zdepolimeryzowanej, często zlokalizowane przy jednym z biegunów chloroplastów. Niezwykle interesujące jest to, że powyższych zmian nie obserwowano w aktynowym cytoszkielecie kortykalnym, nie sąsiadującym z chloroplastami. Tak więc zmiany dotyczyły jedynie tej części cytoszkieletu aktynowego, która jest bezpośrednio zaangażowana w zjawiska ruchowe chloroplastów. Wykazałem także (Praca 1.), że przekształcenia strukturalne w cytoszkielecie aktynowym mogą być przyczyną nie tylko zmian położenia chloroplastów, ale także tempa ich przemieszczania się. Badania fotometryczne potwierdziły, że obecność ołowiu powodowała zmniejszenie amplitudy i prędkości reakcji ruchowych chloroplastów, zwłaszcza reakcji ucieczki. Spowolnienie ruchów chloroplastów przez Pb^{2+} powoduje, że w przypadku pojawienia się światła o wysokim natężeniu chloroplasty pozostają dłużej narażone na jego działanie destrukcyjne. Tym samym znacząco może wzrastać stopień fotouszkodzeń w chloroplastach.

Analizowałem oddziaływanie ołowiu na ruchy chloroplastów jedynie w odniesieniu do cytoszkieletu aktynowego (**Praca 1.**). Dotychczas bowiem u większości gatunków roślin, w tym u *L. trisulca*, wykazano bezpośredni jego udział w ruchach chloroplastów, a tylko w komórkach mchów stwierdzono, że za kierunkowe ruchy chloroplastów jest odpowiedzialny także cytoszkielet tubulinowy.

Wiadomo jednak, że między cytoszkieletem aktynowym a tubulinowym występują interakcje. Stwierdzono m.in., że światło powoduje zmiany w organizacji nie tylko cytoszkieletu aktynowego, ale także tubulinowego, i że zmiany te były ze sobą skorelowane (Sampathkumar i wsp. 2013). W związku z tym nie można wykluczyć, że obserwowane zmiany w przemieszczaniu się chloroplastów w obecności ołowiu mogą mieć związek również ze zmianami w strukturze cytoszkieletu tubulinowego. Stąd w kręgu moich zainteresowań badawczych są także skutki działania stresorów, w tym metali śladowych, na strukturę cytoszkieletu tubulinowego. Zagadnienia te zostały przedstawione w pracy przeglądowej pt.: „**Tubulin cytoskeleton in plant cell response to trace metals**” (**Praca 2. Samardakiewicz i wsp. 2009**). Na podstawie danych literaturowych pokazałem, że metale śladowe mogą wpływać na mikrotubule występujące praktycznie w wszystkich formacjach - od mikrotubul korykalnych (cMt) począwszy, a na mikrotubulach wrzeciona cytokinetycznego kończąc. Efekt metali śladowych wiąże się z zaburzeniami struktury i funkcji układów mikrotubul, co z kolei rzutuje m.in. na proces tworzenia ścian komórkowych, podziały komórkowe oraz ruchy organelli. Obraz tych zaburzeń jest bardzo złożony, zależy bowiem nie tylko od zastosowanego metalu, ale także od innych czynników egzo- i endogennych. Stąd taki sam metal śladowy w zależności od warunków, może powodować polimeryzację lub depolimeryzację cytoszkieletu tubulinowego. W pracy tej przeprowadziłem również dyskusję dotyczącą zaburzeń jego struktury. Niektóre zaburzenia powodują zmiany niekorzystne, a inne są przejawem przystosowania do niekorzystnych warunków. Wydaje się, że szczególnie zaburzenia mikrotubul komórek dzielących się powodują konsekwencje negatywne, ponieważ prowadzą do zakłóceń podziałów. Ich efektem było pojawianie się mikrojąder i nieprawidłowo wykształconych ścian komórkowych (wyniki własne zostały przedstawione w tej pracy na przykładzie badań nad wpływem ołowiu na komórki *L. minor*). Powyższe zaburzenia uniemożliwiają dalszy prawidłowy rozwój roślin. W odniesieniu do mikrotubul korykalnych charakter wywołanych zmian wydaje się mniej jednoznaczny. Wiadomo na przykład, że metale śladowe powodują zaburzenia w cytoszkielecie korykalnym co pociąga za sobą spadek syntezy celulozy i zmiany w układzie mikrofibrylli celulozowych. To z kolei jest

najprawdopodobniej jedną z przyczyn hamowania wzrostu elongacyjnego komórek i wzrostu korzeni. Obniżenie syntezy celulozy – zmiana niekorzystna, może jednak indukować syntezę kalozy (Teraoka i wsp. 2002), co z kolei zwiększa zdolność obrony komórek przed czynnikiem stresowym. Kaloza bowiem pełni często funkcje bariery mechanicznej utrudniającej, a niekiedy uniemożliwiającej, wnikanie do komórek niektórych czynników stresowych. Powszechnie znany jest współdziałanie kalozy w tworzeniu brodawek (papilli). Powstają one na wewnętrznej (docytoplazmatycznej) stronie ściany komórkowej i pełnią rolę przeszkody strukturalnej chroniącej komórkę przed wnikaniem strzępek grzybów patogennych (Luna i wsp. 2011). Podobną rolę dla kalozy postuluje się także w reakcjach obronnych komórek roślin lądowych na ołów (Krzyszowska 2011). Wobec powyższego powstaje pytanie, czy kaloza pełni taką rolę również w komórkach rośliny wodnej?

Już we wcześniejszej pracy, na podstawie obserwacji morfologicznych ujawniłem indukcję syntezy kalozy w merystemie wierzchołkowym korzenia *L. minor* roślin traktowanych ołowiem (Samardakiewicz i wsp. 1996). Jednak w kolejnej pracy (Samardakiewicz i Woźny 2000) dotyczącej lokalizacji ołowiu w komórkach merystemu wierzchołkowego *L. minor* wykazałem obecność tego metalu w protoplastach. Wynik ten wzbudził wątpliwości, czy rzeczywiście kaloza pełni funkcje obronne u tego gatunku rośliny. Odpowiedź na powyższe pytanie wymagała sprawdzenia na poziomie subkomórkowym wzajemnych relacji pomiędzy lokalizacją **kalozy** i **ołowiu**. Zatem w **Pracy 3.** (Samardakiewicz i wsp. 2012), dzięki nowatorskiemu podejściu metodycznemu (zastosowałem metodę mikroanalizy rentgenowskiej (EDS) do równoczesnej detekcji ołowiu oraz złota, które było wyznacznikiem kalozy po reakcji immunocytochemicznej), określiłem kolokalizację tych składników na poziomie subkomórkowym i sprawdziłem w jakim stopniu kaloza może tworzyć skuteczną barierę. W ścianie komórek korzenia *L. minor* traktowanych ołowiem obserwowano charakterystyczne zgrubienia, a także nie w pełni wykształcone ściany (**Praca 2., Praca 3.**). Stwierdziłem, że pod wpływem ołowiu następowała wprawdzie indukcja syntezy kalozy, jednak jej występowanie miało charakter lokalny. Wykazałem też, że większość ołowiu występująca w ścianach nie była odgradzona od protoplastu przez warstwę kalozy, zatem tylko niewielka pula metalu mogła być potencjalnie zatrzymana w ścianie. W konsekwencji ołów przedostawał się do protoplastu (**Praca 3.**). Podsumowując powyższe wyniki stwierdzam, że u **rośliny wodnej (*L. minor*) nie została potwierdzona rola kalozy jako skutecznej bariery ograniczającej wnikanie ołowiu do protoplastu, co**

wcześniej wykazano u roślin lądowych. Brak u tego gatunku skutecznych barier ograniczających przemieszczanie się ołowiu do protoplastu może tłumaczyć jego większą wrażliwość na oddziaływanie tego metalu. Otrzymane przeze mnie wyniki są pierwszym doniesieniem o niewystarczającej ochronie kalozowej tworzonej u przedstawiciela kwiatowych roślin wodnych w odpowiedzi na Pb. Wyniki te poszerzają wiedzę o strukturalnej strategii obronnej komórek roślinnych.

Indukcja syntezy kalozy, jest też ważnym mechanizmem obrony komórek roślinnych w odpowiedzi na biotyczne czynniki stresowe, w tym na patogeny grzybowe. Jak już wspomniałem, kaloza stanowi główny składnik brodawek (papilli) pełniących rolę fizycznej i chemicznej bariery we wnikaniu komórek patogenu do komórek roślinnych (Luna i wsp. 2011). W ww. brodawkach obok kalozy występują także inne składniki chemiczne, a mianowicie celuloza, pektyny, związki fenolowe w tym lignina, suberyna, lipidy, a także fitoaleksyny, krzem, H_2O_2 , glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę (HRGPs) oraz peroksydazy (Hardham i wsp. 2007). Proces tworzenia brodawek obejmuje szereg skoordynowanych procesów takich jak: synteza ich składników, transport do błony komórkowej i ściany, wydzielanie z protoplastu i wbudowywanie w strukturę ściany. Bardzo ważną rolę w tworzeniu brodawek pełni cytoszkielet aktynowy, nie tylko w procesie sekrecji, ale prawdopodobnie także spełniając funkcje sygnałowe i koordynacyjne (Schmelzer 2002). Ponadto cytoszkielet jest zaangażowany w reorganizację cytoplazmy, która towarzyszy tworzeniu brodawek. Lokalne nagromadzenie cytoszkieletu aktynowego obserwowano bowiem przy polaryzacji komórki w czasie tworzenia się papilli (Hardham i wsp. 2007). W rejonie pojawiających się komórek patogenu odbywa się przemieszczanie nie tylko sekrecyjnych pęcherzyków transportujących, ale także innych organelli – retikulum endoplazmatycznego, diktiosomów, peroksysomów i jądra komórkowego (Takemoto i wsp. 2003). Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę wskazującą bezpośrednio, że obecność patogenu może indukować ruch chloroplastów. Badania powyższe dotyczyły komórek *Physcomitrella patens* zakażanych strzępkami lęgniowców (Oomycetes), tj. *Pythium irregulare* i *Pythium debaryanum* (Oliver i wsp. 2009). W zakażonych komórkach *P. patens* stwierdzono przemieszczanie się chloroplastów w kierunku ścian, zwłaszcza do miejsc występowania komórek patogenu. W komórkach roślin kontrolnych chloroplasty były rozmieszczone równomiernie. Z powyższych obserwacji wynika, że ruch chloroplastów w odpowiedzi na atak patogenu można porównać raczej do reakcji akumulacji niż reakcji ucieczki. Prawdopodobnie „poinfekcyjny” ruch tych organelli jest możliwy dzięki funkcjonowaniu cytoszkieletu

aktywnego, który pełni kluczową rolę w mobilizacji reakcji obronnych komórek na działanie patogenu, nie tylko poprzez udział w formowaniu papilli i reorganizacji cytoplazmy (Hardham i wsp. 2007), ale także w takich reakcjach jak wybuch oksydacyjny, ekspresja białek związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related protein*) i śmierć komórek w wyniku reakcji nadwrażliwości (Wojtaszek 1997, Schmidt i Panstruga 2007).

W związku z powyższym w kolejnych doświadczeniach (**Praca 4, Formela i wsp. 2014**) przeprowadziłem analizy strukturalnych zmian cytoszkieletu w odpowiedzi *Lupinus luteus* L. cv. Juno na zakażenie patogenicznym grzybem *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*. Obserwacje cytoszkieletu były przeprowadzone w kontekście badań dotyczących krzyżowych oddziaływań węglowodanów rozpuszczalnych, tj. sacharozy, glukozy, fruktozy oraz zakażenia przez *F. oxysporum* na mechanizm biosyntezy genisteiny w osiach zarodkowych łubinu żółtego. W badaniach zastosowano stabilny model doświadczalny, jakim są kultury *in vitro* izolowanych osi zarodkowych kiełkujących nasion łubinu żółtego. Po ich odcięciu od liścieni inokulowano je zawiesiną zarodników *F. oxysporum*, a następnie wykładano na mineralną pożywkę z dodatkiem sacharozy lub bez niej. Osie zarodkowe *L. luteus* były skazane na źródło węgla podawane w pożywce mineralnej. Wcześniejsze badania wykazały, że podczas interakcji patogen – roślina, węglowodany rozpuszczalne stanowią nie tylko źródło węgla i energii, ale także pełnią rolę cząstek sygnałowych indukujących różne szlaki biochemiczne, w tym biosyntezę flawonoidów (Morkunas i wsp. 2005, Morkunas i wsp. 2007, Morkunas i wsp. 2011). Spośród izoflawonoidów, genisteina jest silnie reaktywnym wolnym aglikonem, który potencjalnie może pełnić rolę zarówno w hamowaniu zakażenia grzybowego (Morkunas i wsp. 2005, Morkunas i wsp. 2007, Morkunas i wsp. 2010, **Praca 4**), ale i w reakcjach obronnych na metale śladowe (Pawlak-Sprada i wsp. 2011).

Zakres moich badań w ramach **Pracy 4**. obejmował poinfekcyjną analizę struktury cytoszkieletu aktywnego i tubulinowego w komórkach inokulowanych *F. oxysporum* osi zarodkowych rosnących na pożywce z sacharozą i bez niej. Wykazałem, że w komórkach nieinokulowanych osi zarodkowych rosnących na pożywce z sacharozą (+Sn) cytoszkielet aktywny był utworzony z rozbudowanej sieci długich i grubych wiązek mikrofilamentów oplatających komórkę i ich odgałęzień. Odgałęzienia tworzyły gęstą sieć cienkich wiązek rozchodzących się w różnych kierunkach. W komórkach osi zarodkowych zakażonych *F. oxysporum* (+Si) obserwowałem pogrubienie wiązek i wzrost intensywności ich fluorescencji, zwłaszcza w okolicy jądra komórkowego. Poinfekcyjna reorganizacja cytoszkieletu występowała w całej komórce. Ponadto w komórkach osi zarodkowych z

niedoborem sacharozy (-Sn) obserwowałem częściowy zanik sieci cienkich wiązek mikrofilamentów. Dodatkowo, gdy rośliny były narażone na podwójny stres, tj. zakażenie *F. oxysporum* i niedobór węglowodanów (ang. *sugar starvation*), obserwowałem znaczne zmiany w obrazie mikrofilamentów. Stwierdziłem m.in. mniej rozbudowaną sieć wiązek, silną fragmentację, zmniejszenie grubości mikrofilamentów oraz ogólny spadek zawartości aktyny (słabsza fluorescencja). Obrazy te przypominały zmiany cytoszkieletu aktynowego, jakie obserwowano po zakażeniu zjadliwymi szczepami *Fusarium* w zawieszynie komórkowej pomidora (Humbert i wsp. 2015), a nie obserwowano w reakcji na szczep niepatogenny (Humbert i wsp. 2015). Podobnie, jak w przypadku cytoszkieletu aktynowego, cytoszkielet tubulinowy był znacznie bardziej zmieniony w komórkach osi zarodkowych inokulowanych w *F. oxysporum* w warunkach niedoboru węglowodanów. W obrazach mikrotubul zmiany polegały głównie na ich fragmentacji oraz pojawianiu się dużych, nieregularnych agregatów tubuliny i obszarów tubuliny o dyfuzyjnym (amorficznym) charakterze. W pozostałych wariantach natomiast nie obserwowano tak znaczących zmian w strukturze mikrotubul.

Uzyskane przeze mnie wyniki dotyczące architektury mikrotubul i mikrofilamentów wskazują więc na ważną rolę węglowodanów w reakcji roślin na stres biotyczny. Niedobór węglowodanów w istotny statystycznie sposób zaburzał bowiem zarówno cytoszkielet aktynowy jak i tubulinowy w osiach zarodkowych łubinu inokulowanych *F. oxysporium*. Zaburzeń tych nie obserwowano natomiast wtedy, gdy do pożywki dodawano sacharozę.

Powyższe dane zamieszczone w **Pracy 4.** i dotyczące reorganizacji cytoszkieletu aktynowego oraz tubulinowego poszerzają wiedzę dotyczącą wpływu czynników biotycznych na strukturę komórki roślinnej. **Po raz pierwszy ujawniłem bowiem poinfekcyjne zmiany w cytoszkielecie w kontekście zróżnicowanego poziomu sacharozy. Informacje te są ważne nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale mają także implikacje praktyczne. Wyniki powyższych badań stanowią bowiem ważną wskazówkę w uzyskiwaniu odmian roślin uprawnych odpornych na grzyby z rodzaju *Fusarium*.**

Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Przedstawione powyżej osiągnięcie stanowi zestaw prac związanych z moimi badaniami nad strukturalnymi efektami oddziaływania stresorów na komórki roślinne. Dotyczyły one stresorów o różnym charakterze: chemicznym (metale śladowe, niedobór

węglowodanów), fizycznym (wysokie natężenie światła) oraz biotycznym (patogen grzybowy *F. oxysporium*).

Mimo tej różnorodności, w reakcjach strukturalnych komórek roślinnych można zaobserwować duże podobieństwa. Przykładem jest reakcja ucieczki chloroplastów, która - jak się okazuje - może zachodzić nie tylko pod wpływem silnego światła, ale także w ciemności pod wpływem ołowiu (**Praca 1.**). Mimo podobieństwa strukturalnego tych reakcji, występują jednak między nimi pewne różnice funkcjonalne. W przypadku silnego światła mamy bowiem do czynienia z rzeczywistą reakcją ucieczki chloroplastów z miejsc o jego wysokim natężeniu stanowiących zagrożenie dla aparatu fotosyntetycznego. Jest to więc typowa strategia unikania stresu. W obecności ołowiu natomiast reakcja chloroplastów była wprawdzie podobnie ukierunkowana, jednak nie miała ona związku z miejscami występowania stresora. Trudno więc mówić w tym przypadku o strategii unikania jonów ołowiu przez chloroplasty. Do wyjaśnienia pozostaje więc rola jaką dla komórki, ale także chloroplastów, ma takie przemieszczanie się pod wpływem ołowiu.

Kolejnym przykładem ilustrującym swego rodzaju uniwersalność strategii komórek roślinnych wobec różnych stresorów jest indukcja syntezy kalozy. Polisacharyd ten jest deponowany w ścianach komórkowych w odpowiedzi nie tylko na metale śladowe, ale także na patogeny grzybowe, utrudniając lub uniemożliwiając wniknięcie stresora do protoplastu. Strategia ta ma więc również charakter strategii unikania. Indukcję syntezy kalozy stwierdziłem w komórkach wierzchołków wzrostu korzeni wodnej rośliny kwiatowej (*L. minor*) (**Praca 3.**) traktowanych jonami ołowiu. W przeciwieństwie jednak do komórek roślin lądowych, u *L. minor* nie potwierdziła się ochronna rola kalozy w stosunku do jonów tego metalu.

Powyższe przykłady świadczą więc o tym, że wprawdzie na poziomie strukturalnym można doszukiwać się podobieństw w reakcjach komórek roślinnych na różne stresory, jednak nie zawsze oznacza to, że obserwowane strategie mają taki sam charakter. Niewykluczone, że wynika to z uruchamiania przez różne stresory takich samych mechanizmów reakcji w komórkach niezależnie od roli jakie mechanizmy te spełnią w efekcie końcowym. Może się to odbywać zarówno na etapie percepcji bodźca, jak i przekazywania sygnału i/lub odpowiedzi efektorą (np. cytoszkieletu). W **Pracy 1.** wskazałem m.in. na potencjalną rolę nadtlenu wodoru jako cząsteczki sygnałowej w reakcjach ucieczki chloroplastów wywołanej przez różne stresory. Ważnym przejawem odpowiedzi komórek roślinnych na różne stresory są również zmiany strukturalne cytoszkieletu. Mają one podobny charakter (np. fragmentacja, depolimeryzacja)

niezależnie od tego czy były to czynniki biotyczne, czy abiotyczne (**Prace 1.,2.,4.**). Co ciekawe, w obecności patogenu grzybowego *F. oxysporum* znaczące modyfikacje architektury cytoszkieletu pojawiały się jedynie przy równoczesnym deficycie węglowodanów. W przypadku natomiast ołowiu już sama jego obecność wywoływała takie efekty. Niewykluczone więc, że zaburzenia w cytoszkielecie komórek osi zarodkowych *L. luteus* inokulowanych *F. oxysporum* wynikały z krzyżowych oddziaływań spowodowanych także dodatkowym deficytem węglowodanów. Powyższy przykład ilustruje ciekawy aspekt reakcji komórek w sytuacji współwystępowania stresorów. Nasuwa się więc pytanie, czy powyższy mechanizm występuje także w reakcjach ucieczki chloroplastów. Okazuje się, że nie zawsze, ponieważ w obecności ołowiu nie zmieniało się położenie profilowe chloroplastów np. w obecności światła o wysokim natężeniu.

Tak więc, należy stwierdzić, że przeprowadzone przeze mnie badania komórek narażonych na działanie różnych stresorów dostarczyły wiele nowych i ciekawych informacji dotyczących reakcji strukturalnych komórek roślinnych w warunkach stresowych. Wiedza ta jest ważna nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale ma także implikacje praktyczne. Może bowiem być przydatna np. w selekcji roślin pod kątem ich odporności na patogeny grzybowe oraz ich wykorzystania do bioindykacji czy fitoremediacji środowiska przyrodniczego zanieczyszczonego metalami śladowymi.

Literatura:

- Aggarwal C., Łabuz J., Gabryś H. (2013) Phosphoinositides play differential roles in regulating phototropin1-and phototropin2-mediated chloroplast movements in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 8: e55393, doi: 10.1371/journal.pone.0055393.
- Banaś A.K., Gabryś H. (2007) Influence of sugars on blue light-induced chloroplast relocations. *Plant Signal. Behav* 2: 221–230.
- Bechtold U., Karpiński S., Mullineaux P.M. (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant–biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell Environ.* 28: 1046–1055.
- Calzavara A., Bianchini E., Mazzanatti T., Oliveira H., Stolf-Moreira R., Pimenta J. (2015) Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. *Photosynthetica*. 53(4): 597-608.
- Goh C.H., Jang S., Jung S., Kim H.G., Kang H.G., Park Y.I., Bae H.J., Lee C.H., An G. (2009) Rice phot1 a mutation reduces plant growth by affecting photosynthetic responses to light during early seedling growth. *Plant Mol. Biol.* 69: 605–619.
- Grabalska M., Malec P. (2004) Blue light-induced chloroplast reorientation in *Lemna trisulca* L. (duckweed) are controlled by two separable cellular mechanisms as suggested by different sensitivity to wortmannin. *Photochem. Photobiol.* 79: 343–348.
- Han I.S., Cho H.Y., Moni A., Lee A.Y., Briggs W.R. (2013) Investigations on the photoregulation of chloroplast movement and leaf positioning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 54: 48–56.
- Hardham A.R., Jones D.A., Takemoto D. (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Cur. Opin. Plant Biol.* 10: 342–348.

- Higa T., Wada M. (2015) Clues to the signals for chloroplast photo-relocation from the lifetimes of accumulation and avoidance responses. *J. Integr. Plant Biol.* 57(1): 1744-7909.
- Humbert C., Aimé S., Alabouvette C., Steinberg C., Olivain C. (2015) Remodelling of actin cytoskeleton in tomato cells in response to inoculation with a biocontrol strain of *Fusarium oxysporum* in comparison to a pathogenic strain. *Plant Pathol.*: doi: 10.1111/ppa.12375.
- Hung S-H., Yu Ch-W., Lin Ch.H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.
- Kaiser E., Morales A., Harbinson J., Kromdijk J., Heuvelink E., Marcelis L.F.M. (2015) Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. *J. Exp. Bot.* 66 (9): 2415-2426.
- Kodama Y., Tsuboi H., Kagawa T., Wada M. (2008) Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. *J. Plant Res.* 121: 441-448.
- Krzyszowska M. (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol. Plant.* 33:35-51.
- Krzyszowicz W., Gabryś H. (2007) Phototropin Mediated Relocation of Myosins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 2(5): 333-336.
- Legocka J., Sobieszczuk-Nowicka E., Wojtyła Ł., **Samardakiewicz S.** (2015) Lead-stress induced changes in the content of free, thylakoid- and chromatin-bound polyamines, photosynthetic parameters and ultrastructure in greening barley leaves. *J. Plant Physiol.* 186: 15-24.
- Luna E., Pastor V., Robert J., Flors V., Mauch-Mani B., Ton J. (2011) Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *MPMI* 24(2): 183-193.
- Mai V.Ch., Bednarski W., Borowiak-Sobkowiak B., Wilkaniec B., **Samardakiewicz S.**, Morkunas I. (2013) Oxidative stress in pea seedling leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry* 93:49-62.
- Malec P., Rinaldi R.A., Gabryś H. (1996) Light-induced chloroplast movements in *Lemna trisulca*. Identification of the motile system. *Plant Sci.* 120(2): 127-137.
- Morkunas I., Gmerek J. (2007) The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *J. Plant Physiol.* 164(2): 185-194.
- Morkunas I., Kozłowska M., Ratajczak L., Marczak Ł. (2007) Role of sucrose in the development of *Fusarium* wilt in lupine embryo axes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 70(1-3): 25-37.
- Morkunas I., Marczak Ł., Stachowiak J., Stobiecki M. (2005) Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 363-373.
- Morkunas I., Narożna D., Nowak W., **Samardakiewicz S.**, Remlein-Starosta D. (2011) Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *J. Plant Physiol.* 168: 424-433.
- Morkunas I., Stobiecki M., Marczak Ł., Stachowiak J., Narożna D., Remlein-Starosta D. (2010) Changes in carbohydrate and isoflavonoid metabolism in yellow lupine in response to infection by *Fusarium oxysporum* during the stages of seed germination and early seedling growth. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75: 46-55.
- O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P. (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236:765-779.
- Oelze M.L., Vogel M.O., Alsharafa K., Kahmann U., Viehhauser A. (2012) Efficient acclimation of the chloroplast antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to a 10- or 100-fold light increment and the possible involvement of retrograde signals. *J. Exp. Bot.* 63: 1297-1313.
- Ogasawara Y., Ishizaki K., Kohchi T., Kodama Y. (2013) Cold-induced organelle relocation in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Environ.* 36: 1520-1528.
- Oliver J.P., Castro A., Gaggero C., Cascón T., Schmelz E.A., Castresana C., de León I.P. (2009) Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta* 230: 569-579.
- Pawlak-Sprada S., Stobiecki M., Deckert J. (2011) Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part II. Profiling of isoflavonoids and their glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Bioch. Pol.* 58(2): 217-223.
- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 213: 113-136.

- Przymusiński R., Rucińska-Sobkowiak R., Ilska B., Gwóźdź E. (2007) Organospecific responses of lupin seedlings to lead localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity. *Acta Physiol. Plant.* 29: 411–416.
- Romanowska E., Wróblewska B., Drożak A., Siedlecka M. (2006) High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 387–394.
- Ruban A.V. (2009) Plants in light. *Commun. Integr. Biol.* 2(1):50-55.
- Samardakiewicz S.**, Strawiński P., Woźny A. (1996) The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biol. Plantarum* 38:463–467.
- Samardakiewicz S.**, Woźny A. (2000) The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant Soil* 226: 107-111.
- Sampathkumar A., Lindeboom J.J., Debolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D.W., Ketelaar T., Persson S. (2013) Live Cell Imaging Reveals Structural Associations between the Actin and Microtubule Cytoskeleton in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* Vol. 23: 2302–2313.
- Sato Y., Kadota A., Wada M. (1999) Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiol.* 121: 37–44.
- Sato Y., Kadota A., Wada M. (2003) Chloroplast movement: dissection of events downstream of photo- and mechano-perception. *J. Plant Res.* 116: 1–5.
- Schmelzer E. (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci.* 7(9): 411-415.
- Schmidt S.M., Panstruga R. (2007) Cytoskeleton functions in plant–microbe interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 135–148.
- Sytar O., Kumar A., Latowski D., Kuczyńska P., Strzałka K., Prasad M.N. V. (2013) Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiol. Plant.* 35: 985–999.
- Takemoto D., Hardham A.R. (2004) The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiol.* 136: 3864–3876.
- Teraoka T., Kaneko M., Mori S., Yoshimura E. (2002) Aluminum rapidly inhibits cellulose synthesis in roots of barley and wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 159(1): 17-23.
- Tłałka M., Gabryś H. (1993) Influence of calcium on blue-light induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* 189: 491–498.
- Tłałka M., Fricker M. (1999) The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Plant J.* 20: 461–473.
- Walczak T., Gabryś H. (1980) New type of photometer for measurements of transmission changes corresponding to chloroplast movements in leaves. *Photosynthetica* 14: 65–72.
- Wang Y., Lin A., Loake G.J., Chu C. (2013) H₂O₂-induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 202–208.
- Wen F., Xing D., Zhang L. (2008) Hydrogen peroxide is involved in high blue light-induced chloroplast avoidance movements in *Arabidopsis*. *J. Exp. Biol.* 59: 2891–2901.
- Wituszyńska W., Karpiński S. (2013) Programmed cell death as a response to high light, UV and drought stress in plants. In: Vahdati K, Leslie Ch, editors. Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture. Rijeka, Shanghai: *InTech*. pp. 207–246.
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.
- Zurzycki J. (1962) The action spectrum for the light depended movements of chloroplasts in *Lemna trisulca* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 31: 489–538.
- Zurzycki J. (1980) Blue light-induced intracellular movements. In: Senger H, editor. The blue light syndrome. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 50–68.

V OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu rozpocząłem w 1988r. i ukończyłem je w 1993r. obroną pracy magisterskiej pt.: „Pobieranie ołowiu przez *Lemna minor* L.” wykonanej w Zakładzie Botaniki Ogólnej pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Woźnego. Był to początek mojej fascynacji światem biologii komórki roślinnej. Zawdzięczam to profesorowi Adamowi Woźnemu, który nie tylko pokazał mi niepowtarzalne piękno tego świata, ale także nauczył mnie odkrywania tajemnic jego struktury i funkcji. Bardzo ucieszyłem się więc, gdy po zakończeniu studiów, profesor zaproponował mi pracę w jego zespole badawczym w Zakładzie Botaniki Ogólnej. Zakładem tym kierował wtedy prof. dr hab. Maciej Zenkteler, który z ogromną życzliwością przyjął mnie do Zakładu Botaniki Ogólnej, początkowo w ramach studiów doktoranckich (1993-1994), a następnie etatu asystenta (1994-2000). Po uzyskaniu stopnia doktora (2000) kontynuowałem pracę w tym Zakładzie na etacie adiunkta. W 2004r. przeszedłem do Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Wydziału Biologii UAM, w której pracuję do dzisiaj jako adiunkt i jednocześnie kierownik tej Pracowni. Mimo zmiany miejsca zatrudnienia kontynuowałem swoje zainteresowania naukowe i współpracę z profesorem Adamem Woźnym.

Od samego początku pracy badawczej głównym nurtem moich zainteresowań były zagadnienia związane z oddziaływaniem czynników stresowych na rośliny. W tym zakresie szczególnie interesował mnie wpływ metali śladowych, a zwłaszcza ołowiu, na komórki roślinne. Mój wybór jonów ołowiu jako czynnika stresowego wiązał się m.in. z faktem, że jak dotąd nie wykazano aby metal ten pełnił funkcje metaboliczne w komórkach roślinnych. Wiadomo natomiast, że nawet w bardzo niskich stężeniach jest on toksyczny dla komórek, powodując wiele niekorzystnych zmian w procesach metabolicznych, a w skrajnych przypadkach śmierć całego organizmu. Mimo tej wiedzy, wiele pytań dotyczących mechanizmów jego oddziaływań na komórki roślinne nadal pozostaje bez odpowiedzi.

W swoich pracach badawczych początkowo skupiłem się na zjawisku pobierania i transportu ołowiu oraz skutków jego obecności w komórkach korzeni. W literaturze zagadnienia te najszerszej opisywano w odniesieniu do roślin lądowych, znacznie słabiej poznano je natomiast u roślin wodnych. W związku z tym do swoich badań włączyłem wodne rośliny *Lemna minor* L. (rzęsa drobna) i *Lemna trisulca* L. (rzęsa trójrowkowa). Należą one do rodziny Lemnaceae (podrodzina *Lemnoideae* w obrębie rodziny Araceae

według systemu APG III z 2009r.), której przedstawiciele zaliczani są do najmniejszych roślin nasiennych. Rośliny z tej rodziny charakteryzują się również uproszczoną budową morfologiczno-anatomiczną (cecha ta sprzyja badaniom mikroskopowym) oraz bardzo szybkim tempem namnażania na drodze wegetatywnej (co ułatwia kulturę *in vitro* tych roślin). Istotna jest również możliwość ich hodowli na pożywkach płynnych. Składniki tych pożywek są wtedy bardziej, niż w przypadku pożywek zestalonych, dostępne dla korzeni oraz członów łodygowo-liściowych (pędy tych roślin mają formę członów łodygowo-liściowych, które bezpośrednio kontaktują się z roztworami pożywki). Należy też dodać, że rośliny z rodziny Lemnaceae znalazły szerokie zastosowanie w działalności człowieka związanej nie tylko z produkcją pasz, ale także z oczyszczaniem ścieków komunalnych, produkcją leków oraz biomonitoringiem. Powyższe cechy Lemnaceae zdecydowały o tym, że do moich badań nad wpływem ołowiu na komórki roślin wodnych wybrałem gatunki z tej rodziny.

W swoich pracach wykazałem m.in., że korzeń *L. minor* jest nie tylko, jak wynikało z danych literaturowych, organem odpowiedzialnym za właściwe położenie rośliny w wodzie, ale także organem funkcjonalnym w pobieraniu i transporcie (Samardakiewicz 2000, Samardakiewicz i Woźny 2000). Co więcej, podobnie jak u roślin lądowych, u *L. minor* jest on głównym organem odpowiedzialnym za pobieranie ołowiu przez tę roślinę. Tempo pobierania jonów metalu było stosunkowo szybkie, bo już po upływie 0,5 do 1 godziny ołów był obecny we wszystkich warstwach komórek korzenia (Kocjan i wsp. 1996, Samardakiewicz i Woźny 2000). Strąty ołowiu występowały głównie w ścianach komórkowych, a także w wakuolach i w świetle struktur błonowych – retikulum endoplazmatycznego, pęcherzyków diktiosomalnych, otoczki jądrowej i tylakoidów (Kocjan i wsp. 1996, Borek i wsp. 1998, Samardakiewicz 2000).

Powyższe badania początkowo prowadziłem z wykorzystaniem detekcji strąków ołowiu za pomocą klasycznej techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Stosowanie tej techniki stwarzało jednak pewne ograniczenia. Przede wszystkim nie pozwalała ona na określenie zawartości ołowiu w badanych miejscach. Ponadto nie dawała możliwości zweryfikowania czy obserwowane strąty w każdym przypadku zawierały atomy ołowiu. W związku z tym szukałem nowych metod rozwiązania nurtujących mnie zagadnień. Nowe perspektywy badawcze otwarły się przede mną w 1996r., gdy otrzymałem Krajowe Stypendium Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN. Stypendium to zrealizowałem w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej kierowanym przez prof. dr hab. Elżbietę Wyrobę (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

PAN w Warszawie). Zapoczątkowało to moją wieloletnią współpracę z tym wiodącym Laboratorium, i dało możliwość poszerzania mojego warsztatu badawczego o najnowocześniejsze techniki mikroskopii elektronowej. Laboratorium to było m.in. pierwszym w Polsce, w którym można było badać próbki biologiczne za pomocą mikroanalizy rentgenowskiej sprzężonej z transmisyjną mikroskopią elektronową. Metoda ta okazała się kluczowa w rozwiązaniu moich problemów badawczych związanych z analizą obecności ołowiu w komórkach roślinnych. Dzięki połączeniu mikroanalizy rentgenowskiej z transmisyjną mikroskopią elektronową udało mi się m.in. określić etapy przemieszczania się ołowiu w komórkach korzenia *L. minor*. Jak się okazało początkowo był on obecny w apopląście i to już po 5 min. od umieszczenia rośliny w pożywce zawierającej jony ołowiu. Po 1 godz. traktowania roślin ołowiem największą jego zawartość odnotowywano w drobnych wakuolach/pęcherzykach, natomiast po 6 godz. w ścianie komórkowej (Samardakiewicz 2000, Samardakiewicz i Woźny 2000). Zaobserwowane zmiany pomiędzy zawartością tego metalu w wakuolach i ścianach komórkowych oraz jego obecność w drobnych wakuolach mogą być wynikiem redystrybucji tego metalu pomiędzy symplastem a apoplastem np. na drodze endo- i/lub egzocytozy. Przypuszczenia te potwierdziły późniejsze badania prowadzone przez dr hab. prof. UAM Magdalenę Krzesłowską (Zakład Botaniki Ogólnej, Wydział Biologii UAM) na innych modelach roślinnych (Krzesłowska i wsp. 2010).

Po uzyskaniu grantu promotorskiego KBN w 1998r. badania z wykorzystaniem mikroanalizy rtg kontynuowałem koncentrując się na redystrybucji ołowiu w obrębie jądra komórkowego. Dostarczyły one bardzo ciekawych wyników. Okazało się m.in., że ołów występował w nich nie tylko w chromatynie jąder interfazowych, ale także w chromosomach podczas podziałów komórkowych (Samardakiewicz 2000). Wynik ten wskazuje, że ołów może być bardzo niebezpieczny dla funkcjonowania jąder komórkowych, zwłaszcza w procesach podziałowych. Potwierdziły to moje późniejsze badania dotyczące oddziaływania ołowiu na podziały komórkowe w korzeniach *L. minor* (Samardakiewicz 2000, Samardakiewicz i Woźny 2005).

Ważną część moich badań stanowiła kwestia skutków obecności ołowiu w komórkach roślinnych. Pojawienie się ołowiu w komórkach *L. minor* powodowało m.in. wiele zmian w ich ultrastrukturze. Przede wszystkim był to wzrost wakuolizacji, liczby struktur błonowych, spęcznienie cystem ER, zniekształcenie cystem diktiosomalnych, zmiana kształtu przekrojów jąder z kolistego na płatowaty oraz bardziej spęczniałe niż w kontroli plastydy, w których dodatkowo obserwowano wzrost liczby plastoglobul (Kocjan

i wsp. 1996, Borek i wsp. 1998, Samardakiewicz 2000). Powyższe zmiany pogłębiały się wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji roślin na ołów oraz przy obniżaniu pH pożywki (Kocjan i wsp. 1996, Borek i wsp. 1998, Samardakiewicz 2000).

Jednym z kluczowych zagadnień w badaniach komórek roślinnych w kontekście oddziaływań na nie czynników stresowych są reakcje obronne komórek na te czynniki. W przypadku jonów ołowiu istotne są strategie umożliwiające ich kompartmentację w określonych strukturach komórkowych. Przykładem mogą być np. opisane wyżej przypadki gromadzenia ołowiu w ścianach komórkowych i w wakuolach komórek korzenia *L. minor*. Wyniki uzyskane za pomocą mikroanalizy rtg wykazały dodatkowo, że po krótkim czasie od podania ołowiu, jednym z ważniejszych miejsc kompartmentacji metalu była wakuola. Rola ściany komórkowej zwiększała się natomiast po dłuższych czasach kontaktu z czynnikiem stresowym (Samardakiewicz i Woźny 2000).

Wyniki sugerujące, że ściana komórkowa może brać udział w reakcjach obronnych poprzez kompartmentację zainspirowały mnie do dalszego wyjaśnienia mechanizmów tego zjawiska. Postanowiłem między innymi zbadać czy ma to związek ze zmianą składu ściany komórkowej. W pierwszej kolejności zainteresowałem się kalozą. Wiadomo było bowiem, że kaloza często pełni funkcje bariery mechanicznej utrudniającej, a niekiedy nawet uniemożliwiającej przemieszczanie się w komórkach roślinnych wielu czynników stresowych. Takich informacji nie znalazłem jednak w odniesieniu do ołowiu. Stąd publikacja, która ukazała się w 1996r. (Samardakiewicz i wsp. 1996) była jedną z pierwszych na świecie, w której wykazałem, że w korzeniu *L. minor* ołów rzeczywiście indukuje zwiększoną syntezę kalozy. Były to jednak jedynie badania cytochemiczne na poziomie morfologicznym, które nie pozwoliły mi odpowiedzieć na pytanie czy kaloza pełni funkcję bariery ograniczającej przemieszczanie się ołowiu w komórkach korzenia. Do kwestii tej wróciłem po doktoracie, efektem czego jest publikacja, która weszła w zakres mojego głównego osiągnięcia naukowego (pkt IV Autoreferatu, **Praca 3.**).

Podsumowując pierwszy okres mojej działalności naukowej (do doktoratu) chciałbym nawiązać do moich poszukiwań dotyczących podobieństw i różnic pomiędzy reakcjami komórek roślin wodnych i lądowych. Porównując moje dane uzyskane na przykładzie komórek rośliny wodnej *L. minor* z danymi literaturowymi dotyczącymi wielu gatunków roślin lądowych, stwierdzam, że mimo różnic w ekofizjologii tych roślin, istnieje wiele podobieństw w ich reakcjach na ołów. Jeżeli występowały różnice to wynikały one przede wszystkim ze specyfiki budowy *L. minor*. Przykładem może być fakt, że w korzeniu tej rośliny występują chloroplasty. Co więcej, w swoich pracach

wykazałem, że chloroplasty z słabo rozbudowanym systemem tylakoidów znajdują się u *L. minor* nawet w komórkach inicjalnych merystemu korzenia (Samardakiewicz 2000).

Osiągnięcia po doktoracie

Po uzyskaniu doktoratu kontynuowałem swoje zainteresowania badawcze związane z wpływem czynników stresowych na strukturę komórek roślinnych, zwłaszcza strukturę plastydów. Do moich najważniejszych osiągnięć w tym zakresie zaliczam odkrycie zjawiska zmiany położenia chloroplastów w komórkach mezofilu *L. trisulca* w obecności ołowiu (pkt IV Autoreferatu, **Praca 1**). Było to możliwe dzięki współpracy z prof. dr hab. Haliną Gabryś (obecnie Zakład Biotechnologii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego), która jest wybitną specjalistką m.in. w zakresie kierunkowych ruchów chloroplastów. Współpracę naukową z panią profesor Haliną Gabryś rozpocząłem w 2003r. w ramach Krajowego Stypendium Wyjazdowego Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (realizowanego w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin UJ) i kontynuuję ją do dzisiaj przy wsparciu finansowym między innymi Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (w ramach grantu pt.: „Reakcja ucieczki chloroplastów pod wpływem jonów ołowiu na przykładzie *Lemna trisulca* L.”). Przyznam przy tej okazji, że spotkania z panią profesor Haliną Gabryś są dla mnie zawsze źródłem wielu inspiracji naukowych.

W dotychczasowych badaniach zajmowałem się również efektami oddziaływania ołowiu na ultrastrukturę chloroplastów. Przykładem mogą być obserwacje struktury chloroplastów zazieleniających się liści *Hordeum vulgare* L. (jęczmień zwyczajny) traktowanych jonami ołowiu. Były to badania, które wpisywały się w szerszy kontekst eksperymentów fizjologicznych zespołu prof. dr hab. Jolanty Legockiej (Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii UAM) nad rolę poliamin w stresie wywołanym przez jony ołowiu. W przypadku chloroplastów roślin traktowanych tym metalem stwierdziłem między innymi spadek w stosunku do kontroli liczby tylakoidów przypadających na granum oraz kondensację chromatyny. Nie wykluczone więc, że zmiany na poziomie ultrastrukturalnym miały związek ze zmianami jakie równocześnie wykazano w zawartości poliamin związanych z tylakoidami i chromatyną (Legocka i wsp. 2015).

Bardzo ciekawy aspekt moich badań nad plastydami wiązał się z problematyką realizowaną przez zespół prof. dr. hab. Grzegorza Jackowskiego (Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii UAM). Profesor zaproponował mi opracowanie w ramach grantu MNiSW pt. „Fizjologiczne funkcje proteaz z rodziny Deg” cech strukturalnych liści

mutantów *Arabidopsis thaliana*, u których zostały wyciszone chloroplastowe proteazy DEG2 (biorąca udział w stresu-zależnej degradacji apobiałka Lhcb6) i DEG5 (której przypisuje się m.in. udział w degradacji apobiałek PsbA i PsbF uszkodzonych pod wpływem odpowiednio: stresu świetlnego i zranienia). Badania strukturalne tych mutantów wykazały, że w warunkach bezstresowych powyższe proteazy biorą udział w prawidłowym kształtowaniu się morfologii i anatomii liści oraz ultrastruktury chloroplastów. Przykładowo chloroplasty mutantów *deg2-2* i *deg2-3* charakteryzowały się mniejszą liczbą plastoglobul i zwiększoną liczbą tylakoidów w granum, natomiast chloroplasty mutantów *deg5* zawierały zwiększone ilości skrobi pod koniec fazy ciemności (Luciński i wsp. 2011a i b).

Kolejny cykl moich prac związanych z reakcjami plastydów na czynniki stresowe dotyczył badań nad plastycznością fenotypową igieł *Abies alba* Mill. (jodły pospolitej) w różnych warunkach świetlnych. Były to prace, które realizowałem dzięki współpracy z prof. dr. hab. Piotrem Robakowskim z Wydziału Leśnego Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu). Były one częścią ekofizjologicznych opracowań związanych z programem restytucji jodły w Karkonoskim Parku Narodowym. Celem tych prac było określenie optymalnych drzewostanów, pod okapem których sadzonki jodły uzyskiwałyby najkorzystniejsze warunki świetlne. W związku z tym prowadzono kilkuletni monitoring różnych strukturalnych i fizjologicznych parametrów igieł młodych jodeł rosnących pod okapem kilku gatunków roślin drzewiastych. Uwzględniano w tych badaniach różne warunki świetlne wynikające z obecności światła rozproszonego o niskiej wartości energetycznej, które docierało przez zwarty okap oraz światła bezpośredniego o wysokiej energii, które docierało w postaci plam świetlnych. Nasze badania strukturalne prowadzone wraz z mgr. Danielem Kierzkowskim (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, obecnie Max Planck Institute for Plant Breeding Research) koncentrowały się na cechach morfologicznych i anatomicznych igieł jodły oraz ultrastrukturze chloroplastów. Obserwacje nasze potwierdziły badania fizjologiczne, które wskazywały na bardzo dużą plastyczność w przystosowaniu aparatu fotosyntetycznego igieł jodły do różnych warunków świetlnych. Jednocześnie dostarczyły one praktycznych wskazówek co do zachowania optymalnych warunków świetlnych dla wzrostu tych siewek (Robakowski i wsp. 2004 a i b, Kierzkowski i wsp. 2007).

Za bardzo ważne w swoim dorobku uważam również prace związane z określeniem efektów oddziaływania ołowiu na ściany komórkowe. Moim szczególnym osiągnięciem w tym zakresie było wykazanie na przykładzie komórek korzenia *L. minor* traktowanych

ołowiem, że kaloza nie zawsze jest skuteczną barierą ograniczającą wnikanie ołowiu do protoplastów (pkt IV Autoreferatu, **Praca 3.**). Wcześniej uczestniczyłem w pracach badawczych dr hab. prof. UAM Magdaleny Krzesłowskiej, w których została wykazana ochronna rola kalozy polegająca na sekwestracji ołowiu w ścianach szczytowo rosnących komórek *Funaria hygrometrica* (Krzesłowska i wsp. 2010). Należy w tym miejscu wspomnieć, że na przykładzie komórek *F. hygrometrica* po raz pierwszy wykazano również, że ołów na drodze endocytozy może być pobierany ze ściany komórkowej wraz z internalizacją jej składników. Ważną rolę w tym procesie odgrywa wiązanie ołowiu przez frakcję słabo zestryfikowanych pektyn. Ołów może być następnie transportowany szlakami endocytotycznym i sekrecyjnym do wakuoli oraz ponownie do ściany komórkowej (Krzesłowska i wsp. 2009a, Krzesłowska i wsp. 2010 oraz praca przeglądowa Krzesłowska i wsp. 2009b). Procesom tym towarzyszy modyfikacja składu ścian komórkowych (m.in. wzrost zawartości słabo zestryfikowanych pektyn) oraz powstawanie zgrubień co prowadzi do zwiększenia pojemności ścian dla kumulacji toksycznego metalu (Krzesłowska i wsp. 2009 a i b, Krzesłowska i wsp. 2010). Obecnie biorę udział w pracach kierowanych przez panią profesor Magdalenę Krzesłowską, w ramach grantu MNiSW pt.: "Modyfikacje budowy ściany komórkowej w odpowiedzi na ołów oraz przyczyny ich powstawania". Jednym z celów tych badań jest sprawdzenie na ile powyższe mechanizmy przebudowy ściany opisane dla *F. hygrometrica* są uniwersalne w świecie roślin, w tym także roślin wodnych.

Spośród aktywności komórek roślinnych w obecności ołowiu badałem ponadto ich aktywność podziałową (Samardakiewicz i Woźny 2005). Wykazałem m.in., że proces podziałów komórek merystemu wierzchołkowego *L. minor* jest niezwykle wrażliwy na działanie ołowiu. Przejawem tego było m.in. bardzo wczesne pojawianie się zaburzeń m.in. w postaci mikrojąder, wcześniejsze niż u roślin lądowych tradycyjnie wykorzystywanych w mikrojądrowych testach toksykologicznych. Ta swoista cecha komórek *L. minor* może więc być przydatna np. w biomonitoringu zanieczyszczeń środowiska wodnego jonami tego metalu.

Powyższe zaburzenia podziałów komórkowych mogą wynikać z modyfikacji struktury cytoszkieletu tubulinowego. Potwierdziło się to w moich badaniach dotyczących skutków oddziaływania ołowiu na cytoszkielet tubulinowy w komórkach merystemu korzenia *L. minor*. Badania, w których wykorzystałem immunodetekcję tubuliny, początkowo prowadziłem w oparciu o tradycyjną technikę mikroskopii fluorescencyjnej. Nie pozwalała ona jednak precyzyjnie określić zmian w strukturze mikrotubul tej rośliny.

Problem ten rozwiązałem dopiero w 2002r., gdy pojawiła się możliwość rejestracji obrazów za pomocą mikroskopu konfokalnego. Część z tych wyników zaprezentowałem w pracy przeglądowej dotyczącej oddziaływania metali śladowych na cytoszkielet tubulinowy (pkt IV Autoreferatu, **Praca 2**).

W swoich pracach dotyczących oddziaływania stresorów na cytoszkielet nie ograniczałem się jedynie do badania czynników abiotycznych. Dzięki współpracy z prof. dr hab. prof. UP Iwoną Morkunas (Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) oraz z dr. Marcinem Zadwornym (Instytut Dendrologii PAN w Kórniku) rozszerzyłem mój obszar badawczy o zagadnienia związane z oddziaływaniem grzybów patogennych na komórki roślinne.

Za szczególnie interesujące osiągnięcie w tym zakresie uważam pionierskie badania dotyczące poinfekcyjnych zmian w cytoszkielecie tubulinowym i aktynowym w kontekście zróżnicowanego poziomu sacharozy w osiach zarodkowych łubinu inokulowanych *Fusarium oxysporum* (pkt IV Autoreferatu, **Praca 4**). Obserwacje te przeprowadziłem we współpracy z zespołem badawczym pani profesor Iwony Morkunas.

Równie ciekawe wyniki uzyskano w ramach prac kierowanych przez dr. Marcina Zadwornego. Celem tych prac było między innymi określenie roli cytoszkieletu komórkowego w reakcji obronnej siewek sosny zwyczajnej po zakażeniu szczepami reprezentującymi różne grupy intersterylne wybranych gatunków z rodzaju *Heterobasidion* (korzeniowiec). Obrazy zaburzeń cytoszkieletu aktynowego i tubulinowego komórek sosny często przypominały te jakie obserwowano w komórkach łubinu zainfekowanych *F. oxysporum* (Zadworny i wsp. 2013; pkt IV Autoreferatu, **Praca 4**). Wśród podobnych zmian struktury w obu układach doświadczalnych występowało m.in. pogrubienie mikrofilamentów oraz ich fragmentacja. W przypadku natomiast cytoszkieletu tubulinowego była to jego depolimeryzacja oraz tworzenie skupisk tubuliny. Należy też nadmienić, że dodatek specyficznych inhibitorów cytoszkieletu w pożywce, na której rosły siewki sosny, ułatwiał infekcję patogenów (Zadworny i wsp. 2013). Te wyniki pokazują, jak ważne w obronie przed patogenami grzybowymi jest zachowanie prawidłowej struktury cytoszkieletu komórek roślinnych.

Podsumowując swą aktywność naukową po doktoracie mogę stwierdzić, że mimo licznych pobocznych wątków, większość z nich można sprowadzić do wspólnego mianownika jakim są badania nad oddziaływaniem różnych czynników stresowych na komórki roślinne. Z tej różnorodności moich badań wyłania się też szeroki obraz reakcji komórek roślinnych na stresory. Ponadto wielokierunkowość moich prac znacząco

przyczyniła się nie tylko do wzbogacenia wiedzy w tym zakresie, ale także mojego warsztatu badawczego.

Literatura:

1. Borek S., **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (1998) The effect of pH on lead toxicity in *Lemna minor* L. *Biological Bulletin of Poznań* (aktualna nazwa czasopisma: *Biological Letters*) 35(1): 19-24.
2. Kierzkowski D., **Samardakiewicz S.**, Robakowski P. (2007) Variation in ultrastructure of chloroplasts in needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) saplings growing under the canopies of diverse tree species. *Polish Journal of Ecology* 55(4): 821-825.
3. Kocjan G., **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (1996) Regions of lead uptake in *Lemna minor* plants and localization of this metal within selected parts of the roots. *Biologia Plantarum* 38 (1): 107-117.
4. Krzesłowska M., Lenartowska M., Mellerowicz E.J., **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (2009a) Pectinous cell wall thickenings formation A response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany* 65: 119–131.
5. Krzesłowska M., Lenartowska M., **Samardakiewicz S.**, Bilski H., Woźny A. (2010) Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable -a remobilization can occur. *Environmental Pollution* 158(1): 325-338.
6. Krzesłowska M., **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (2009b) Cell wall in the plant cell response to trace metals. Metal transport and sequestration. In: Maksymiec R. (ed.) *Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False. Transworld Research Network*, pp 19-60.
7. Legocka J., Sobieszczuk-Nowicka E., Wojtyła Ł., **Samardakiewicz S.** (2015) Lead-stress induced changes in the content of free, thylakoid- and chromatin-bound polyamines, photosynthetic parameters and ultrastructure in greening barley leaves. *Journal of Plant Physiology* 186: 15-24.
8. Luciński R., Misztal L., **Samardakiewicz S.**, Jackowski G. (2011a) Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(3): 311-320.
9. Luciński R., Misztal L., **Samardakiewicz S.**, Jackowski G. (2011b) The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 192: 74–86.
10. Morkunas I., Narożna D., Nowak W., **Samardakiewicz S.**, Remlein-Starosta D. (2011) Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *Journal of Plant Physiology* 168(5): 424-433.
11. Robakowski P., **Samardakiewicz S.**, Kierzkowski D. (2004) Variation in structure of needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) saplings growing under the canopies of diverse tree species. *Polish Journal of Ecology* 52: 563-568.
12. Robakowski P., Wyka T., **Samardakiewicz S.**, Kierzkowski D. (2004) Growth, photosynthesis, and needle structure of silver fir (*Abies alba* Mill.) seedlings under different canopies. *Forest Ecology and Management* 201: 211-227.
13. **Samardakiewicz S.** (2000) Strukturalne i funkcjonalne efekty oddziaływania ołowiu na korzenie. Rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Botaniki Ogólnej Wydziału Biologii UAM, Poznań, str 103.

14. **Samardakiewicz S.**, Strawiński P., Woźny A. (1996) The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biologia Plantarum* 38(3): 463-467.
15. **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (2000) The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant and Soil* 226: 107-111.
16. **Samardakiewicz S.**, Woźny A. (2005) Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. *Aquatic Botany* 83: 289-295.
17. Zadworny M., Guzicka M., Łakomy P., **Samardakiewicz S.**, Smoliński D., Mucha J. (2013) Analysis of microtubule and microfilament distribution in *Pinus sylvestris* roots following infection by *Heterobasidion* species. *Forest Pathology* 43: 222-231.

Sławomir Samardakiewicz