

Łukasz Piotr Haliński

Obszar wiedzy: Nauki Przyrodnicze

Dziedzina: Nauki Biologiczne

Dyscyplina: Biologia

**Zastosowanie metabolitów wtórnych w analizie
chemotaksonomicznej oraz ocenie stopnia udomowienia
wybranych gatunków roślin psiankowatych**

AUTOREFERAT

Pracownia Analizy Związków Naturalnych
Katedra Analizy Środowiska
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk 2019

1. Imię i nazwisko

Łukasz Piotr Haliński

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowego

28.06.2005 r. **Magister ochrony środowiska**, kierunek Ochrona Środowiska, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego; praca "Ekstrakcja wosków powierzchniowych ziemniaka jadalnego (*Solanum tuberosum*)", wykonana w Katedrze Analizy Środowiska pod kierunkiem dr inż. Beaty Szafranek

27.01.2010 r. **Doktor nauk chemicznych w zakresie chemii**, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego; praca "Chemiczna analiza wosków powierzchniowych bakłażana (*Solanum melongena* L.) oraz gatunków pokrewnych, z uwzględnieniem ich znaczenia biologicznego i taksonomicznego", wykonana w Katedrze Analizy Środowiska pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Janusza Szafranka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2009-30.09.2010 Starszy referent techniczny, Katedra Analizy Środowiska, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

01.10.2010-obecnie Adiunkt, Katedra Analizy Środowiska, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

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. 2017 r. poz. 1789)

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Zastosowanie metabolitów wtórnych w analizie chemotaksonomicznej oraz ocenie stopnia udomowienia wybranych gatunków roślin psiankowatych

B) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

O1 L.P. Haliński, M. Paszkiewicz, M. Gołębiowski, P. Stepnowski, The chemical composition of cuticular waxes from leaves of the gboma eggplant (*Solanum macrocarpon* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, **25**, 74-78 (IF 2,088; MNiSW 40)

O2 L.P. Haliński, P. Stepnowski, Short-term water deficit changes cuticular sterol profile in the eggplant (*Solanum melongena*). *Chemistry & Biodiversity*, 2016, **13**, 719-726 (IF 1,440; MNiSW 20)

O3 L.P. Haliński, J. Samuels, P. Stepnowski, Multivariate analysis as a key tool in chemotaxonomy of brinjal eggplant, African eggplants and wild related species. *Phytochemistry*, 2017, **144**, 87-97 (IF 3,186; MNiSW 35)

O4 L.P. Haliński, A. Puckowski, P. Stepnowski, Glycoalkaloid, phytosterol and fatty acid contents of raw and blanched leaves of the gboma eggplant (*Solanum macrocarpon* L.). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2015, **54**, 9-20 (IF 1,676; MNiSW 20)

O5 L.P. Haliński, A. Topolewska, A. Rynkowska, A. Mika, M. Urańska, M. Czerski, P. Stepnowski, Impact of plant domestication on selected nutrient and anti-nutrient compounds in Solanaceae with edible leaves (*Solanum* spp.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2019, **66**, 89-103 (IF 1,130; MNiSW 30)

O6 L.P. Haliński, M. Kalkowska, M. Kalkowski, J. Piorunowska, A. Topolewska, P. Stepnowski, Cuticular wax variation in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.), related wild species and their interspecific hybrids. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, **60**, 215-224 (IF 0,988; MNiSW 15)

O7 L.P. Haliński, P. Stepnowski, Cuticular hydrocarbons and sucrose esters as chemotaxonomic markers of wild and cultivated tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Phytochemistry*, 2016, **132**, 57-67 (IF 3,205; MNiSW 35)

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl siedmiu prac oryginalnych, w których jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Łączny *impact factor* czasopism, w których zostały opublikowane prace, wyniósł **13,713**, zaś łączna liczba punktów MNiSW **195** (według daty publikacji). Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia zostały zawarte w Załączniku nr 4, natomiast oświadczenia habilitanta i współautorów publikacji – w Załączniku nr 5.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Psiankowate (Solanaceae) stanowią różnorodną i bardzo liczną (9000-10000 gatunków) rodzinę roślin wyższych, której przedstawiciele mają często istotne znaczenie gospodarcze (pomidor, ziemniak, oberżyna, tytoń) (Knapp 2002). Blisko 2000 gatunków klasyfikowanych jest w kosmopolitycznym rodzaju psianka (*Solanum* L.), do którego należy większość roślin psiankowatych wykorzystywanych w rolnictwie. Całościowe opracowanie taksonomiczne tego rodzaju pochodzi z połowy XIX wieku, bardziej współczesne badania dotyczą raczej zależności w obrębie rodzaju. Pomimo zastosowania zarówno klasycznej klasyfikacji, opartej na cechach morfologicznych roślin, jak i bardziej nowoczesnych metod, stosujących w tym celu markery molekularne, pozycja taksonomiczna niektórych gatunków pozostaje nadal niejasna. Co więcej, pod znakiem zapytania stoi zarówno stopień odrębności niektórych taksonów, jak i poprawność identyfikacji wielu opisanych – i często dostępnych w kolekcjach nasion – roślin.

Prezentowany cykl publikacji poświęcony jest dwóm grupom istotnych gospodarczo gatunków roślin psiankowatych. Pierwsza z nich obejmuje oberżynę (*Solanum melongena* L.), szereg dzikich, spokrewnionych gatunków, a także afrykańskie psianki uprawiane dla jadalnych liści: bakłazana gboma (*S. macrocarpon* L.) i bakłazana szkarłatnego

(*S. aethiopicum* L.) wraz z dzikimi przodkami, odpowiednio *S. dasyphyllum* Schum. and Thonn. oraz *S. anguivi* Lam. Druga grupa tworzona jest przez pomidora jadalnego (*S. lycopersicum* L.) wraz z szeregiem gatunków spokrewnionych (*S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *S. chilense* (Dunal) Reiche, *S. peruvianum* L. i *S. arcanum* Peralta) oraz dziki, zróżnicowany genetycznie i wykazujący odporność na stres abiotyczny i biotyczny gatunek *S. pennellii* Correl. W obu tych grupach, pomimo licznych prac opartych zarówno na morfologii roślin, jak i wybranych markerach molekularnych, wciąż pozostają do wyjaśnienia nieścisłości związane z pozycją taksonomiczną niektórych gatunków. Jednocześnie, w obu przypadkach dzikie gatunki są uważane za potencjalne źródło odporności lub tolerancji na stres abiotyczny (niedobór wody, zasolenie gleby) oraz żerowanie owadów i infekcje patogenów (Collonier i in. 2001; Simmons i Gurr 2005). Stąd, zainteresowanie wyżej wymienionymi gatunkami roślin ma znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne.

Wątpliwości w obrębie grupy tworzony przez oberżynę i spokrewnione gatunki dotyczą szeregu kwestii, poczynając od rzeczywistej przynależności gatunkowej dzikich/zdziczałych form oberżyny *S. melongena* subsp. *cumingii* (Dunal) J. Samuels (Mace i in. 1999; Samuels 2013a), poprzez wskazanie miejsca i czasu udomowienia oberżyny oraz sugerowanych dzikich przodków (Lester i Hasan 1991; Meyer i in. 2012; Samuels 2013b), aż po pozycję taksonomiczną dzikich i uprawnych psianek afrykańskich. Tradycyjnie, przez długi czas bakłazan gboma i jego dziki przodek były klasyfikowane razem z oberżyną w sekcji *Melongena*, zaś bakłazana szkarłatna oraz *S. anguivi* umieszczano w sekcji *Oliganthes* (Lester i Daunay 2001). Obecnie, oba kompleksy zazwyczaj uważa się za część zróżnicowanej grupy słabo rozpoznanych taksonów odrębnych od oberżyny (Vorontsova i in. 2013; Aubriot i in. 2016). Taksonomia podrodzaju *Leptostemonum*, do którego należą wszystkie omawiane rośliny, jest skomplikowana ze względu na znaczne zróżnicowanie morfologiczne niektórych taksonów, a także opisywanie poszczególnych gatunków pod wieloma synonimicznymi nazwami. Dla przykładu, gatunek *S. aethiopicum* jest dzielony na cztery grupy o bardzo zróżnicowanej morfologii oraz różnym zastosowaniu w rolnictwie. Rośliny należące do tych grup były w przeszłości opisywane jako przedstawiciele ponad 20 gatunków, mieszczących się w kilku rodzajach (Lester 1986). Nawet obecnie, prace taksonomiczne dotyczące tej grupy roślin są często oparte wyłącznie na danych morfologicznych, co znacząco wpływa na możliwość jednoznacznej identyfikacji

poszczególnych taksonów (Knapp i in. 2013). Dodatkowo, niejasny jest stopień udomowienia roślin uprawnych, tj. *S. aethiopicum* i *S. macrocarpon*. Choć morfologicznie różnią się one znacząco od swoich dzikich przodków, istnieją prace sugerujące brak istotnych różnic genetycznych pomiędzy gatunkami uprawnymi i dzikimi (Bukenya i Carasco 1994; Stedje i Bukenya-Ziraba 2003; Acquadro i in. 2017). Obecność w tkankach roślin psiankowatych glikoalkaloidów steroidowych o dość znacznej toksyczności jest powszechnie uznanym faktem (Mensinga i in. 2005). Często postulowanym mechanizmem selekcji w procesie udomowienia roślin uprawnych jest ograniczenie zawartości związków toksycznych, opisane także dla psiankowatych (Johns i Alonso 1990; Moreira i in. 2018). Zarówno bakłazan gboma, jak i bakłazan szkarłatny uprawiane są m. in. dla jadalnych liści, stąd oba gatunki mają duże znaczenie gospodarcze na kontynencie afrykańskim. Dlatego też, kluczowe z punktu widzenia bezpieczeństwa ich stosowania jest określenie, czy opisany mechanizm selekcji miał zastosowanie w przypadku omawianej grupy roślin.

Taksonomia dzikich i uprawnych pomidorów zmieniała się dość znacznie w czasie. Historycznie, ta grupa roślin była zazwyczaj klasyfikowana w odrębnym rodzaju *Lycopersicon*, choć bywała także umieszczana w rodzaju *Solanum* (Peralta i Spooner 2000). Nieco bardziej współcześnie, pomidory zostały sklasyfikowane jako przedstawiciele rodzaju *Solanum* (Child 1990). W kolejnych latach opisano szereg nowych gatunków w obrębie tej grupy roślin, po czym uściśleniu uległa obecnie uznawana taksonomia pomidorów (Peralta i in. 2008). Podstawowym punktem spornym w systematyce tej grupy roślin pozostaje pozycja odpornego na stres biotyczny i abiotyczny gatunku *S. pennellii*. Z jednej strony, krzyżuje się on bez większych przeszkód ze wszystkimi gatunkami należącymi do grupy *Lycopersicon* (Rick 1960; Bedinger i in. 2011). Jednakże, badania z zastosowaniem markerów molekularnych prowadziły w przeszłości do różnych wniosków na temat pokrewieństwa tego gatunku z innymi gatunkami pomidorów (Palmer i Zamir 1992; Marshall i in. 2001; Spooner i in. 2005; Zuriaga i in. 2009; The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium 2014). Niektórzy autorzy sugerowali wręcz znaczną odrębność *S. pennellii* od wszystkich pozostałych gatunków pomidorów (Alvarez i in. 2001; Dodsworth i in. 2016). Gatunek ten jest obiektem szczególnego zainteresowania ze względu na obecność na powierzchni części nadziemnych roślin owadobójczych estrów glukozy i sacharozy (Goffreda i in. 1990; Shapiro i in. 1994). Dlatego też, szczególnie istotne wydaje

się być określenie jego ścisłej pozycji taksonomicznej, ze szczególnym uwzględnieniem pokrewieństwa z pomidorem zwyczajnym.

Woski kutykularne lub powierzchniowe to skomplikowana mieszanina związków organicznych, występująca na powierzchni wszystkich niezdrewniałych organów nadziemnych roślin wyższych i pełniąca liczne funkcje obronne (Kerstiens 1996; Müller i Riederer 2005). Ze względu na powszechne występowanie oraz biosyntezę większości składników na dobrze poznanych szlakach metabolicznych (Kunst i Samuels 2003), można je traktować jako potencjalnie przydatne markery chemotaksonomiczne. Jako, że analizy oparte na morfologii oraz markerach molekularnych nie dały w wielu przypadkach jednoznacznych wyników na temat stopnia pokrewieństwa omawianych taksonów, pożądane jest uzyskanie dodatkowego zestawu danych, otrzymanych na podstawie zastosowania innych markerów. Składniki wosków kutykularnych były w przeszłości wykorzystywane jako markery chemotaksonomiczne w klasyfikacji roślin wyższych, włączając w to rośliny psiankowate (Zygadlo i in. 1994; Haliński i in. 2011; Da Silva i in. 2012). Biorąc powyższe pod uwagę, **jako główną hipotezę badawczą omawianego cyklu publikacji założono możliwość wykorzystania składników wosków kutykularnych jako markerów taksonomicznych, przydatnych w klasyfikacji badanych grup roślin**. Inne grupy metabolitów postanowiono zastosować także do oceny stopnia udomowienia psianek afrykańskich o jadalnych liściach.

Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

Cele podjętych badań obejmowały:

- a) **identyfikację składników wosków powierzchniowych badanych roślin jako potencjalnych markerów chemotaksonomicznych** i ocenę zmienności składu chemicznego wosków z uwzględnieniem wpływu na ten skład warunków zewnętrznych,
- b) **opartą na cechach chemicznych klasyfikację dwóch grup dzikich i uprawnych gatunków roślin psiankowatych**: (1) oberżyny (*S. melongena*), kompleksów bakłażana szkarłatnego (*S. aethiopicum*) oraz bakłażana gboma (*S. macrocarpon*) i dzikich gatunków pokrewnych; oraz (2) pomidora jadalnego (*S. lycopersicum*) i gatunków pokrewnych, ze

szczególным uwzględnieniem odpornego na stres abiotyczny i biotyczny gatunku *S. pennellii*,

c) zastosowanie profilu wybranych grup metabolitów pierwotnych i wtórnych do **oszacowania stopnia udomowienia** (tu rozumianego jako odmienność od dzikich gatunków spokrewnionych) szeregu nowych afrykańskich roślin uprawnych z rodzaju *Solanum* L.

Identyfikacja markerów chemotaksonomicznych oraz klasyfikacja oberżyny (*Solanum melongena*) i gatunków pokrewnych [O1-O3]

Zastosowanie składników wosków powierzchniowych w badaniach chemotaksonomicznych tzw. "kolczastych psianek" było już wcześniej opisywane w literaturze (Zygadlo i in. 1994; Haliński i in. 2011; Da Silva i in. 2012). Prace te nie miały jednak na celu zbadania użyteczności w określeniu przynależności systematycznej taksonów o wątpliwej pozycji, a jedynie próbę zastosowania produkowanych przez rośliny metabolitów wtórnych jako markerów przydatnych w badaniach tego typu. Celem prac **O1-O3** była zatem identyfikacja składników wosków kutykularnych afrykańskiego bakłazana gboma (*Solanum macrocarpon*) i ocena stabilności tych markerów pomiędzy odmianami (**O1**), następnie próba oszacowania wpływu stresu abiotycznego na skład wosków powierzchniowych oberżyny (*S. melongena*) jako gatunku modelowego w badanej grupie roślin (**O2**), wreszcie zaś wyselekcjonowanie markerów o najwyższej stabilności i wykorzystanie ich w analizie chemotaksonomicznej szeregu taksonów o niepewnej pozycji w obrębie rodzaju *Solanum* (**O3**). W szczególności dotyczyło to dwóch gatunków afrykańskich psianek, znajdujących się na wczesnym etapie udomowienia: bakłazana gboma oraz bakłazana szkarłatnego (*S. aethiopicum*), wraz z gatunkami uważanymi za dzikich przodków tych roślin (odpowiednio, *S. dasyphyllum* Schum. & Thonn. oraz *S. anguivi* Lam.). Dodatkowo, zakładano możliwość wykorzystania markerów chemotaksonomicznych w celu identyfikacji dzikich/zdziczałych form oberżyny, klasyfikowanych dotąd w obrębie kilku odrębnych taksonów, zazwyczaj jedynie na podstawie cech morfologicznych.

Kompleksowa i wnikliwa analiza chemiczna wosków powierzchniowych liści bakłazana gboma (pozycja **O1**) wykazała, że skład lipidów kutykularnych różni się znacząco od składu

wosków pokrywających liście innych uprawnych gatunków z rodzaju *Solanum*, w tym ziemniaka jadalnego (*S. tuberosum* L.) oraz bliżej spokrewnionej oberżyny (Szafranek i Synak 2006; Haliński i in. 2009). Przede wszystkim, dominujące w składzie wosków obu wspomnianych gatunków roślin węglowodory, które stanowiły tam 70-82% całkowitej masy wosków, w przypadku bakłażana gboma były nadal główną frakcją lipidów powierzchniowych, ale ich udział wynosił zaledwie 47-56%. Łączna ilość wosków kutykularnych także była niższa, nie przekraczając $3 \mu\text{g cm}^{-2}$ powierzchni liścia, co było wartością ok. dwukrotnie niższą, niż w przypadku większości odmian ziemniaka (Szafranek i Synak 2006), oraz prawie sześciokrotnie niższą, niż stwierdzono dla oberżyny (Haliński i in. 2009). Pozostałe różnice dotyczyły głównie obecności związków cyklicznych: woski kutykularne liści *S. macrocarpon* zawierały 19-32% steroli. Według mojej wiedzy, tak wysoki udział tych substancji nie był wcześniej opisany dla lipidów powierzchniowych żadnego gatunku rośliny wyższej. Frakcja węglowodorów kutykularnych *S. macrocarpon* charakteryzowała się bardzo wysoką stabilnością składu chemicznego pomiędzy odmianami. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat wosków powierzchniowych oberżyny (Haliński i in. 2011). Podobnie, jak w cytowanym źródle, także i w przypadku *S. macrocarpon* kwasy tłuszczowe, triterpeny i sterole cechowała większa zmienność składu frakcji, zaś alkohole alifatyczne były reprezentowane zaledwie przez kilka związków dominujących we frakcji. Niska, łączna ilość wosków powierzchniowych oraz mniejszy niż u innych psiankowatych udział węglowodorów w ich składzie, zostały po raz pierwszy zaproponowane jako cechy, które były uważane za korzystne w procesie selekcji bakłażana gboma w trakcie jego udomowienia. W odróżnieniu od większości gatunków uprawnych roślin psiankowatych, *S. macrocarpon* jest bowiem rośliną o jadalnych liściach.

Oberżyna, jako gatunek udomowiony w stosunkowo odległej przeszłości (Meyer i in. 2012; Aubriot i in. 2018), zróżnicowany morfologicznie (Kumar i in. 2008), ale jednolity genetycznie (Ali i in. 2011), a jednocześnie stosunkowo odporny na umiarkowany niedobór wody (Behboudian 1977), został zastosowany jako gatunek modelowy w badanej grupie spokrewnionych roślin, w celu określenia wpływu stresu abiotycznego na skład wosków powierzchniowych (pozycja **O2**). Pozostałe przewidziane do analiz taksonomicznych rośliny są bardziej zróżnicowane genetycznie, a jednocześnie lepiej przystosowane do trudnych warunków środowiskowych, przez co przewidywalny efekt stresu związanego

z niedoborem wody byłby mniejszy (Lester i Daunay 2001). Niedobór wody wpłynął negatywnie na średnią powierzchnię liścia, jednocześnie jednak nie zmienił w sposób statystycznie istotny ilości wosków powierzchniowych, wyrażanej w jednostce masy na jednostkę powierzchni liścia. Zaobserwowano znaczną zmienność w całkowitej ilości lipidów powierzchniowych pomiędzy osobnikami, która była większa w roślinach narażonych na niedobór wody. Węglowodory kutykularne, w skład których wchodziły *n*-alkany, 2-metyloalkany oraz 3-metyloalkany, wykazały bardzo wysoką stabilność względnego składu frakcji, wyrażoną niskim zróżnicowaniem wartości średniej długości łańcucha alifatycznego (ACL), obliczonych według następującego wzoru:

$$ACL = \frac{\sum \%C_n \times n}{100}$$

gdzie: *n* – liczba atomów węgla w łańcuchu, $\%C_n$ – udział procentowy związku o *n* atomach węgla w składzie frakcji. Kwasy tłuszczowe oraz alkohole alifatyczne wykazały znacznie większą zmienność. Wśród związków cyklicznych, triterpeny charakteryzowały się względnie stałym składem frakcji, ale występowały w niewielkich ilościach, natomiast skład frakcji steroli zmieniał się w sposób statystycznie istotny pomiędzy grupą kontrolną i grupą poddaną stresowi. W tej drugiej zaobserwowano wyższą zawartość cholesterolu, natomiast niższą – stigmasterolu i β -sitosterolu. Jest to jedno z nielicznych doniesień, w których cholesterol stanowił jeden z dominujących składników frakcji steroli w woskach powierzchniowych roślin. Uzyskane wyniki są zbieżne z wcześniejszym doniesieniem, według którego węglowodory w woskach kutykularnych oberżyny cechowała najwyższa stabilność składu zarówno w obrębie pojedynczej odmiany pomiędzy sezonami wegetacyjnymi, jak i pomiędzy odmianami (Haliński i in. 2011). Zmiany zaobserwowane w składzie wosków powierzchniowych, wywołane niedoborem wody, są odmienne od zazwyczaj obserwowanych: zwiększenie lub zmniejszenie ilości węglowodórów, a także zwiększenie długości łańcucha węglowego, są stosunkowo najczęściej notowanymi efektami stresu wodnego (Shepherd i Griffiths 2006). Uzyskane wyniki wskazują jednak, że w przypadku oberżyny (i prawdopodobnie także spokrewnionych gatunków) zjawisko to nie ma miejsca, co czyni węglowodory kutykularne potencjalnie przydatnymi markerami chemotaksonomicznymi.

Na podstawie wyników opisanych w pozycjach **O1-O2**, podjęto próbę klasyfikacji grupy gatunków spokrewnionych z oberżyną na podstawie profilu węglowodorów kutykularnych (pozycja **O3**). Badania oparto na względnym składzie frakcji węglowodorów, stosując jako markery *n*-alkany, 2-metyloalkany oraz 3-metyloalkany, oznaczone ilościowo w ekstraktach uzyskanych ze świeżego materiału roślinnego, pobranego od roślin uprawianych w porównywalnych, pół-naturalnych warunkach. Chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) została zastosowana jako technika analiz ilościowych, zaś identyfikacji związków dokonano na podstawie eksperymentów z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). W badaniach wykorzystano nasiona, pozyskane od podmiotów komercyjnych (oberżyna) oraz z uznanych banków nasion (oberżyna i pozostałe gatunki; World Vegetable Center, Tainan, Tajwan; Center for Genetic Resources, Wageningen, Holandia). Weryfikacja przynależności gatunkowej roślin, zadeklarowanej przez dostawców nasion, była oparta na cechach morfologicznych. Dokonał jej dr John Samuels, specjalizujący się w taksonomii oberżyny i gatunków pokrewnych. Badane taksony obejmowały: oberżynę *S. melongena*; grupę dzikich gatunków o bliskim pokrewieństwie, obejmującą *S. campylacanthum* Hochst. ex A. Rich., *S. capsicoides* All., *S. linnaeanum* Hepper & P.-M.L. Jaeger oraz *S. violaceum* Ortega; kompleksy afrykańskich psianek – bakłazana gboma (*S. macrocarpon* – *S. dasyphyllum*) i bakłazana szkarłatnego (*S. aethiopicum* – *S. anguivi*); oraz ziemniaka jadalnego *S. tuberosum* jako grupę zewnętrzną. Uzyskane wyniki analiz ilościowych zostały poddane obróbce przy zastosowaniu wielowymiarowych technik analizy danych, w tym analizy skupień (HCA) z wielokrotnym losowaniem ze zwracaniem z próby, dwuwymiarowej analizy skupień oraz analizy głównych składowych (PCA).

Uzyskane w pracy **O3** wyniki pozwoliły na jednoznaczne oddzielenie 15 badanych linii oberżyny oraz spokrewnionych gatunków dzikich (*S. campylacanthum*, *S. capsicoides*) od pozostałych taksonów. Odmiany zaawansowane i lokalne oberżyny nie różniły się od siebie w zauważalny sposób. Profil węglowodorów pozwolił także na wydzielenie w osobnych grupach obu kompleksów afrykańskich psianek, wskazując jednocześnie na ich stosunkowo bliskie pokrewieństwo z *S. linnaeanum* i *S. violaceum*. Co najważniejsze, uzyskana klasyfikacja pozwoliła na sformułowanie wniosków w zakresie wszystkich wymienionych we wprowadzeniu kwestii spornych w taksonomii tej grupy roślin. Po pierwsze, wykazano brak odmienności odrębnej morfologicznie dzikiej formy oberżyny (*S. melongena* subsp.

cumingii (Dunal) J. Samuels.) od odmian uprawnych tej rośliny. Po drugie, dostarczono dowodów na brak zróżnicowania pomiędzy gatunkami dzikimi oraz formami uprawnymi w kompleksach bakłażana szkarłatnego i bakłażana gboma, co było już postulowane przez innych autorów na podstawie analiz morfologicznych oraz przy zastosowaniu markerów molekularnych (Bukenya i Carasco 1994; Stedje i Bukenya-Ziraba 2003; Acquadro i in. 2017). Po trzecie, potwierdzono postulowane w najnowszych źródłach bliskie pokrewieństwo pomiędzy kompleksami bakłażana gboma i bakłażana szkarłatnego (Vorontsova i in. 2013; Aubriot i in. 2016). Wszystko to sugeruje dużą przydatność węglowodorów kutykularnych jako markerów taksonomicznych w omawianej grupie roślin. Analizy chemotaksonomiczne mogą zatem stanowić cenne uzupełnienie badań opartych na morfologii roślin oraz markerach molekularnych, przy zachowaniu stosunkowo niskich kosztów jednostkowych w porównaniu z technikami biologii molekularnej.

Ocena stopnia udomowienia afrykańskich psianek o jadalnych liściach na podstawie profilu metabolitów pierwotnych i wtórnych [O4-O5]

Bakłazan szkarłatny oraz bakłazan gboma są istotnymi roślinami uprawnymi w wielu krajach afrykańskich, uprawianymi zarówno dla owoców, jak i jadalnych liści, co czyni je nietypowymi przedstawicielami wykorzystywanych gospodarczo roślin psiankowatych. Jak wspomniano już w poprzednim rozdziale, znane są także dzikie formy obu gatunków, klasyfikowane jako odrębne gatunki, choć genetycznie nie są istotnie odmienne od form uprawnych. Konsumpcja zielonych warzyw liściastych w krajach afrykańskich, włączając w to bakłażana gboma, jest postrzegana jako czynność wzbogacająca dietę w witaminy A i C oraz mikroelementy (Uusiku i in. 2010), została też opisana jako czynnik sprzyjający zapobieganiu anemii oraz niedoborom witaminy A u dzieci (Egbi i in. 2018) oraz zapobiegający rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych (Ogunsuyi i in. 2018). Wiedza na temat wartości odżywczych liści obu gatunków bakłażana jest wciąż fragmentaryczna. Dla bakłażana gboma opisano m.in. stosunkowo wysoką zawartość związków fenolowych (Obloh i Akindahunsi 2004), a także ogólną zawartość białka, tłuszczu, błonnika oraz wybranych mikroelementów i związków antyodżywczych (Obloh i in. 2005). W obu przypadkach oceniono także wpływ obróbki na wymienione wartości. Wskazano także na potencjalne ryzyko spożywania liści *S. macrocarpon* w formie nieprzetworzonej (Obloh

2005), nie identyfikując jednak substancji za to odpowiedzialnych. W zakresie bardziej szczegółowych analiz, dostępne są wyniki opisujące skład i zawartość kwasów tłuszczowych, aminokwasów oraz wybranych mikroelementów (Glew i in. 2010). Brak analogicznych doniesień na temat liści bakłażana szkarłatnego, które byłyby opublikowane w zaufanych źródłach. Jednocześnie, w przypadku obu gatunków nie opisano zawartości potencjalnie toksycznych glikoalkaloidów steroidowych w liściach, chociaż wiadomo, że związki te występują w owocach bakłażana szkarłatnego i bakłażana gboma w znacznych ilościach, szczególnie w przypadku *S. macrocarpon* (Sánchez-Mata i in. 2010). W związku z powyższym, celem prac **O4-O5** była wstępna identyfikacja wybranych grup metabolitów pierwotnych i wtórnych w liściach bardziej rozpowszechnionego jako warzywo liściaste bakłażana gboma, a następnie próba oceny, czy proces udomowienia doprowadził do podwyższenia zawartości związków odżywczych oraz obniżenia stężenia substancji toksycznych.

Analiza chemiczna kwasów tłuszczowych i steroli w formie wolnej oraz związanej oraz oznaczenie zawartości glikoalkaloidów w liściach *S. macrocarpon*, a także oszacowanie wpływu obróbki termicznej na skład chemiczny liści, zostały opisane w pozycji **O4**. Łączna zawartość kwasów tłuszczowych była znacznie wyższa, niż raportowana wcześniej (Glew i in. 2010), osiągając wartości nawet do ok. 32 mg g⁻¹ suchej masy materiału roślinnego po obróbce termicznej, co czyni *S. macrocarpon* potencjalnie bogatym źródłem tych związków. Dodatkowo, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, dominującymi związkami były wielonienasycone kwasy tłuszczowe 18:2 i 18:3, a ich łączny wkład w skład frakcji wynosił 64-69%. Również zawartość steroli była znaczna, osiągając wartości 3-4 mg g⁻¹ suchej masy materiału roślinnego, podczas gdy raportowane dla wielu różnych warzyw wartości wahały się w granicach 0,6-4,1 mg g⁻¹ suchej masy, z najwyższą zawartością stwierdzoną dla kalafiora i brokułów (Piironen i in. 2003). Podobnie, jak w większości z warzyw analizowanych w cytowanej pracy, głównym składnikiem frakcji w liściach bakłażana gboma był β -sitosterol, stanowiący 35-38% całkowitych steroli. Zawartość glikoalkaloidów, które nie zostały jednak w pełni zidentyfikowane, przekroczyła uważaną za bezpieczną dawkę 200 mg kg⁻¹ świeżej masy żywności, wyznaczoną dla związków obecnych w ziemniakach (Mensinga i in. 2005). Krótkotrwała obróbka termiczna w sposób statystycznie istotny obniżyła jednak ich poziom do 91-157 mg kg⁻¹ świeżej masy. Przedstawione wyniki wykazały wstępnie, że – pomimo stosunkowo niedawnego

udomowienia – poziom wybranych składników pożądaných jest w liściach *S. macrocarpon* wysoki i porównywalny z warzywami o najwyższej zawartości kwasów tłuszczowych oraz steroli. Jednocześnie jednak, zawartość potencjalnie toksycznych związków obronnych jest wysoka, co wymaga ostrożności przy spożyciu, szczególnie jeśli nie jest stosowana obróbka termiczna. Może to wyjaśniać raportowany wcześniej, niekorzystny wpływ diety zawierającej nieprzetworzone liście *S. macrocarpon* na gryzonie (Oboh 2005).

Biorąc pod uwagę zarówno doniesienia zawarte w literaturze, jak i wyniki uzyskane w pracy **O4**, podjęto próbę oceny stopnia udomowienia czterech linii *S. macrocarpon* oraz pięciu linii *S. aethiopicum* (grupy *Aculeatum*, *Kumba* i *Gilo*), porównując profile wybranych metabolitów pierwotnych i wtórnych zawartych w liściach tych roślin oraz ich dzikich przodków *S. dasyphyllum* i *S. anguivi*. W przypadku bakłażana gboma, analizie poddano także linię należącą do odmiany *sapinii*, której pozycja taksonomiczna nie jest w pełni jasna, ale sugerowane było, że rośliny tego typu są mieszańcami pomiędzy uprawną formą *S. macrocarpon* i dziką rośliną *S. dasyphyllum* (Bukenya i Carasco 1994). Dodatkowo, do zbioru badanych roślin dodano także dwie linie *S. scabrum* Mill., jako przykład psianki nieco bardziej odległej taksonomicznie (Lester i Daunay 2001), której formy uprawne są praktycznie nieodróżnialne od form dzikich zarówno morfologicznie, jak i genetycznie, a która jest również wykorzystywana jako źródło jadalnych liści (Manoko i in. 2008). Sugeruje to bardzo wczesny etap procesu udomowienia, nawet w porównaniu z innymi afrykańskimi psiankami, u których notuje się różnice w morfologii form dzikich oraz uprawnych, choć we wszystkich przypadkach nie sposób wskazać choćby przybliżony czas rozpoczęcia tego procesu. Wszystkie zastosowane w pracy **O5** rośliny pochodziły z kolekcji Center for Genetic Resources (Wageningen, Holandia) i były uprawiane w warunkach szklarniowych od nasion. Grupa badanych metabolitów obejmowała: kwasy tłuszczowe, sterole, związki fenolowe (w tym wyznaczenie ich zdolności przeciwutleniających), a także glikoalkaloidy steroidowe oraz saponiny.

Mechanizmy selekcji roślin uprawnych w procesie udomowienia można podzielić na świadome (*conscious*), które wynikają z celowego wyboru określonych pożądaných cech, oraz nieświadome (*unconscious*), które są efektem przeniesienia roślin dzikich do środowiska utrzymywanego przez człowieka oraz następującej utraty cech niepotrzebnych w nowym środowisku (Heiser 1988; Zohary 2004). Hipotetyczne świadome mechanizmy

selekcji w przypadku omawianych roślin obejmują: selekcję w kierunku wyższej wartości odżywczej, niższej zawartości związków gorzkich i trujących oraz utraty mechanicznych form obrony (włosków oraz kolców). Wszystkie wymienione mechanizmy powinny być bardziej nasilone w przypadku roślin uprawianych dla jadalnych liści. Uzyskane wyniki wskazują, że zawartość związków pożądaných (kwasów tłuszczowych, steroli, związków fenolowych) utrzymuje się na podobnym poziomie w liściach roślin dzikich i uprawnych, a także w liniach o jadalnych i niejadalnych liściach. Co więcej, w przypadku nienasyconych kwasów tłuszczowych w kompleksie bakłazana szkarłatnego, wyższą zawartość tych substancji stwierdzono w liściach roślin dzikich. Porównanie pomiędzy kompleksami bakłazana szkarłatnego i bakłazana gboma sugeruje, że rośliny należące do tego pierwszego są bogatszym źródłem związków fenolowych. Jednocześnie jednak, zawierają także większe ilości związków potencjalnie szkodliwych. W liściach bakłazana gboma oraz jego dzikiego przodka wykryto umiarkowane ilości glikoalkaloidów zawierających aglikon solasodynę; formy dzikie i uprawne nie różniły się w tej kwestii w sposób istotny, natomiast postulowana forma mieszańcowa *S. macrocarpon* var. *sapinii* jako jedyna zawierała potencjalnie niebezpieczną dawkę glikoalkaloidów. Liście *S. aethiopicum* i *S. anguivi* zawierały znaczne, choć bardzo zmienne, ilości saponin o strukturze opartej na diosgeninie. Obniżenie zawartości związków obronnych było już postulowane jako cecha charakterystyczna dla roślin udomowionych (Moreira i in. 2018), a w przypadku roślin psiankowatych zostało potwierdzone dla ziemniaka jadalnego i dzikich gatunków spokrewnionych (Johns i Alonso 1990). W przypadku badanych roślin, podobne zjawisko nie zostało zanotowane, a jedynym mechanizmem świadomej selekcji wydaje się być redukcja mechanicznych środków obrony, przede wszystkim kolców, co było już opisane dla innych gatunków roślin psiankowatych (Heiser 1988). Może to potwierdzać, że oba gatunki bakłazana znajdują się wciąż na wczesnym etapie udomowienia. W przypadku odrębnego gatunku *S. scabrum*, stwierdzono niską zawartość związków odżywczych (w szczególności kwasów tłuszczowych) oraz bardzo wysokie stężenie saponin o strukturze opartej na tigogeninie, co jest zgodne z niedawno opublikowanym doniesieniem (Yuan i in. 2018). Potwierdza to wcześniej postulowany, bardzo wczesny etap udomowienia tego gatunku (Manoko i in. 2008). Prezentowane wyniki są jedną z pierwszych prób oceny stopnia udomowienia roślin o jadalnych liściach, jednocześnie wskazują też, że takie

podejście może być przydatne w identyfikacji roślin, u których świadome mechanizmy selekcji nie są jeszcze dominujące.

Klasyfikacja pomidora jadalnego (*S. lycopersicum*) i gatunków pokrewnych na podstawie analiz chemotaksonomicznych [O6-O7]

Analogicznie do omówionego wcześniej zastosowania składników wosków kutykularnych jako markerów chemotaksonomicznych w klasyfikacji oberżyny i gatunków pokrewnych, w pracach **O6-O7** podjęto próbę oszacowania przydatności tych związków jako markerów taksonomicznych pomidora zwyczajnego oraz dzikich gatunków spokrewnionych, ze szczególnym uwzględnieniem odpornego na stres abiotyczny gatunku *S. pennellii* (Corell) D'Arcy. W pracy **O6** oszacowano zmienność w zawartości i składzie poszczególnych frakcji wosków powierzchniowych, w obrębie pojedynczej odmiany oraz w obrębie gatunku. Podobnie, jak w przypadku oberżyny, główną i jednocześnie najbardziej stabilną frakcją wosków stanowiły węglowodory. Skład chemiczny frakcji był zbliżony do raportowanego wcześniej (Smith i in. 1996), choć w cytowanej pracy wykryto znacznie mniejszą liczbę związków. Zróznicowanie w składzie frakcji, które znalazło odzwierciedlenie w różnicach w wartościach średniej długości łańcucha węglowego (ACL), było bardzo niskie w obrębie sześciu linii pomidora zwyczajnego, oraz umiarkowanie niskie wśród pięciu linii *S. pennellii*. Potwierdza to prawdopodobnie sugerowane od dawna, stosunkowo wysokie zróznicowanie genetyczne tego dzikiego gatunku (Rick i Tanksley 1981). Pozostałe frakcje wosków powierzchniowych wykazały wyższą zmienność, co sugeruje szczególną przydatność węglowodorów jako markerów taksonomicznych. Dodatkowo, poszczególne linie *S. pennellii* wykazały znacznie wyższą, całkowitą masę wosków powierzchniowych, co wiązało się zarówno z wyższą zawartością węglowodorów, jak i – w większości przypadków – steroli oraz kwasów tłuszczowych. W konsekwencji, ilość wosków na powierzchni liści *S. pennellii* mieściła się w zakresie 2,3-4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy, podczas gdy w przypadku pomidora zwyczajnego wartość ta wahała się w granicach 1,0-2,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy. Mieszaniec międzygatunkowy *S. lycopersicum* x *S. pennellii* charakteryzował się przejściową masą wosków (2,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy) oraz głównych ich składników. Potencjalnie interesujący był skład frakcji triterpenów: w woskach liści *S. lycopersicum* była zdominowana przez β -amyrynę, która nie została wykryta na powierzchni liści *S. pennellii*,

gdzie dominującym triterpenem był lupeol lub α -amyryna. Co ciekawe, triterpeny nie zostały wykryte w woskach pokrywających kutykulę owoców *S. pennellii*, a w przypadku pomidora zwyczajnego skład frakcji był wyraźnie odmienny, z dominującą δ -amyryną, na powierzchni liści obecna tylko w niewielkich ilościach (Yeats i in. 2012). Ze względu na niskie stężenia triterpenów, wykryte w woskach powierzchniowych liści, nie zdecydowano się na użycie ich jako markerów chemotaksonomicznych.

Na podstawie wyników uzyskanych w pracy **O6**, profil węglowodorów kutykularnych został zastosowany do klasyfikacji 27 linii pomidorów, należących do siedmiu gatunków (pozycja **O7**). Analizie poddano skład frakcji węglowodorów 11 linii z grupy *Lycopersicon* (siedem linii *S. lycopersicum*, trzy linie *S. pimpinellifolium* oraz jedna linia *S. cheesmaniae*), 4 linii należących do grup *Eriopersicon* i *Arcanum* (jedna linia *S. chilense*, dwie linie *S. peruvianum* oraz jedna linia *S. arcanum*), 10 linii należącego do grupy *Neolycopersicon* gatunku *S. pennellii* oraz dwóch mieszańców międzygatunkowych (*S. lycopersicum* \times *S. pennellii* oraz *S. lycopersicum* \times *S. pimpinellifolium*). Głównym celem pracy było uszczegółowienie pozycji taksonomicznej *S. pennellii*, w którego przypadku – jako dodatkowe markery – zastosowane zostały wydzielane na powierzchnię rośliny estry sacharozy oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Zastosowane linie *S. pennellii* pochodziły z całego obszaru naturalnego występowania tego gatunku, tj. południowo-zachodniego Peru (Rick i Tanksley 1981). Rośliny były uprawiane w warunkach szklarniowych, z nasion pochodzących z kolekcji Tomato Genetics Resource Center (TGRC, Davis, USA) oraz Center for Genetic Resources (Wageningen, Holandia). Węglowodory były analizowane tak, jak opisano wcześniej dla pozycji **O3**, natomiast profile estrów sacharozy uzyskano za pomocą techniki spektrometrii mas z analizatorem czasu przelotu oraz jonizacją techniką desorpcji laserowej z udziałem matrycy (MALDI-TOF MS). Uzyskane wyniki analiz ilościowych zostały poddane obróbce przy zastosowaniu wielowymiarowych technik analizy danych: analizy skupień z wielokrotnym losowaniem ze zwracaniem z próby oraz analizy głównych składowych.

Uzyskane wyniki wykazały stosunkowo niewielką przydatność w klasyfikacji gatunków o czerwonych (grupa *Lycopersicon*) i zielonych owocach (grupy *Eriopersicon* oraz *Arcanum*). Wszystkie wyżej wymienione taksony tworzyły luźne skupienie, utworzone ze względu na wysoką zawartość *n*-alkanów o 30-32 atomach węgla w łańcuchu, a linie

pomidora zwyczajnego były tylko nieznacznie oddzielone od gatunków z grup *Arcanum* oraz *Eriopersicon*. Znacznie bardziej interesująco kształtowała się klasyfikacja linii *S. pennellii*. Na podstawie wyników wydzielić można było trzy chemotypy tego gatunku: jeden charakteryzował się bardzo wysoką zawartością 2-metyloalkanów (ok. 41% wszystkich węglowodorów), drugi – nadreprezentacją 3-metyloalkanów (ok. 18% frakcji), ostatni zaś wykazywał profil węglowodorów zbliżony do roślin z grupy *Lycopersicon* i przy zastosowaniu węglowodorów jako jedynych markerów był grupowany razem z nimi. Co ciekawe, typ trzeci obejmował głównie linie należące do odmiany *S. pennellii* var. *puberulum*, charakteryzujące się zredukowaną liczbą włosków wydzielniczych oraz minimalną produkcją estrów glukozy i sacharozy (Shapiro i in. 1994), a także mieszańca międzygatunkowego *S. lycopersicum* x *S. pennellii*. Każdy z wydzielonych typów *S. pennellii* charakteryzował się także odmiennym profilem estrów sacharozy, przy czym rośliny z trzeciej grupy wykazywały najmniej spójny profil, w przypadku mieszańca międzygatunkowego silnie zaburzony i zdominowany przez związki o określonej masie cząsteczkowej. Dołączenie estrów sacharozy do użytego zestawu markerów pozwoliło na wyraźniejsze oddzielenie *S. pennellii* od pozostałych gatunków, nie zaburzając przy tym klasyfikacji. Na podstawie wyników zasugerowano, że linie *S. pennellii* var. *puberulum*, wykazujące znaczne podobieństwo do badanego mieszańca, mogą być pozostałością po – dość odległej w czasie – hybrydyzacji pomiędzy *S. pennellii* a jednym z gatunków należących do grupy *Lycopersicon*. Choć nie można tego potwierdzić na podstawie dotychczas uzyskanych wyników, otwiera się w ten sposób nowy temat badawczy, mogący w przyszłości wyjaśnić bardziej szczegółowo zróżnicowanie w obrębie gatunku *S. pennellii* oraz ułatwić prace nad uzyskaniem przydatnych gospodarczo linii mieszańcowych, wykazujących znaczną odporność na stres biotyczny i abiotyczny. Hybrydyzację pomiędzy *S. lycopersicum* i *S. pimpinellifolium* sugerowano w przeszłości jako źródło pochodzenia niektórych linii dzikiej formy pomidora zwyczajnego *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Ranc i in. 2008).

Podsumowanie

Pomimo znaczącego rozwoju technik biologii molekularnej, które zostały włączone do badań taksonomicznych i w znacznej mierze wyparły standardowe podejście, oparte na

budowie morfologicznej roślin, przynależność taksonomiczna wielu, szczególnie dzikich oraz silnie zróżnicowanych taksonów, pozostaje niejasna. Opisany w powyższych rozdziałach cykl publikacji dokumentuje próbę uzupełnienia wiedzy na temat klasyfikacji wybranych grup roślin psiankowatych, stosując podejście chemotaksonomiczne, w którym markerami są składniki wosków kutykularnych. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zarówno w przypadku oberżyny oraz gatunków spokrewnionych, jak i wśród uprawnych oraz dzikich gatunków pomidora, składnikami lipidów powierzchniowych o najbardziej stabilnym składzie są węglowodory. Frakcja ta nie wykazuje znaczących zmian w profilu pomiędzy osobnikami tej samej linii roślin oraz pomiędzy różnymi liniami większości badanych gatunków, a także nie jest – przynajmniej w przypadku *S. melongena* – podatna na zmiany w składzie pod wpływem działania czynników zewnętrznych. Następnie, pomyślnie zastosowano profile węglowodorów kutykularnych do klasyfikacji szeregu problematycznych taksonów w obrębie obu badanych grup roślin, a na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące główne wnioski:

- Podejście chemotaksonomiczne pozwala na potwierdzenie braku istotnych różnic pomiędzy odmianami zaawansowanymi, liniami lokalnymi oraz formami dzikimi oberżyny (*S. melongena*)
- Kompleksy afrykańskich psianek o jadalnych liściach – bakłażana szkarłatnego (*S. aethiopicum*) oraz bakłażana gboma (*S. macrocarpon*) są wyraźnie odmienne od oberżyny, a taksony uznawane za dzikich przodków obu gatunków uprawnych są w istocie ich formami dzikimi, odmiennymi jedynie morfologicznie; wnioski te są zgodne z najnowszymi doniesieniami na temat taksonomii tej grupy roślin (Vorontsova i in. 2013; Aubriot i in. 2016)
- Profil węglowodorów kutykularnych nie pozwala na jasne rozróżnienie uprawnych i dzikich form pomidora zwyczajnego (*S. lycopersicum*) oraz najbliżej spokrewnionych gatunków dzikich, pozwala natomiast na wyraźne wydzielenie trzech odmiennych chemotypów dzikiego, zróżnicowanego genetycznie gatunku *S. pennellii*
- Jeden z chemotypów *S. pennellii* został po raz pierwszy zaproponowany jako powstały na drodze hybrydyzacji z bliżej nieokreślonym gatunkiem pomidora

z grupy *Lycopersicon*, ale potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga dodatkowych badań

Dodatkowo, dla afrykańskich psianek spokrewnionych z oberżyną oceniono zawartość wybranych związków odżywczych (kwasy tłuszczowe, sterole), pożądaných w diecie (związki fenolowe) oraz potencjalnie toksycznych (glikoalkaloidy, saponiny). Na podstawie porównania zawartości tych substancji w roślinach dzikich i uprawnych oraz tych o liściach jadalnych i niejadalnych stwierdzono, że mechanizmy selekcji w tej grupie roślin są na razie przede wszystkim nieświadome, a dobór świadomy dotyczy jedynie cech morfologicznych, tj. zaniku w formach uprawnych kolców oraz włosków na powierzchni liści i łodyg. Potwierdza to przypuszczenie o niedawnym udomowieniu omawianych gatunków, a także zwraca uwagę na potencjalne ryzyko, związane z obecnością znacznych ilości związków toksycznych w częściach zielonych roślin uprawnych.

Kierunki i perspektywy dalszych badań

Wyniki, uzyskane podczas realizacji eksperymentów opisanych w pracach **O1-O7**, jednoznacznie wskazały dalszy kierunek badań w zakresie omawianych grup roślin. Niewątpliwie, na szczególną uwagę zasługuje możliwość różnicowania chemotypów odpornego gatunku *S. pennellii* na podstawie zmian w profilach wybranych metabolitów. Uzyskane w ostatnim czasie i jeszcze nieopublikowane wyniki wskazują, że gatunek ten jest zdolny do biosyntezy mieszaniny glikoalkaloidów steroidowych o wyraźnie innym składzie, niż pozostałe gatunki pomidora, a różnice uzyskane w ich profilu dla poszczególnych grup roślin pokrywają się z opisanymi powyżej dla węglowodorów kutykularnych oraz estrów sacharozy. Wzmacnia to tezę o możliwym hybrydowym pochodzeniu niektórych linii *S. pennellii*. W dalszej perspektywie, planowane jest zbadanie tego zjawiska na szerszą skalę, włączenie w plan eksperymentu drugiego silnie zróżnicowanego genetycznie gatunku, jakim jest *S. habrochaites* S. Knapp & D. M Spooner, a także – w miarę możliwości – próba określenia szczegółów szlaków, na których rośliny te syntezują aglikony glikoalkaloidów steroidowych. W zakresie psianek afrykańskich o jadalnych liściach, szczególnie interesujące jest obecnie pytanie, czy i w jakim zakresie świadoma selekcja obejmowała cechy inne, niż tylko ograniczenie środków obrony mechanicznej roślin. Badania są

kontynuowane we współpracy z doktorem Johnem Samuelsem, i pozwolą na ocenę zakresu mechanizmów selekcji świadomej, możliwych do zastosowania w warunkach lokalnego, stosunkowo prymitywnego rolnictwa, jakie dominowało w okresie udomowienia omawianych gatunków na obszarze ich występowania i uprawy.

Literatura

- Acquadro, A., Barchi, L., Gramazio, P., Portis, E., Vilanova, S., Comino, C., Plazas, M., Prohens, J., Lanteri, S. (2017) Coding SNPs analysis highlights genetic relationships and evolution pattern in eggplant complexes. *PLoS One* 12:e0180774.
- Ali, Z., Xu, Z.L., Zhang, D.Y., He, X.L., Bahadur, S., Yi, J.X. (2011) Molecular diversity analysis of eggplant (*Solanum melongena*) genetic resources. *Genet. Mol. Res.* 10:1141-1155.
- Alvarez, A.E., van de Wiel, C.C.M., Smulders, M.J.M., Vosman, B. (2001) Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 103:1283-1292.
- Aubriot, X., Singh, P., Knapp, S. (2016) Tropical Asian species show that the Old World clade of “spiny solanums” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum pro parte*: Solanaceae) is not monophyletic. *Bot. J. Linnean Soc.* 181:199-223.
- Aubriot, X., Knapp, S., Syfert, M.M., Poczai, P., Buerki, S. (2018) Shedding new light on the origin and spread of the brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Am. J. Bot.* 105:1175-1187.
- Bedinger, P.A., Chetelat, R.T., McClure, B., Moyle, L.C., Rose, J.K.C., Stack, S.M., van der Knaap, E., Baek, Y.S., Lopez-Casado, G., Covey, P.A., Kumar, A., Li, W., Nunez, R., Cruz-Garcia, F., Royer, S. (2011) Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod.* 24:171-187.
- Behboudian, M.H. (1977) Responses of eggplant to drought. I. Plant water balance. *Sci. Hortic.* 7:303-310.

- Bukenya, Z.R., Carasco, J.F. (1994) Biosystematic study of *Solanum macrocarpon* - *S. dasyphyllum* complex in Uganda and relations with *Solanum linnaeanum*. East Afr. Agric. For. J. 59:187-204
- Child, A. (1990) A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) (D'Arcy) (Tuberarium (Dun.) Bitter (s.l.)). Feddes Repert. 101:209-235.
- Collonnier C., Fock I., Kashyap V., Rotino G.L., Daunay M.C., Lian Y., Mariska I.K., Rajam M.V., Servaes A., Ducreux G., Sihachakr D. (2001) Applications of biotechnology in eggplant. Plant Cell Tiss. Org. 65:91-107.
- Da Silva, K.M.M., Agra, M.F., Dos Santos, D.Y.A.C., De Oliveira, A.F.M. (2012) Leaf cuticular alkanes of *Solanum* subg. *Leptostemonum* Dunal (Bitter) of some northeast Brazilian species: Composition and taxonomic significance. Biochem. Syst. Ecol. 44:48-52.
- Dodsworth, S., Chase, M.W., Särkinen, T., Knapp, S., Leitch, A.R. (2016) Using genomic repeats for phylogenomics: a case study in wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae). Biol. J. Linnean Soc. 117:96-105.
- Egbi, G., Gbogbo, S., Mensah, G.E., Glover-Amengor, M., Steiner-Asiedu, M. (2018). Effect of green leafy vegetables powder on anaemia and vitamin-A status of Ghanaian school children. BMC Nutr. 4:27.
- Glew, R.S., Amoako-Atta, B., Ankar-Brewoo, G., Presley, J., Chuang, L.T., Millson, M., Smith, B.R., Glew, R.H. (2010) Furthering an understanding of West African plant foods: Mineral, fatty acid and protein content of seven cultivated indigenous leafy vegetables of Ghana. Brit. Food J. 112:1102-1114.
- Goffreda, J.C., Steffens, J.C., Mutschler, M.A. (1990) Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids with wild tomato. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:161-165.
- Haliński, Ł.P., Szafranek, J., Stepnowski, P. (2011) Leaf cuticular *n*-alkanes as markers in the chemotaxonomy of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. Plant Biol. 13:932-939.

- Haliński, Ł.P., Szafranek, J., Szafranek, B.M., Gołębiowski, M., Stepnowski, P. (2009) Chromatographic fractionation and analysis of the main components of eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf cuticular waxes. *Acta Chromatogr.* 21:127-137.
- Heiser, C.B. (1988) Aspects of unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Euphytica* 37:77-81.
- Johns, T., Alonso, J.G. (1990) Glycoalkaloid change during the domestication of the potato, *Solanum* section *Petota*. *Euphytica* 50:203-210.
- Kerstiens, G. (1996) Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends Plant Sci.* 1:125-129.
- Knapp, S. (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* 53:2001-2022.
- Knapp, S., Vorontsova, M.S., Prohens, J. (2013) Wild relatives of the eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): new understanding of species names in a complex group. *PLOS One* 8:e57039.
- Kumar, G., Meena, B.L., Kar, R., Tiwari, S.K., Gangopadhyay, K.K., Bisht, I.S., Mahajan, R.K. (2008) Morphological diversity in brinjal (*Solanum melongena* L.) germplasm accessions. *Plant Genet. Resour.-Charact. Util.* 6:232-236.
- Kunst, L., Samuels, A.L. (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* 42:51-80.
- Lester, R.N. (1986) Taxonomy of scarlet eggplants, *Solanum aethiopicum* L. *Acta Hortic.* 182:125-132.
- Lester, R.N., Daunay, M.C. (2001) Diversity of African vegetable *Solanum* species and its implications for a better understanding of plant domestication. *Schriften Genet. Resourcen* 18:137-152.
- Lester, R.N., Hasan, S.M.Z. (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia, in: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M., Estrada N. (Eds), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, London, pp. 369-387.

- Mace, E.S., Lester, R.N., Gebhardt, C.G. (1999) AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.* 99:626-633.
- Manoko, M.L.K., van der Berg, R.G., Feron, R.M.C., van der Weerden, G.M., Marini, C. (2008) Genetic diversity of the African hexaploid species *Solanum scabrum* Mill. and *Solanum nigrum* L. (Solanaceae). *Genet. Resour. Crop Evol.* 55:409-418.
- Marshall, J.A., Knapp, S., Davey, M.R., Power, J.B., Cocking, E.C., Bennett, M.D., Cox, A.V. (2001) Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. *Theor. Appl. Genet.* 103:1216-1222.
- Mensinga, T.T., Sips, A.J.A.M., Rempelberg, C.J.M., van Twillert, K., Meulenbelt, J., van den Top, H.J., van Egmond, H.P. (2005) Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41:66-72
- Meyer, R.S., Karol, K.G., Little, D.P., Nee, M.H., Litt, A. (2012) Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63:685-701.
- Moreira, X., Abdala-Roberts, L., Gols, R., Francisco, M. (2018) Plant domestication decreases both constitutive and induced chemical defences by direct selection against defensive traits. *Sci. Rep.* 8:12678.
- Müller, C., Riederer, M. (2005) Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 31:2621-2651.
- Oboh, G. (2005) Nutritional and safety evaluation of some tropical green leafy vegetables. *J. Food. Technol.* 3:382-392.
- Oboh, G., Akindahunsi, A.A. (2004) Change in the ascorbic acid, total phenol and antioxidant activity of sun-dried commonly consumed green leafy vegetables in Nigeria. *Nutr. Health* 18:29-36.
- Oboh, G., Ekperigin, M.M., Kazeem, M.I. (2005) Nutritional and haemolytic properties of eggplants (*Solanum macrocarpon*) leaves. *J. Food. Compos. Anal.* 18:153-160.

- Ogonsuyi, O.B., Ademiluyi, A., Oboh, G., Oyeleye, S.I., Dada, A.F. (2018) Green leafy vegetables from two *Solanum* spp. (*Solanum nigrum* L and *Solanum macrocarpon* L) ameliorate scopolamine-induced cognitive and neurochemical impairments in rats. *Food Sci. Nutr.* 6:860-870.
- Palmer, J.D., Zamir, D. (1982) Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5006-5010.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M. (2000) Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28:45-54.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., Knapp, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, vol. 84. The American Society of Plant Taxonomists, Laramie.
- Piironen, V., Toivo, J., Puupponen-Pimiä, R., Lampi, A.-M. (2003) Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *J. Sci. Food Agric.* 83:330-337.
- Ranc, N., Muñoz, S., Santoni, S., Causse, M. (2008) A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (Solanaceae). *BMC Plant Biol.* 8:130.
- Rick, C.M. (1960) Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: phylogenetic and cytogenetic significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:78-82.
- Rick, C.M., Tanksley, S.D. (1981) Genetic variation in *Solanum pennellii*: Comparison with two other sympatric tomato species. *Plant Syst. Evol.* 139:11-45.
- Samuels, J. (2013a) An updated look at the taxonomy of the brinjal eggplant complex, in: Lanteri, S., Rotino, G.L. (Eds), *Breakthroughs in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Proceedings of the XV EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 2-4 September, 2013, Torino, Italy*, pp. 253-261.
- Samuels, J. (2013b) Taxonomic notes on several wild relatives of *Solanum melongena* L. (Solanaceae): Comments on Meyer et al. (2012). *Mol. Phylogenet. Evol.* 67:297-299.

- Sánchez-Mata, M.C., Yokoyama, W.E., Hong, Y.J., Prohens, J. (2010) Alpha-solasonine and alpha-solamargine contents of gboma (*Solanum macrocarpon* L.) and scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) eggplants. *J Agric Food Chem* 58:5502-5508.
- Shapiro, J.A., Steffens, J.C., Mutschler, M.A. (1994) Acylsugars of the wild tomato *Lycopersicon pennellii* in relation to geographic distribution of the species. *Biochem. Syst. Ecol.* 22:545-561.
- Shepherd, T., Griffiths, D.W. (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171:469-499.
- Simmons, A.T., Gurr, G.M. (2005) Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agric. For. Entomol.* 8:1-11.
- Smith, R.M., Marshall, J.A., Davey, M.R., Lowe, K.C., Power, J.B. (1996) Comparison of volatiles and waxes in leaves of genetically engineered tomatoes. *Phytochemistry* 43:753-758.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E., Knapp, S. (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* 54:43-61.
- Stedje, B., Bukenya-Ziraba, R. (2003) RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. and *S. aethiopicum* L. (Solanaceae) in Uganda. *Euphytica* 131:293-297.
- Szafranek, B.M., Synak, E.E. (2006) Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry* 67:80-90.
- The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium; Aflitos, S. *et al.* (2014) Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J.* 80:136-148.
- Uusiku, N.P., Oelofse, A., Duodu, K.G., Bester, M.J., Faber, M. (2010) Nutritional value of leafy vegetables of sub-Saharan Africa and their potential contribution to human health: a review. *J. Food Compos. Anal.* 23:499-509.

- Vorontsova, M.S., Stern, S., Bohs, L., Knapp, S. (2013) African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae): a thorny phylogenetic tangle. Bot. J. Linnean Soc. 173:176-193.
- Yeats, T.H., Buda, G.J., Wang, Z., Chehanovsky, N., Moyle, L.C., Jetter, R., Schaffer, A.A., Rose, J.K.C. (2012) The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. Plant J. 69:655-666.
- Yuan, B., Byrnes, D., Giurleo, D., Villani, T., Simon, J.E., Wu, Q. (2018) Rapid screening of toxic glycoalkaloids and micronutrients in edible nightshades (*Solanum* spp.). J. Food Drug Anal. 26:751-760.
- Zohary, D. (2004) Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. Econ. Bot. 58:5-10.
- Zuriaga, E., Blanca, J., Nuez, F. (2009) Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. Genet. Resour. Crop Evol. 56:663-678.
- Zygadlo, J.A., Maestri, D.M., Grosso, N.R. (1994) Alkane distribution in epicuticular wax of some Solanaceae species. Biochem. Syst. Ecol. 22:203-209.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza publikacjami, wchodzącymi w skład zaprezentowanego osiągnięcia naukowego, mój dorobek naukowy złożony jest z 13 publikacji w czasopismach uwzględnionych w bazie Journal Citation Reports o sumarycznym **IF = 25,322** (MNiSW = 317) oraz 6 publikacji w pismach spoza tej bazy i dwóch recenzowanych rozdziałów w książkach.

5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Dorobek naukowy, powstały przed uzyskaniem stopnia doktora, obejmuje następujące publikacje:

- I1.** L.P. Haliński, B.M. Szafranek, Cuticular waxes from potato leaves – evaluation of extractions methods. *Herba Polonica*, 2006, **52**, 65-70
- I2.** M. Gołębiowski, B. Ostrowski, M. Paszkiewicz, M. Czerwicka, J. Kumirska, L. Haliński, E. Maliński, P. Stepnowski, Chemical composition of commercially available essential oils from blackcurrant, ginger, and peppermint. *Chemistry of Natural Compounds*, 2008, **44**, 794-796 (IF 0,468; MNiSW 10)
- I3.** M. Gołębiowski, E. Maliński, M. Paszkiewicz, L. Haliński, P. Stepnowski, Chemical composition of commercially available essential oils from eucalyptus, pine, ylang and juniper. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009, **45**, 278-279 (IF 0,572; MNiSW 10)
- I4.** L.P. Haliński, J. Szafranek, B.M. Szafranek, M. Gołębiowski, P. Stepnowski, Chromatographic fractionation and analysis of main components from eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf cuticular waxes. *Acta Chromatographica*, 2009, **21**, 127-137 (IF 0,676; MNiSW 15)

Moje zainteresowania naukowe na wczesnym etapie pracy obejmowały rozwój metod analitycznych, służących do oznaczania związków naturalnych. Opublikowane w tym czasie prace dotyczyły oceny metod ekstrakcji wosków powierzchniowych roślin wyższych (**I1**) oraz identyfikacji składników olejków eterycznych (**I2-I3**). Ponadto, opracowana została metodyka ekstrakcji, frakcjonowania za pomocą szybkiej chromatografii cieczowej (tzw. *flash chromatography*), identyfikacji i analizy ilościowej wosków powierzchniowych oberżyny (**I4**). Było to pierwsze doniesienie na temat składu wosków kutykularnych liści tego gatunku, a opracowana metodyka była z sukcesem stosowana później, także w pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

5.2. Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy, powstały po uzyskaniu stopnia doktora, obejmuje następujące publikacje:

- I5. L.P. Haliński**, J. Szafranek, P. Stepnowski, Leaf cuticular *n*-alkanes as markers in the chemotaxonomy of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Plant Biology*, 2011, **13**, 932-939 (IF 2,395; MNiSW 32)
- I6. L.P. Haliński**, P. Stepnowski, GC-MS and MALDI-TOF MS profiling of sucrose esters from *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*. *Zeitschrift für Naturforschung C, A Journal of Biosciences*, 2013, **68**, 210-222 (IF 0,569; MNiSW 15)
- I7. L.P. Haliński**, D. Śmigiel, M. Czerwicka, M. Paszkiewicz, J. Kumirska, P. Stepnowski, The derivatization and analysis of anticancer pharmaceuticals in the presence of tricyclic antidepressants by gas chromatography. *Acta Chromatographica*, 2014, **26**, 473-484 (IF 0,577; MNiSW 15)
- I8. L.P. Haliński**, P. Stepnowski, Fractionation of cuticular waxes from the leaves of Solanaceae plant species using microextraction by packed sorbent. *Acta Chromatographica*, 2015, **27**, 729-741 (IF 1,187; MNiSW 15)
- I9.** A. Topolewska, K. Czarnowska, **L.P. Haliński**, P. Stepnowski, Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2015, **990**, 150-157 (IF 2,689; MNiSW 30)
- I10.** M. Borecka, G. Siedlewicz, **L.P. Haliński**, K. Sikora, K. Pazdro, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, Contamination of the southern Baltic Sea waters by the residues of selected pharmaceuticals: method development and field studies. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, **94**, 62-71 (IF 3,099; MNiSW 40)
- I11.** M. Borecka, A. Białk-Bielińska, **L.P. Haliński**, K. Pazdro, P. Stepnowski, S. Stolte, The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards the green algae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, **308**, 179-186 (IF 6,065; MNiSW 45)
- I12.** P. Śramska, A. Maciejka, A. Topolewska, P. Stepnowski, **L.P. Haliński**, Isolation of atropine and scopolamine from plant material using liquid-liquid extraction and EXTrelut® columns. *Journal of Chromatography B*, 2017, **1043**, 202-208 (IF 2,603; MNiSW 30)

I13. I. Fischer, **Ł.P. Haliński**, W. Meissner, P. Stepnowski, M. Knitter, Seasonal changes in the preen wax composition of the Herring gull *Larus argentatus*. *Chemoecology*, 2017, **27**, 127-139 (IF 1,298; MNiSW 25)

I14. A.M. Naczka, A.K. Kowalkowska, N. Wiśniewska, **Ł.P. Haliński**, M. Kapusta, M. Czerwicka, Floral anatomy, ultrastructure and chemical analysis in *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2018, **187**, 512-536 (IF 3,124; MNiSW 35)

Tematy badawcze, podjęte po uzyskaniu stopnia doktora, obejmowały zagadnienia związane z: (1) opracowaniem metod analitycznych, służących do oznaczania szeregu istotnych metabolitów pierwotnych i wtórnych w materiale roślinnym oraz zastosowaniu tych metod do analiz taksonomicznych (**I5, I6, I8, I9, I12**); (2) obecnością substancji leczniczych w środowisku naturalnym, ich oznaczaniem oraz możliwymi efektami toksycznymi (**I7, I10, I11**); (3) zastosowaniem metod chemicznej analizy instrumentalnej w badaniu zjawisk o charakterze biologicznym, we współpracy z doktorantami i pracownikami Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (**I13, I14**).

Pierwszy z podjętych tematów dotyczył głównie analizy metabolitów wtórnych roślin psiankowatych, a opracowane metody posłużyły także do realizacji zadań badawczych, opisanych wcześniej jako elementy osiągnięcia naukowego (**I5, I6, I9**). Publikacja **I5** opisuje pierwszą udaną próbę zastosowania profilu węglowodorów kutykularnych w analizach chemotaksonomicznych oberżyny oraz gatunków pokrewnych. Najistotniejsze wnioski płynące z uzyskanych wyników dotyczą oceny zmienności składu chemicznego poszczególnych frakcji wosków powierzchniowych pomiędzy sezonami wegetacyjnymi oraz możliwości przeprowadzenia klasyfikacji omawianych taksonów na podstawie cech chemicznych, zgodnej z obecną wiedzą na temat systematyki roślin psiankowatych. Zastosowana została uproszczona procedura, obejmująca jedynie profil *n*-alkanów kutykularnych, a wyniki częściowo zostały przedstawione wcześniej w rozprawie doktorskiej. Stworzenie szybkiej metody analitycznej, pozwalającej na oznaczenie profilu estrów sacharozy, wydzielanych jako związki obronne na powierzchnię liści i łodyg niektórych gatunków roślin psiankowatych, było podstawowym celem pracy **I6**. Jako gatunki modelowe zastosowane zostały tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L.) oraz tytoń bakun (*N. rustica* L.). Podstawowym problemem w analizie estrów sacharozy jest

występowanie znacznej liczby związków izomerycznych, przez co wyniki analiz chromatograficznych (zazwyczaj z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas) są bardzo trudne w interpretacji. Zaproponowana metoda oznaczania omawianych związków obejmowała bezpośrednią analizę ich obecności w ekstraktach przy zastosowaniu techniki spektrometrii mas z analizatorem czasu przelotu oraz jonizacją techniką desorpcji laserowej z udziałem matrycy (MALDI-TOF MS). Takie podejście powoduje utratę informacji na temat występowania izomerów, w zamian umożliwiając proste wyznaczenie profilu estrów sacharozy o określonej masie cząsteczkowej. Wyniki analiz udowodniły, że w przypadku wyznaczania tylko względnego składu frakcji, który może być później zastosowany w analizach chemotaksonomicznych, opisana metoda charakteryzuje się precyzją zbliżoną do klasycznych metod, stosujących techniki chromatografii gazowej. Metoda została z powodzeniem wdrożona do wyznaczenia profilu estrów sacharozy wydzielanych przez dzikie gatunki pomidora (pozycja **O7** w osiągnięciu naukowym). Praca **I8** przedstawia próbę zastosowania zminiaturyzowanej techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (MEPS) do frakcjonowania ekstraktów wosków powierzchniowych roślin psiankowatych. Zgodnie z przewidywaniami, niska rozdzielczość techniki nie pozwoliła na pełne rozdzielenie składników wosków na frakcje, ale umożliwiła np. wyodrębnienie węglowodorów kutykularnych do analiz chemotaksonomicznych przy minimalnym nakładzie pracy oraz zużyciu rozpuszczalników organicznych, co może czynić ją atrakcyjną alternatywą dla klasycznych technik chromatografii ciekłej. Pozycja **I9** opisuje uporządkowaną metodę opracowania optymalnej techniki syntezy pochodnych kwasów tłuszczowych do analiz z zastosowaniem chromatografii gazowej. Ocenie poddano cztery różne procedury derywatywacji, w różnych kombinacjach warunków prowadzenia reakcji. Uwzględniono także specyfikę ekstraktów z zielonych części roślin, a za główny cel pracy postawiono opracowanie metody przydatnej do oznaczania kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidów z jadalnych liści roślin. Opracowana metoda została z powodzeniem zastosowana w pozycji **O5**, wchodzącej w skład opisanego osiągnięcia naukowego. Publikacja **I12** miała za cel porównanie szeregu metod izolacji alkaloidów tropanowych (na przykładzie atropiny i skopolaminy), występujących w niektórych gatunkach roślin psiankowatych, które mogą stwarzać niebezpieczeństwo toksykologiczne w przypadku niektórych produktów spożywczych. Alkaloidy tropanowe mogą także stanowić

potencjalnie przydatne markery chemotaksonomiczne. Wdrożenie opracowanej metody do analiz żywności oraz analiz taksonomicznych jest planowane w przyszłości.

Pozycje (**I7**, **I10**, **I11**) dokumentują prace nad grupą nowych, śladowych zanieczyszczeń środowiska wodnego, jaką są substancje lecznicze, stosowane w medycynie człowieka oraz w weterynarii. Publikacja **I7** opisuje opracowanie metody analitycznej, pozwalającej na jednoczesne oznaczanie trójpierścieniowych leków antydepresyjnych oraz wybranych substancji stosowanych w terapii nowotworów za pomocą chromatografii gazowej. Praca **I10** przedstawia szeroko zakrojone badania nad obecnością wybranych substancji leczniczych w Morzu Bałtyckim, wskazując miejsca potencjalnie najbardziej narażone na najwyższe ich stężenia, a także próbując znaleźć korelację pomiędzy zaobserwowaną efektywnością wydzielenia oznaczanych substancji z wody oraz parametrami fizykochemicznymi próbki. Jednocześnie, na tym etapie badań oceniono wykryte stężenia substancji leczniczych jako zbyt niskie, by mogły wywołać zauważalny efekt toksyczny w warunkach środowiskowych. Pozycja **I11** podejmuje temat ekotoksyczności wybranych leków przeciwbakteryjnych (sulfonamidów oraz trimetoprimu) wobec glonów *Chlorella vulgaris* Beijer., z uwzględnieniem wpływu zasolenia wody na obserwowaną toksyczność. Stwierdzona została dość wysoka toksyczność niektórych badanych związków, wskazująca na ryzyko występowania szkód, związanych z ich obecnością w środowisku wodnym. Dodatkowo stwierdzono, że rosnące zasolenie wody powoduje obniżenie toksyczności omawianych substancji, a jako mechanizm tłumaczący to zjawisko zaproponowano ich malejącą biodostępność ze względu na rosnące stężenie jonów przy powierzchni komórek glonów.

W ostatnich latach podjąłem również współpracę z pracownikami Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, w zakresie zastosowania wyników analiz chemicznych w interpretacji zjawisk biologicznych. Rezultatem tej współpracy są w tej chwili dwie wspólne publikacje (**I13**, **I14**). Pierwsza dotyczy zmienności sezonowej składu chemicznego wydzieliny gruczołu kuprowego mewy srebrzystej (*Larus argentatus* Pontoppidan). Jej głównym osiągnięciem jest wykazanie, że istnieje istotna różnica w składzie wydzieliny pomiędzy osobnikami badanymi zimą oraz w sezonie lęgowym, a większe różnice dotyczą samców, które w sezonie lęgowym częściej wysiadują jaja w ciągu nocy. Sugerowany jest zatem mechanizm obronny, polegający na utrudnieniu drapieżnikom zlokalizowania

wysiadującego osobnika za pomocą węchu. Jednocześnie wykazano, że w omawianym gatunku nie zachodzi opisana dla innych ptaków sezonowa zmiana składu wydzieliny, polegająca na wydzielaniu diestrów o wyższych masach cząsteczkowych w sezonie lęgowym oraz bardziej lotnych monoestrów w okresie zimowym, występują natomiast bardziej subtelne różnice na poziomie struktury wydzielanych całorocznie monoestrów. Pozycja **I14** podejmuje próbę opisanie różnic w makro- i mikroskopowej budowie kwiatów oraz w składzie wydzielanych związków chemicznych wśród czterech taksonów wchodzących w skład kompleksu *Dactylorhiza incarnata/maculata*. Omawiane rośliny to storczyki, wśród których dwa taksony stanowią diploidalne linie rodzicielskie, a dwa kolejne – wywodzące się od nich linie tetraploidalne. Wykryte zostały różnice zarówno w anatomii, jak i składzie chemicznym związków zapachowych. Praca stanowi stosunkowo pionierską próbę określenia, jakie zmiany w budowie i funkcjonowaniu kwiatów roślin wyższych mogą być efektem poliploidyzacji. Zarówno współpraca w zakresie chemii substancji wydzielanych przez storczyki, jak i znaczenia zmian w składzie chemicznym wydzieliny gruczołu kuprowego ptaków, jest kontynuowana.

Ponadto, opublikowane zostały 2 rozdziały w książkach oraz 5 artykułów polskojęzycznych o charakterze przeglądowym:

I15. M. Gołębiowski, M. Paszkiewicz, **Ł. Haliński**, P. Stepnowski, HPLC of plant lipids. W: *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis* (Ed. Monika Waksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma), s. 425-452. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2011

I16. M. Caban, **Ł.P. Haliński**, J. Kumirska, P. Stepnowski, Gas chromatography applied to the analysis of drug and veterinary drug residues in food, environmental, and biological samples. W: *Determination of target xenobiotics and unknown compound residues in food, environmental, and biological samples* (Ed. Tomasz Tuzimski, Joseph Sherma), s. 133-168. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2018

I17. M. Caban, **Ł. Haliński**, A. Białk-Bielińska, J. Kumirska, P. Stepnowski, Efekty matrycowe w chromatografii gazowej. *Analityka*, 2015, R. 16, nr 4, 4-7

I18. M. Gołębiowski, **Ł. Haliński**, P. Stepnowski, Analiza chemiczna lipidów kutykularnych roślin wyższych i owadów, cz. 1. *Laboratorium: przegląd ogólnopolski*, 2017, nr 11-12, 62-65

I19. M. Gołębiowski, **Ł. Haliński**, P. Stepnowski, Analiza chemiczna lipidów kutykularnych roślin wyższych i owadów, cz. 2. *Laboratorium: przegląd ogólnopolski*, 2018, nr 1/2018, 16-22

I20. **Ł. Haliński**, Taksonomia roślin wyższych – rola analityki chemicznej, *Laboratorium: przegląd ogólnopolski*, 2018, nr 4/2018, 26-29

I21. **Ł. Haliński**, Metabolity wtórne roślin jako alternatywne pestycydy, *Laboratorium: przegląd ogólnopolski*, 2019, nr 1/2019, 62-67

Pozycje **I15-I16** to prace przeglądowe, opublikowane jako rozdziały w recenzowanych, anglojęzycznych książkach, wydanych przez wydawnictwo CRC Press Taylor & Francis Group. Pierwsza z nich dotyczy zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w analizie chemicznej lipidów roślinnych i jest częściowo powiązana tematycznie z cyklem publikacji, opisanym jako osiągnięcie naukowe. Druga pozycja przedstawia stan wiedzy w zakresie analityki substancji stosowanych jako leki weterynaryjne w próbkach biologicznych i środowiskowych oraz próbkach żywności, przy zastosowaniu chromatografii gazowej. Prace **I17-I21** to polskojęzyczne, popularne przeglądy stanu wiedzy na temat występowania efektów matrycowych w chromatografii gazowej (**I17**), analityki lipidów kutykularnych roślin i owadów (**I18**, **I19**), zastosowania roślinnych związków chemicznych jako markerów taksonomicznych (**I20**) oraz przydatności metabolitów wtórnych roślin jako alternatywnych pestycydów o niskiej szkodliwości (**I21**).

5.3. Pozostałe przejawy aktywności naukowej

Wyniki badań, które prowadziłem lub współprowadziłem, zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie referatów mojego autorstwa (2) oraz wystąpień innych autorów (5), a także w formie posterów (33). Uczestniczyłem w jednym projekcie finansowanym przez Unię Europejską w roli eksperta; w trzech projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz Ministerstwo Nauki

i Szkolnictwa Wyższego (w jednym jako kierownik, w dwóch jako wykonawca); a także w sześciu projektach finansowanych przez Uniwersytet Gdański (jako kierownik). Trzykrotnie otrzymałem nagrodę zespołową Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za cykl publikacji naukowych. Odbyłem trzy krótkoterminowe staże zagraniczne w latach 2013-2017, w ośrodkach naukowych w Niemczech i Portugalii. Szczegółowy wykaz dorobku naukowego, popularyzatorskiego oraz dydaktycznego został przedstawiony w **Załączniku 3**.

5.4. Zestawienie dorobku naukowego i parametrów bibliometrycznych

Stan na 27.03.2019 r.	Przed doktoratem (A)	Po doktoracie (B)	W tym osiągnięcie naukowe	Razem (A + B)
Indeks H (Web of Science)	7			
Liczba publikacji w czasopismach indeksowanych przez JCR	3	17	7	20
Liczba pozostałych publikacji	1	5	0	6
IF sumaryczny	1,716	37,319	13,713	39,035
Liczba cytowań				
• bez autocytowań	16	75	10	91
• z autocytowaniami	23	90	17	113
Rola w publikacjach z osiągnięcia naukowego				
• pierwszy autor			7	
• autor korespondencyjny			7	
• inna			0	
Liczba rozdziałów w książkach	0	2	0	2
Liczba wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych				
• jako autor referujący	0	2		2
• jako współautor	0	5		5
Liczba prezentacji posterowych	10	23		33
Liczba realizowanych projektów naukowych				
• jako kierownik	0	7		7
• jako wykonawca/ekspert	0	3		3

Łukasz Haliński