

Załącznik 2

AUTOREFERAT

Dr inż. Magdalena Szechyńska-Hebda
Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego*
Polska Akademia Nauk w Krakowie

Kraków 2015

1. Imię i Nazwisko: Magdalena Szechyńska-Hebda

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

- | | |
|------------|--|
| 03.03.2004 | Doktor Nauk Rolniczych w zakresie Agronomii
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Akademia Rolnicza im. <i>Hugona Kołłątaja</i> w Krakowie
Rozprawa doktorska: "Wpływ fizycznych i chemicznych właściwości błon komórkowych na zdolności embriogenne kultur <i>in vitro</i> pszenicy" |
| 20.10.1998 | Magister inżynier
Specjalność: Agronomia, Specjalizacja: Biologia stosowana
Wydział Rolniczy
Akademia Rolnicza im. <i>Hugona Kołłątaja</i> w Krakowie
Praca magisterska: „Zmiany aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej pod wpływem periodycznych zmian temperatury” |
| 2007-2008 | Studium Pedagogiczne dla Asystentów (wyróżnienie)
Centrum Pedagogiki i Psychologii
Politechnika Krakowska im. <i>T. Kościuszki</i> |

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

Podstawowe zatrudnienie:

- | | |
|-------------------------|---|
| 01.07.2013 - obecnie | Asystent
Instytut Fizjologii Roślin im. <i>Franciszka Górskiego</i>
Polska Akademia Nauk w Krakowie |
| 01.07.2004 - 30.06.2013 | Adiunkt
Instytut Fizjologii Roślin im. <i>Franciszka Górskiego</i>
Polska Akademia Nauk w Krakowie |
| 01.07.2003 - 30.06.2004 | Asystent
Instytut Fizjologii Roślin im. <i>Franciszka Górskiego</i>
Polska Akademia Nauk w Krakowie |
| 01.09.1999 - 30.06.2003 | Asystent
Zakład Fizjologii Roślin im. <i>Franciszka Górskiego</i>
Polska Akademia Nauk w Krakowie |
| 04.01.1999 - 31.12.1999 | Biolog
Zakład Fizjologii Roślin im. <i>Franciszka Górskiego</i>
Polska Akademia Nauk w Krakowie |

Dodatkowe zatrudnienie:

- | | |
|-------------------------|---|
| 08.05.2009 - 28.02.2014 | Starszy Specjalista Naukowo-Techniczny
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego |
| 16.01.2006 - 15.01.2008 | Forskare (Adiunkt)
Department of Botany
Stockholm University (Szwecja) |

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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Integracja sygnałów chloroplastowych indukowanych przez nadmiar energii wzbudzenia z mechanizmami odporności na patogeny i procesami rozwojowymi roślin wyższych

b) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Lp	Publikacja	MNiSW IF ₅ IC
1	Szechyńska-Hebda M , Karpiński S*. 2013. Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants. JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 170: 1501-1516. praca przeglądowa z elementami meta-analizy mikromacierzy	35 3,065 7
2	Szechyńska-Hebda M , Kruk J, Górecka M, Karpińska B, Karpiński S*. 2010. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in <i>Arabidopsis</i> . PLANT CELL 22: 2201-2218. praca eksperymentalna	45 10,656 31
3	Karpiński S*, Szechyńska-Hebda M . 2012. Cellular light memory, photo-electrochemical and redox retrograde signaling in plants. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, COMPUTATIONAL BIOLOGY AND BIONANOTECHNOLOGY, BIOTECHNOLOGIA 93: 27-39. praca przeglądowa z elementami wyników oryginalnych	7 - -
4	Karpiński S*, Szechyńska-Hebda M , Wituszyńska W, Burdiak P. 2013. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. PLANT CELL & ENVIRONMENT 36: 736-744. praca przeglądowa z elementami wyników oryginalnych	45 6,242 19
5	Slesak I, Szechyńska-Hebda M , Fedak H, Sidoruk N, Dąbrowska-Bronk J, Witoń D, Rusaczek A, Antczak A, Drożdżek M, Karpińska B, Karpiński S*. 2014. <i>PHYTOALEXIN DEFICIENT 4</i> affects reactive oxygen species metabolism, cell wall and wood properties in hybrid aspen (<i>Populus tremula</i> L. x <i>tremuloides</i>). PLANT CELL & ENVIRONMENT DOI: 10.1111/pce.12388. praca eksperymentalna	45 6,242 0
6	Szechyńska-Hebda M* , Wąsek I, Gołębiowska G, Dubas E, Żur I, Wędzony M. 2015. Photosynthesis-dependent physiological and genetic crosstalk between cold acclimation and cold-induced resistance to fungal pathogen in triticale (<i>Triticosecale</i> Wittm.). JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY. 177: 30-43. praca eksperymentalna	35 3,065 0
7	Szechyńska-Hebda M* , Hebda M, Mierzwiński D, Kuczyńska P, Mirek M, Wędzony M, van Lammeren A, Karpiński S. 2013. Effect of cold-induced changes in physical and chemical leaf properties on the resistance of winter triticale (<i>xTriticosecale</i>) to the fungal pathogen <i>Microdochium nivale</i> . PLANT PATHOLOGY 62: 867-878. praca eksperymentalna	35 2,788 2
8	Szechyńska-Hebda M* , Skrzypek E, Dąbrowska G, Wędzony M, van Lammeren A. 2012. The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency. ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM 34: 547-560. praca eksperymentalna	25 1,732 3
SUMARYCZE WSKAŹNIKI		272 33,790 62

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do ubiegania o stopień doktora habilitowanego stanowi osiem prac opublikowanych w latach 2010-2015. Sumaryczna liczba punktów wg listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) wynosi 272 (31 grudnia 2014), sumaryczny 5-letni Impact Factor (IF) tych pozycji wynosi 33,790 (Web of Science, 2013) Indeks Cytowań (IC) wynosi 62 (parametry wg ISI Web of Science, 23.02.2015). W pięciu publikacjach jestem pierwszym autorem, w trzech publikacjach jestem drugim autorem, który wniósł równorzędny wkład w jej powstanie, w trzech publikacjach jestem autorem korespondencyjnym (*). Kopie prac wraz z oświadczenia współautorów i opisem ich udziału w przygotowaniu powyższych publikacji zostały zebrane w Załączniku nr 6.

Temat badań, stanowiących podstawę osiągnięcia, został przeze mnie podjęty w 2006 roku. Dotyczy mechanizmów integrujących procesy aklimacji do stresów abiotycznych z indukcją odporności na patogeny oraz procesami rozwojowymi, które kompleksowo mogą determinować konkurencyjność Darwinowską roślin. W sposób szczególny badania poświęcone są stresom abiotycznym indukującym stan nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach, który dotychczas uważany był wyłącznie jako stan niekorzystny dla roślin, oraz główna przyczyna uszkodzeń komórek i kompartmentów subkomórkowych. Badania, które stały się trzonem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia wskazały jednak, że nadmiar energii wzbudzenia może być wykorzystany do uruchomienia mechanizmów odpornościowych i rozwojowych. Prace eksperymentalne w tym temacie rozpocząłem w laboratorium prof. Stanisława Karpińskiego (Departament of Botany, Stockholm University, Szwecja). Do grupy badawczej dołączyłam w ramach projektu Intra-European Grant, MC Actions (PLANT RESISTANCE). Niewątpliwie, podjęta wówczas tematyka należała do nowatorskich w skali co najmniej europejskiej, o czym może świadczyć prestiż przyznanego projektu i opublikowanie wyników pracy w czasopiśmie *The Plant Cell* (publikacja 2). Badania kontynuowałam w Instytucie Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie oraz Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, jako kierownik lub główny wykonawca: European Re-Integration Grant (wyniki w publikacji 2), projektu programu WELCOME 2008/1 (publikacje 1-6), projektu akcji COST, 595/N-COST/2009/0 (publikacja 6), projektu Programu Badań Stosowanych, PBS1/A8/16/2013 (publikacje 1 oraz 5).

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

Wstęp: O najważniejszych sprawach w życiu roślin

Dostępność światła podczas wegetacji roślin, jest często uważana za czynnik powodujący reakcje o rozkładzie zero-jedynkowym, czynnik stanowiący bezkompromisowe „być albo nie być” dla organizmu fotosyntetyzującego. W układach biologicznych pomimo sprzężenia reakcji ezoergicznym z endoergicznymi wymagany jest ciągły dopływ energii zewnętrznej, dlatego organizmy autotroficzne fotosyntetyzujące, z definicji potrzebują energii świetlnej do prawidłowego metabolizmu. Bez dostępu światła, możliwy jest wzrost, przynajmniej czasowy, pędów etiolowanych, czy kultury komórek w warunkach *in vitro*, a nawet kompletna ontogeneza, jak w przypadku swoistego albinosa świata roślin *Monotropa uniflora*. Jednak rośliny te muszą korzystać z alternatywnych źródeł energii (Yang i Pfister 2006).

Zmienne warunki środowiska powodują, że zapotrzebowanie roślin na energię światła jest wypadkową wielu czynników kształtujących aktualny stan fizjologiczny rośliny. Stąd, niezbalansowanie dostępnej energii świetlnej z aktualnym jej wykorzystaniem, jest stanem znacznie bardziej powszechnym, aniżeli optimum procesów energetycznych. Pomimo, że rośliny wyewoluowały mechanizmy umożliwiające elastyczne funkcjonowanie zarówno w warunkach obniżonej dostępności energii słonecznej jak i w warunkach jej nadmiaru, można

stwierdzić, że stres indukowany labilnością warunków świetlnych na poziomie molekularnym, komórkowym, tkankowym i całego organizmu jest również czynnikiem permanentnym.

Stan nadmiaru energii wzbudzenia (EEE, ang. Excess Excitation Energy), stanowiący swoisty początek wszystkiego, co stanowi obiekt moich zainteresowań naukowych, związany jest z zaabsorbowaną i przekazywaną za pośrednictwem anten fotosystemu II i I (PSII i PSI) energią kwantów światła, która jest większa niż ta, faktycznie potrzebna dla fotosyntetycznego transportu elektronów, reakcji ciemnych fotosyntezy i asymilacji CO₂. Wbrew definicji, EEE nie jest zależny od bezwzględnej wartości natężenia światła, ale kombinacji czynników, na tle których tylko część zaabsorbowanej energii będzie wykorzystana do reakcji fotochemicznych, natomiast jej nadwyżka indukować będzie efekty stresowe. W związku z powyższym, dla roślin zaaklimatyzowanych do niskich natężeń światła, ekspozycja na 200-500 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ będzie indukować EEE, podczas gdy rośliny zaaklimatyzowane do wysokiego natężenia światła będą utrzymywać sprawność PSII i fotosyntetycznego transportu elektronów nawet powyżej 500 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Podobnie, EEE i stan stresu mogą być indukowane w wyniku traktowania roślin natężeniem światła 800-2000 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ w temperaturach umiarkowanych, jednak w niższych temperaturach, w warunkach suszy, uszkodzenia mechanicznego roślin, czy podczas infekcji patogena, światło o znacznie niższym natężeniu może również wywołać stan EEE.

Jeśli założymy, że optimum dla sumy aktualnych czynników środowiskowych stanowi bardzo wąski zakres wartości, to wnioskować można, że stres dla rośliny jest naturalnym, dynamicznym stanem, w którym dąży ona do zbalansowania odpowiedzi naprawczych i wzrostowych dla wydania plonu i podniesienia konkurencyjności w określonym ekosystemie. Z drugiej jednak strony, roślina (komórka) ma skończoną i ograniczoną pulę reakcji na poszczególne czynniki stresowe, dlatego nie jest niespodzianką, że podobne mechanizmy i odpowiedzi mogą być indukowane przez różne, wzajemnie niezależne czynniki stresowe. W obszarze nauki, w którym prowadzę badania, stwierdzono podobieństwo mechanizmów aklimacji do EEE (indukowanego przez stres abiotyczny) i indukowanej odporności na patogeny (stres biotyczny) (Karpiński et al. 1999). Nabyta systemowa aklimatyzacja (SAA, ang. Systemic Acquired Acclimation) do EEE jest regulowana bowiem, przez ten sam genetyczny układ, co reakcje nadwrażliwości (Mateo i in. 2004, Mühlenbock i in. 2007, Mühlenbock i in. 2008, Szechyńska-Hebda i in. 2010) i nabyta systemowa odporność na patogeny (SAR, ang. Systemic Acquired Resistance) (Coll i in. 2011, Luna i in. 2012, Luna i Ton 2012). Procesy te obejmują szereg tych samych reakcji: (1) produkcję reaktywnych form tlenu (ROS, ang. Reactive Oxygen Species) (Karpiński i in. 1999, Wendehenne i in. 2001, Fufezan i in. 2002, Fryer i in. 2003, Mateo i in. 2004, Mühlenbock i in. 2008, Szechyńska-Hebda i in. 2010), indukowaną przez zmiany w PSII i fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów (Karpiński i in. 1999, Arias i in. 2003, Berger i in. 2004, Frenkel i in. 2009); (2) aktywację dróg sygnałowych zależnych od kwasu salicylowego, kwasu jasmonowego, etylenu, glutationu (Sharma i in. 1996, Kunkel i Brooks 2002, Ball i in. 2004, Clarke i in. 2004) oraz aktywację sygnałów fotoelektrochemicznych (Szechyńska-Hebda i in. 2010); (3) regulację tych samych genów (Karpiński i in. 1997, Chang i in. 2004, Szechyńska-Hebda i in. 2015) i loci cech ilościowych (QTL, ang. Quantitative Trait Loci, Szechyńska-Hebda i in. 2011, Szechyńska-Hebda i in. 2015), związanych z wydajnością fotosyntezy podczas aklimatyzacji, odpornością na patogeny i akumulacją biomasy; (4) indukcję programowanej śmierci komórki (Fryer i in. 2003, Mateo i in. 2004). Z tych danych wynika jednoznacznie potrzeba weryfikacji klasycznego podejścia, wskazującego EEE jako czynnik negatywny, uszkadzający struktury komórkowe, a w skrajnych przypadkach powodujący zamieranie tkanek i całych roślin. Opublikowane prace, stanowiące osiągnięcie naukowe (publikacje 1-8), reprezentują nowy pogląd na zagadnienie i określają EEE, jako czynnik holistycznie indukujący mechanizmy aklimatyzacyjne i odpornościowe, niezbędne dla przeżycia w niekorzystnych warunkach środowiska, zarówno aktualnych, jak i mogących mieć miejsce w przyszłości. Z tego założenia

wyłania się niezwykle elegancki w swojej prostocie schemat „najważniejszych spraw w życiu roślin”: światło, jako najważniejszy energetycznie czynnik funkcjonowania roślin stanowi jednocześnie centralny determinant krótko- i długoterminowych reakcji stresowych; które są z kolei najważniejszym elementem indukującym wykształcenie szerokiej gamy mechanizmów adaptacyjnych, gwarantujących osiągnięcie najważniejszego celu życia roślin tj. konkurencyjności Darwinowskiej i sukcesu ewolucyjnego.

Artykuły wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowią realizację kolejnych celów naukowych:

Cel 1 (publikacja 1) Dyskusja uwarunkowań fizjologicznych i genetycznych funkcjonowania roślin w zmiennych warunkach świetlnych oraz na poszczególnych etapach ontogenezy, ze szczególnym uwzględnieniem roli reaktywnych form tlenu i enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego.

Cel 2 (publikacja 2) Zdefiniowanie mechanizmów, składowych elementów systemów sensorowych i dróg sygnałowych, które prowadzą do lokalnej i systemowej, krótko- i długotrwałej aklimatyzacji roślin do nadmiaru energii wzbudzenia i odporności na patogeny.

Cel 3 (publikacja 3) Prezentacja scenariusza zdarzeń prowadzących do systemowej nabytej aklimatyzacji i systemowej nabytej odporności, z wskazaniem szczególnej roli kwasu salicylowego, zależnej od długości fali światła, oraz postawienie nowych hipotez dotyczących integracji retrosygnatów zaangażowanych w te procesy.

Cel 4 (publikacja 4) Charakterystyka programowanej śmierci komórki, jako elementu integrującego mechanizmy aklimatyzacji do stresu wysokiego natężenia światła i indukcji odporności na patogeny, ze szczególnym uwzględnieniem regulatorowej roli LSD1, EDS1 i PAD4 oraz sygnałów generowanych w różnych interwałach czasowych.

Cel 5 (publikacja 5) Określenie specyficznej roli PAD4 w holistycznych mechanizmach aklimatyzacyjnych i odpornościowych.

Cel 6 (publikacja 6) Weryfikacja założenia, że nadmiar energii wzbudzenia indukowany w warunkach niższych intensywności światła przy obniżonej temperaturze może być odpowiedzialny za integrację mechanizmów wzrostowych i rozwojowych, aklimatyzacyjnych i odpornościowych na poziomie fizjologicznej i genetycznej regulacji procesu fotosyntezy.

Cel 7 (publikacja 7) Wskazanie, że nadmiar energii wzbudzenia w warunkach niższych intensywności światła przy obniżonej temperaturze indukuje reakcje odpornościowe i aklimatyzacyjne na poziomie podstawowych reakcji obronnych tj. fortyfikacji ściany komórkowej poszczególnych tkanek liścia.

Cel 8 (publikacja 8) Potwierdzenie zależnej od światła roli H_2O_2 w zbalansowania podziałów komórkowych i śmierci komórki dla kontroli procesów rozwojowych.

Cel 1 (publikacja 1): *Retrosygnały roślin wyższych zależne od intensywności światła*

W pracy zaprezentowałam najnowsze badania i poglądy dotyczące fizjologicznych i molekularnych konsekwencji percepcji światła przez roślinę w zakresie natężenia od 0 do 2500 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. W sposób szczególny moim celem było wskazanie mechanizmów prowadzących do uruchamiania specyficznych retrosygnatów na poszczególnych etapach ontogenezy roślin, podział tych sygnałów ze względu na miejsce i czas indukcji, oraz określenie typu i odległości miejsca docelowego sygnału na poziomie komórkowym i międzykomórkowym. Publikacja ma charakter pracy przeglądowej, jednak jej obszerny fragment stanowią wyniki własnych analiz bioinformatycznych, które przeprowadziłam w oparciu o dane uzyskane z baz National Center for Biotechnology Information (NCBI) i Universal Protein Resource (UniProt) oraz metaanalizę eksperymentów mikromacierzowych z zastosowaniem narzędzia Genevestigator (¹).

Przegląd najnowszych doniesień literaturowych umożliwił wskazanie zależnych od światła mechanizmów, które na wczesnych etapach biogenezy chloroplastów zaangażowane są w indukcję sygnałów przekazywanych w kierunku od proplastydów do jądra komórkowego dla regulacji ekspresji ok. 6500 genów. Zestawiłam i opisałam mechanizmy z udziałem: (1) komponentów białkowych kontroli biogenezy plastydów GUN1-6 (GENOMES UNCOUPLED 1-6) i szlaków syntezy chlorofilu, ze wskazaniem hemu, jako bezpośredniej cząsteczki sygnałowej; (2) statusu redox fotosyntetycznego transportu elektronów; (3) zaburzeń edycji RNA; (4) fotoreceptorów, jako czynników odpowiedzialnych za usuwanie represorów fotomorfogenezy COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) i PIFs (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS) oraz akumulację pozytywnych czynników transkrypcyjnych HY5 (LONG HYPOCOTYL 5), LAF1 (LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1), HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FARRED 1) i GLKs (GOLDEN2-LIKEs); (5) białka DELLA pełniącego funkcję w regulacji aktywności PIF i ekspresji czynników transkrypcyjnych typu GATA: GNC (GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON-METABOLISM INVOLVED) i GNL (GNC-LIKE).

W kolejnych podrozdziałach pracy określiłam źródła i typy retrosygnatów generowanych przez światło w dojrzałych chloroplastach. Wskazałam, że w przypadku roślin zaaklimatyzowanych do bardzo niskich natężeń światła (0–10 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), światło prowadzi do przeprogramowania genetycznego za pośrednictwem sygnałów angażujących enzymy stromy chloroplastów, białka EXECUTER1, EXECUTER2 i indukcji $^1\text{O}_2$, układu antyoksydantów i kwasu abscysynowego. Niskie natężenia światła (do 100 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) generują natomiast retrosygnały zależne od statusu redoks puli PQ (plastoquinone), ROS, TRX (THIOREDOXIN), karotenoidów, STN7 i STN8 (THYLAKOID-BOUND SERINE-THREONINE PROTEIN KINASE), ICS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE 1) i kwasu salicylowego, oraz KIN10 i KIN11 (białek z rodziny SnRK1). Z kolei absorpcja energii światła w nadmiarze (300–1200 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) indukuje zmiany stanu redoks składników łańcucha fotosyntetycznego transportu elektronów (redoks status PQ wraz z aktywnością PTOX, PLASTID TERMINAL OXIDASE), zakwaszenie lumenu chloroplastów i modyfikacje niefotochemicznego wygaszania nadmiaru energii (NPQ, ang. Non-Photochemical Quenching), cykliczny transport elektronów, ROS i mechanizmy antyoksydacyjne np. glutation, TRX i Fd (FERREDOXIN). Mając na uwadze tradycyjne podejście, bardzo wysokie natężenie światła (900–2500 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) uszkadza chloroplasty i komórki z powodu nadmiernej redukcji składników łańcucha przenośników elektronów, nadprodukcji ROS, uszkodzeń białka D1 i fotoinhibicji. Jednak w prezentowanej pracy zaproponowałam i przedyskutowałam alternatywne podejście, które eksperymentalnie potwierdzone zostało w pracach 2-6. Wskazałam bowiem, że powstawanie mikrouszkodzeń pod wpływem EEE nie

¹ <https://www.genevestigator.ethz.ch/>

ogranicza żywotności całej rośliny, jest formą indukowanej śmierci komórki i elementem mechanizmów prowadzących do systemowej nabytej aklimacji w warunkach stresów abiotycznych oraz systemowej nabytej odporności podczas stresów biotycznych. W dyskusji tych zjawisk, uwzględniłam rolę mechanizmów zależnych od: zmian redox PQ, aktywności LSD1 (LESION SIMULATING DISEASE 1), EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1), PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4) oraz EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2), ROS, kwasu salicylowego i enzymów antyoksydacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem APX (ASCORBIC PEROXIDASE).

Dyskutując ostatni etap ontogenezy tj. starzenie liści i degradację chloroplastów wskazałam sygnały, które obejmowały remobilizację zredukowanych form azotu do innych organów roślinnych, sygnały powstające w wyniku degradacji chlorofilu i karotenoidów, oraz mechanizmy wrażliwe na zmiany poziomu cukrów.

ROS są zaangażowane w odpowiedzi aklimatyzacyjne do większości omówionych typów warunków świetlnych. W pracy rozważałam zatem następujące zagadnienie: jeżeli ROS stanowią uniwersalny element transdukcji sygnałów świetlnych, w jaki sposób rośliny są zdolne do indukowania bardzo różnych, specyficznych odpowiedzi komórek, wykorzystując stosunkowo niewielką liczbę aktywnych cząsteczek. ROS mogą działać bezpośrednio jako "cząsteczki sygnałowe" lub pośrednio jako "produkty uboczne", jednak dodatkowe aspekty muszą zostać rozważone względem udziału ROS w mechanizmach regulacji specyficznych odpowiedzi na konkretne warunki świetlne: typ cząsteczki, jej lokalne stężenie progowe i odpowiednia komórkowa lokalizacja, lub kombinacja wszystkich trzech czynników. Wskazane elementy podlegają regulacji przez odpowiednie składniki enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego w różnych przedziałach komórkowych. Dlatego też najbardziej obszerną część publikacji stanowi opis wyników metaanalizy eksperymentów mikromacierzowych, którą przeprowadziłam dla genów kodujących 38 izoform enzymów antyoksydacyjnych *Arabidopsis thaliana* odpowiednio podczas: (1) deetiolacji roślin po przeniesieniu z ciemności do niskiego natężenia światła ($10\text{--}80\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$); (2) przeniesienia roślin ze standardowych warunków świetlnych ($150\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) do ciemności, do niskiego natężenia światła ($50\text{--}75\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$), wysokiego natężenia światła ($400\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) i do nadmiaru światła ($1000\text{--}1800\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$); (3) indukcji SAA w zacienionych liściach ($40\text{--}70\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) rozetki częściowo eksponowanej na nadmiar światła ($1000\text{--}1800\ \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$). Wyniki metaanalizy wskazały, że traktowanie światłem powoduje wzrost ekspresji większości genów wybranych do analizy, podczas gdy przeniesienie z wyższych do niższych natężeń światła lub ciemności powoduje ich supresję. Jednak istnieje ścisła zależność poziomu ekspresji od intensywności światła, lokalizacji komórkowej enzymu kodowanego przez określony gen oraz stadium rozwojowego rośliny. Dlatego postawiłam i zweryfikowałam założenie, że każda zmiana w intensywności światła indukuje specyficzny wzór ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, i umożliwia jednoznaczną rolę poszczególnych ROS w specyficznych odpowiedziach:

(1) Podczas deetiolacji specyficznie indukowana była ekspresja genów kodujących chloroplastowe izoformy dysmutaz nadadtlenkowych FSD2 i FSD3, enzymów odpowiedzialnych za rozkład anionorodnika nadadtlenkowego. Spośród genów kodujących enzymy usuwające nadtlenek wodoru najważniejszą rolę pełniły peroksydazy askorbinianowe tAPX i peroksyredoksyny PRX. Ponadto, potwierdziłam rolę chloroplastowych peroksydaz glutationowych GPX6 i GPX7 oraz glutaredoksyn (GR) na poziomie ekspresji ich genów. Porównując enzymy o lokalizacji pozachloroplastowej stwierdziłam zwiększony poziom transkryptów dla cytozolowej izoformy APX1, mikrosomalnych izoform APX3 i APX4, oraz izoformy katalazy CAT2 występującej w różnych kompartmentach komórkowych np. mitochondriach, cytozolu, peroksysomach, rybosomach i stromulach.

(2) Przeniesienie roślin z warunków świetlnych standardowych dla wzrostu, do ciemności, lub niższego natężenia światła specyficznie indukowało geny peroksysomowej isoformy

dysmutazy nadadtlenkowej CSD3 oraz zlokalizowanej w membranie komórkowej GPX5. Wzór ekspresji genów roślin traktowanych wysokim natężeniem światła wskazywał na chloroplastowe enzymy zaangażowane w cykl woda-woda, FSD3, sAPX, GPX6 i GPX7 oraz cytoplazmatyczne izoformy APXs i DHAR1. Geny kodujące APX2 były indukowane specyficznie jedynie w przypadku najwyższych intensywności światła.

(3) Natomiast w indukcji SAA główną rolę odgrywały geny chloroplastowych GPX7 i PRXB oraz zlokalizowanych w różnych kompartmentach komórki DHAR1.

Na podstawie przeprowadzonej metaanalizy zaproponowałam schemat mechanizmów regulujących i integrujących odpowiedzi na poziomie ROS i systemu antyoksydacyjnego dla poszczególnych warunków świetlnych.

W ostatnich dwóch podrozdziałach pracy, rozważając czasy półtrwania i odległości, od miejsca generowania sygnału do miejsca docelowego, wskazałam na możliwość roli $^1\text{O}_2$ i H_2O_2 jako bezpośrednich cząsteczek sygnałowych. Ponadto, wskazałam cząsteczki innego typu, które mogą być bezpośrednimi przekąźnikami sygnałów przez membranę chloroplastu do cytozolu i dalej jądra komórkowego: hem, glutation, PTM (CHLOROPLAST ENVELOPE-BOUND PLANT HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR), PAP (3'-PHOSPHOADENOSINE 5'-PHOSPHATE), PRIN2 (PLASTIDREDOX INSENSITIVE 2), MEP (METHYLERYTHRITOL PHOSPHATE PATHWAY), Why1 (WHIRLY1) oraz znaczenie systemów transportu zredukowanych produktów chloroplastowych z udziałem OAA (THEMALATE/OXALOACETATE) i TP/PGA (TRIOSE-PHOSPHATE/3-PHOSPHOGLYCERATE). W podsumowaniu artykułu przedyskutowałam potencjalne mechanizmy przekazywania informacji systemowo do innych komórek, tkanek, organów roślinnych oraz integrację tych sygnałów na poziomie całego organizmu. Szczególną uwagę poświęciłam możliwości przekazywania informacji w postaci sygnału elektrycznego generowanego w chloroplastach przez zintegrowany system membran poszczególnych chloroplastów, jądra komórkowego, retikulum endoplazmatycznego, membrany komórkowej. Wskazałam również hipotezy, które w przyszłości powinny zostać zweryfikowane dla kompleksowego poznania mechanizmów rozchodzenia się sygnałów indukowanych przez światło o różnej intensywności. Ich częściowa weryfikacja eksperymentalna została przeprowadzona w kolejnych pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Informacje dodatkowe dotyczące pracy

Duże zainteresowanie tematyką wskazuje utrzymywanie się publikacji przez pierwsze miesiące po jej opublikowaniu na wysokich pozycjach listy najczęściej pobieranych artykułów Journal of Plant Physiology oraz 12 cytacji (wg Google) po 16 miesiącach od daty opublikowania.

Cel 2 (publikacja 2) Dowody istnienia sygnałów fotoelektrofizjologicznych specyficznych względem długości fali światła oraz pamięci o epizodach nadmiaru światła u Arabidopsis

Jak wskazano w poprzedniej pracy organizmy fotosyntetyzujące wykształciły mechanizmy sygnałowe umożliwiające przekazywanie informacji o zmiennych warunkach świetlnych z chloroplastów do jądra komórkowego, celem uruchomienia odpowiedniej puli genów. Publikacja 2 jest pracą eksperymentalną, która porusza w sposób szczególny zagadnienia absorpcji ilości energii światła większej niż ta potrzeba dla procesu fotosyntezy. Dotychczas nadmiar energii rozpatrywany był wyłącznie, jako czynnik indukujący reakcje stresowe i wymagający uruchomienia mechanizmów naprawczych. Postawiłam jednak hipotezę, że sygnały indukowane przez nadmiar światła mogą prowadzić do kompleksowych odpowiedzi aklimatyzacyjnych i odpornościowych, a dzięki temu gwarantują roślinie przeżycie niekorzystnych warunków środowiska. W prezentowanej pracy udowodniłam dla modelowej rośliny rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), że odpowiedzi indukowane nadmiarem światła, zarówno lokalne (komórki traktowane nadmiarem światła) jak i systemowe (zacięzione komórki tej samej rozetki), są związane w pierwszej kolejności, z indukcją

specyficznego sygnału w chloroplastach, nazwanego w publikacji jako PEPS (ang. PhotoElectroPhysiological Signaling). Międzyorganellowa i międzykomórkowa transdukcja PEPS obejmuje falowo rozchodzące się zmiany NPQ i ROS przy współudziale enzymu peroksydazy askorbinianowej APX2, jak również zmiany potencjału elektrycznego membran komórkowych. Sygnał PEPS może rozprzestrzeniać się zarówno w liściach jak i pędach kwiatowych, i jego konsekwencją jest występowanie grup komórek z obniżonymi wartościami NPQ, wysokim poziomem H_2O_2 i indukcją ekspresji *APX:LUC*, zlokalizowanych naprzemiennie z grupami komórek o podwyższonych wartościach NPQ, niskim poziomie H_2O_2 i inhibicją genów *APX:LUC*. Dodatkowo, w mutantach *apx2-1* stwierdziłam rozregulowanie mechanizmów przekazywania sygnału elektrycznego oraz odpowiedzi systemowych. Procesy te powiązałam ze zmianami redoks w PSII i łańcuchu przekaźników fotosyntetycznego transportu elektronów oraz zmianami w metabolizmie glutationu podczas traktowania chloroplastów wysokim natężeniem światła. Zastosowanie inhibitora DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) w pojedynczym liściu ekspozowanym na wysokie natężenie światła blokowało bowiem lokalną i systemową indukcję *APX1:LUC*, *APX2:LUC*, NPQ i sygnał elektryczny. Podobnie, deregulacja PEPS oraz zmiany puli PQ i jego stanu redoks obserwowana była w recesywnych mutantach *cad2* i *rax1* związanych z metabolizmem glutationu.

Przeprowadziłam również dodatkowe doświadczenia, które miały na celu wskazanie prawdopodobnych dróg międzykomórkowego i międzyorganowego przekazu sygnału PEPS. Udowodniłam, że sygnał PEPS jest przekazywany przez komórki pochwy okołowiązkowej. Mechaniczne uszkodzenie tego typu komórek (ale nie komórek mezofilu) lub użycie inhibitora kanałów jonowych $LaCl_3$ blokowało przekazywanie sygnału elektrycznego związanego ze zmianami światła.

Ponadto wskazałam, że nadmiar energii indukuje zmiany metaboliczne nie tylko w czasie rzeczywistym, ale informacja o nadmiarze energii może być „wykorzystana” po dłuższym okresie czasu od ekspozycji na światło. Ten długotrwały efekt umożliwia optymalizację procesu fotosyntezy podczas aklimatyzacji do wysokiego natężenia światła, ale również jednoczesną indukcję mechanizmów obrony przed patogenami. W liściach infekowanych bakteryjnym patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 rozwój choroby ograniczony był jedynie w przypadku przeprowadzenia infekcji po ekspozycji na nadmiar światła, podczas gdy ekspozycja na światło zastosowana godzinę po infekcji nie indukowała mechanizmów obronnych. Ponadto, wydłużenie okresu pomiędzy ekspozycją na nadmiar światła i infekcją (w zakresie 8-24h) powodował efektywniejsze hamowanie rozwoju patogena. Zjawisko to zostało określone w publikacji jako „pamięć komórkowa”.

Udowodniłam również, że integracja mechanizmów aklimatyzacyjnych i odpornościowych jest ściśle zależna od jakościowej kompozycji światła. Zarówno wzór przekazywanego sygnału PEPS i jego poszczególnych elementów (sygnał elektryczny, APX, H_2O_2 , NPQ), prędkość propagacji systemowej PEPS, jak i efekt „pamięci” komórkowej jest specyficzny dla światła niebieskiego (450 nm), czerwonego (650 nm) i białego, pomimo podobnej ilości energii, która została przeliczona i zastosowana dla fotonów o określonej długości fali. Najbardziej efektywne w równoczesnej indukcji aklimatyzacji do EEE oraz odporności na patogeny bakteryjne było światło czerwone, a następnie białe.

Informacje dodatkowe dotyczące pracy

W pracy postawiłam i zweryfikowałam hipotezy oraz przedstawiłam wnioskowanie, wzbudzające niejaki kontrowersje w świecie naukowym: (1) przekazywanie sygnału PEPS do komórek, które nie doświadczyły stresu, indukuje zmiany, które są utrzymywane przez roślinę minimum 24h, celem „przygotowania” całego organizmu na potencjalne, przyszłe stresy; (2) fizjologiczne zmiany są na tyle uniwersalne, że uruchamiają odpowiedzi aklimatyzacyjne do stresów abiotycznych i odpowiedzi obronne względem stresów biotycznych.

Kontrowersyjność zawartej w pracy idei polega w sposób szczególny na wprowadzeniu pojęcia „pamięci” komórkowej. Z tego powodu praca spowodowała żywą dyskusję w prasie lokalnej i światowej, na forach naukowych, a nawet mediach (^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8})

W prasie porównywano przedstawiony w pracy systemowy sygnał elektryczny do impulsów elektrochemicznych w systemie nerwowym: „Okazuje się, że o potrzebie pozbycia się [nadmiaru energii] części rośliny potrafią się informować przy pomocy impulsów elektrochemicznych, takich jak w zwierzęcym układzie nerwowym. Co więcej, rośliny potrafią też obliczyć ilość zaabsorbowanego światła i wykorzystać tę informację” (²). „Odebrane bodźce świetlne (czyli fotony) zamieniane są w sygnały elektrofizjologiczne. Rozchodzą się one co prawda znacznie wolniej niż u zwierząt (u nas jest to ok. dwóch metrów na sekundę, u roślin nie więcej niż centymetr na sekundę), ale roślinom całkowicie to wystarcza. W końcu nie muszą one uciekać przed wrogiem (...). O ile szybkość przewodzenia sygnałów jest stosunkowo niewielka, o tyle wytworzone potencjały i amplituda przemieszczającej się fali są u roślin i zwierząt bardzo podobne. Co ciekawe, profil sygnału jest zupełnie inny dla światła białego, czerwonego czy niebieskiego. Przewodzeniem sygnałów zajmują się głównie komórki tzw. wiązek okółopochwowych. To komórki sąsiadujące z naczyniami (popularnie nazywanymi nerwami) liścia. Teraz okazuje się, że owa popularna nazwa - "nerwy" liścia - ma swoje głębsze uzasadnienie” (³). „Szczepionka ze światła: Rośliny nie tylko zapamiętują barwy światła, ale wykorzystują tę pamięć do walki z chorobami. Innymi słowy, rośliny są zdolne do autoimmunizacji przy pomocy światła” (²).

Oprócz aspektów popularnonaukowych i entuzjastycznej interpretacji wyników w prasie, naukowcy o światowej renomie komentowali bardzo pozytywnie opublikowaną pracę.

Professor Christine Foyer (the University of Leeds) dla BBC News (⁴) wyraziła opinię że: *"The study took our thinking one step forward. Plants have to survive stresses, such as drought or cold, and live through it and keep growing, this requires an appraisal of the situation and an appropriate response - that's a form of intelligence. What this study has done is link two signalling pathways together [aklimacja i odpowiedzi obronne] ... and the electrical signalling pathway is incredibly rapid, so the whole plant could respond immediately to high light."*

Professor Terence Murphy (University of California-Davis) stwierdził w wywiadzie dla BBC News (⁵): *"shining light on that first leaf could have any number of effects (...) that's going to have a real effect on how it communicates through the phloem (vascular system) to other leaves. It's not unreasonable that you could illuminate one leaf and affect the other leaves, the trick is finding out how the other leaves are informed - and that's what appears to have been done in the Polish study. Bundle sheath cells surround the veins in leaves, stems and roots, so it's reasonable to think they transmit the electrical impulse."*

Professor William John Lucas (University of California-Davis) wskazał (⁵): *"A particular tissue within a plant needs to be able to signal to the rest of the plant in terms of what are its conditions (...) If a young leaf is emerging out of a plant, it would be nice for that leaf to know about the conditions in which it is going to emerge. (...) There are no neurons in plants, but there is a communication network that we don't fully understand. There are important implications for these kinds of studies."*

² Todnik Powszechny › Cywilizacja › 8 sierpnia 2010 › „Intymne życie roślin”

³ Gazeta Wyborcza › Nauka › 19 lipiec 2010 › „Rozumne życie roślin”

⁴ BBC News › Science & Environment › 14 lipiec 2010 › “Plants can think and remember”

⁵ Popular Science Magazine › CES 2014 › 15 lipiec 2010 › “Can Plants Think?”

⁶ Scientific American › 16 lipiec 2010 › Plants cannot “think and remember,” but there’s nothing stupid about them: They’re shockingly sophisticated.”

⁷ Science News › 15 lipiec 2010 › “Plants show they can 'remember' light”

⁸ China CN › 16 lipiec 2010 › “Plants can think and remember”

Z nieco większą rezerwą odnosił się do tematu redaktor Scientific American w dziedzinie neurologii i psychologii, Ferris Jabr ⁽⁶⁾: *“Plants cannot “think and remember”, but there’s nothing stupid about them: They’re shockingly sophisticated. But plants do produce electrical signals and the function of these signals in response to light is the real focus of the new study — the most recent contribution to a growing body of work about electrical signaling in plants. (...) With such surprising examples of plants’ abilities to process information and adapt to their environments, there’s no need to try and endow plants with intelligence, thought, memory or other cognitive abilities they do not truly possess and do not need. They’re plenty smart already.”*

Praca zdobyła trzy nagrody w 2011 roku:

The PSEPB – Carl Zeiss Award for the best publication in the experimental plant biology in years 2009-2010

Nagrodę I stopnia Rektora SGGW dla pracy zespołowej za publikację

Nagrodę Dyrektora IFR PAN za najlepszą publikację

Cel 3 (publikacja 3) Komórkowa pamięć o świetle, sygnały fotoelektrochemiczne i retrosygnały u roślin

Opisane mechanizmy w publikacjach 1 i 2 są istotne dla przetrwania roślin w warunkach wieloczynnikowego stresu. Wcześniej powszechnie uważano, że fizjologiczne odpowiedzi roślin na EEE są systemowo (globalnie w całym organizmie) regulowane przez ROS, hormony i inne cząstki sygnałowe. Wskazanie, że informacja o EEE jest przekazywana do odległych części roślin przez fotoelektrofizjologiczne sygnały, zmiany w niefotochemicznym wygaszaniu nadmiaru energii wzbudzenia w obrębie PSII, w statusie redoks puli glutationu oraz fotosyntetycznych nośników elektronów (np. PQ), umożliwiła postawienie nowych hipotez o prawdopodobnej kolejności zdarzeń prowadzących do SAA i SAR. Hipotezy te są konfrontowane w publikacji 3, która ma charakter artykułu przeglądowego, ale zawiera również wyniki własnych badań i analiz wskazujących na komplementarną rolę kwasu salicylowego w percepcji zmian jakościowych światła.

W pracy 3 zaproponowałam kategoryzację retrosygnatów indukowanych w chloroplastach i potencjalnie regulujących aklimację do stresu związanego z EEE i odporność względem patogenów. Ze względu na źródło i typ klasyfikacja retrosygnatów w pierwszej kolejności obejmuje sygnały pochodzące z wzbudzonego singletowego stanu molekuł chlorofilu w PSII. Ponadto, absorpcji energii fotonów przez walencyjne elektrony Mg chlorofilu towarzyszy: rezonans, rozpraszanie energii jako ciepło i fluorescencja, oraz generowanie $^1\text{O}_2$ i $^1\text{Car}^*$, które również mogą stanowić pierwotne źródło sygnałów i informacji o zmiennych warunkach świetlnych. Ten typ retrosygnatów obejmuje również zmiany wtórne tj. zakwaszenie chloroplastu, aktywację cyklu ksantofilowego, syntezę kwasu abscysynowego oraz hipotetyczny proces (niezweryfikowany eksperymentalnie) zmian objętości chloroplastów i ich temperatury. Wskazane pierwotne i wtórne elementy indukcji retrosygnatów przez kwanty światła, częściowo powiązane zostały z regulacją ekspresji jądrowych genów kodujących APX1 i APX2 (marker molekularny SAA, publikacja 2). Drugi typ potencjalnych retrosygnatów chloroplastowych obejmuje mechanizmy transportu elektronów walencyjnych pomiędzy donorowymi i akceptorowymi cząsteczkami (zmiany redoks) poszczególnych przekaźników fotosyntetycznego transportu elektronów w obrębie PSII (np. PQ/PQH₂), glutationu (GSH/GSSG), askorbinianów (ASA/DHA), oraz zmiany redoks generowane w PSI i związane z cyklicznym transportem elektronów, NADP/NADPH, oraz aktywnością ferredoksyny, tioredoksyny i glutaredoksyny. Dodatkowo, wskazałam, że podczas regulacji odpowiedzi na EEE, glutation jest związkiem zintegrowanym genetycznie i fizjologicznie z kwasem salicylowym. Wyniki własnych analiz wskazały natomiast, że zmiany wolnej i związanej formy kwasu salicylowego są zależne od natężenia i barwy użytego światła. Światła

o długości fali odpowiadającej barwie białej i czerwonej, które były najbardziej efektywne w indukcji mechanizmów aklimacyjnych i odpornościowych (publikacja 2), również w najwyższym stopniu indukowały akumulację wolnej formy kwasu salicylowego, niezbędnej w szybkich odpowiedziach na stres, jak i związanej formy kwasu salicylowego, która może stanowić łatwo dostępną pulę w późniejszym czasie np. podczas infekcji przez patogena (publikacja 3). Wymienione powyżej związki mogą być cząsteczkami przekaźnikowymi samymi w sobie, lub z pośrednictwem innych regulatorów np. LESION SIMULATING DISEASE 1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 i PHYTOALEXIN DEFICIENT 4, które znane są jako molekularne regulatory programowanej śmierci komórki, SAA i SAR. Suma zmian tych sygnałów związana jest ze specyficzną transkrypcją licznych genów jądrowych np: *LHC* (*LIGHT-HARVESTING COMPLEX*), *RbcS* (*RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE SMALL SUBUNIT*), *ELIP* (*EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN*), *APX1* i *APX2*, (*ASCORBIC PEROXIDASE 1* i *2*), *PRI* (*PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*). Ścieżki opisanych dwóch typów retrosygnali mogą również krzyżować się wzajemnie, ponieważ wielokrotnie stwierdzono interakcję pomiędzy ROS a glutationem, kwasem salicylowym, kwasem askorbinianowym i NADP. Kolejny, trzeci typ sygnałów obejmuje produkty końcowe fotosyntezy (np. cukry), oraz anabolizm i katabolizm chlorofilu, natomiast czwarty typ jest związany z PEPS, opisanym szczegółowo w publikacji 2. Dodatkowo praca zawiera hipotezy, rozszerzające działanie czwartego typu retrosygnali, o potencjalną integrację PEPS z systemowym generowaniem $^1\text{O}_2$ i $^1\text{Chl}^*$.

W odpowiedzi na kontrowersje zawarte w prasowych recenzjach dotyczących pracy 2 rozszerzyłam również problematykę „pamięci komórkowej” i definicji „inteligencji” w aspekcie adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Integralna rola transdukcji sygnałów wsparta została teorią Peak i in. (2004) opisującą rozprzestrzenianie się zmian fluorescencji chlorofilu *a* i przewodnictwa szparkowego w obrębie liścia według algorytmu matematycznego i funkcji sinus/1-sinus (odpowiednio dla fluorescencji chlorofilu *a*/przewodnictwa szparkowego). Powiązanie założeń Peak i in. (2004) z postawionymi hipotezami i uzyskanymi wynikami (prace 1-3) daje podstawy do znacznie bardziej kompleksowego opisu mechanizmów integrujących systemowe procesy aklimatyzacji do stresów abiotycznych z indukcją odporności na stresy biotyczne. Rozprzestrzeniający się falowo PEPS z szybkością zbliżoną do rozprzestrzeniania się zmian opisanych przez Peak i in. (2004) jest elementem, który łączy opisane przez nas mechanizmy programowanej śmierci komórki, SAA, SAR z algorytmowo opisanym mechanizmem przetwarzania informacji na poziomie liścia i indukowania odpowiedzi w komórkach, które nie doświadczyły bezpośrednio działania czynnika stresowego.

Cel 4 (publikacja 4) Aklimacja do światła, retrosygnali, śmierć komórkowa i mechanizmy obronne roślin

Kolejna praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego podyktowana była potrzebą określenia roli programowanej śmierci komórki w procesach aklimatyzacji do stresu wysokiego natężenia światła i indukcji odporności na patogeny. Na podstawie dostępnej literatury skonfrontowałam hipotezy własne z powszechnie panującymi poglądami. Zachowałam formę artykułu przeglądowego, który uzupełniłam wynikami analizy indukcji sygnału elektrycznego oraz przebiegu infekcji po ekspozycji na światło o różnej długości fali.

W pracy wskazałam, że konsekwencją zaburzeń rozpraszania nadmiaru energii jest powstanie tlenu singletowego, jego udział w procesie peroksydacji lipidów, utrata integralności chloroplastów i uruchomienie programowanej śmierci komórki. Obecność i stan fizjologiczny chloroplastów determinuje te procesy, ponieważ programowana śmierć komórki zachodzi wyłącznie w komórkach zawierających w pełni rozwinięte chloroplasty. Postawiłam również założenie, że jeżeli indukowana przez nadmiar energii wzbudzenia śmierć komórki jest regulowana przez ten sam genetyczny system jak reakcje nadwrażliwości i odporność na

patogeny, to interakcja obu procesów zachodzić może za pośrednictwem wspólnych retorosygnalów. Prezentując wyniki własne wskazałam zatem związek pomiędzy: typem sygnałów, rodzajem światła (o różnej długości fali z zakresu białego, niebieskiego, czerwonego) oraz indukcją śmierci komórki po ekspozycji na odpowiednie światło i infekcji patogenem wirulentnym *Pseudomonas syringae*. Wskazałam również, że mutant *A. thaliana lsd1*, który indukuje reakcje nadwrażliwości i niekontrolowaną śmierć komórki, w warunkach EEE, infekcji, podczas długiego fotoperiodu i chłodu, może stanowić model do badań, które wskażą na jakim poziomie odpowiedzi obronne i aklimatyzacyjne są regulowane wspólnie. Na podstawie literatury przedstawiłam dowody, że drogi sygnałowe zależne od LSD1 obejmują regulację reakcji nadwrażliwości za pośrednictwem:

- (1) kodowanych przez geny odporności (*R*-genes) białek NBS-LRR (NUCLEOTIDE-BINDING SITE LEUCINE-RICH REPEAT proteins); białka te rozpoznają efekторы patogena i aktywują odpowiedzi obronne;
- (2) zintegrowanych procesów produkcji $O_2^{\cdot-}$ przez palazmolemowe *AtrbohD*, oksydoreduktazy zależne od NADPH i kwasu salicylowego;
- (3) kontroli aktywności czynników transkrypcyjnych; również sam LSD1 może pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego i regulować wiele genów zaangażowanych zarówno w SAA i SAR, jak również inne procesy zależne od śmierci komórki lub/i aklimatyzacji np. formowanie aerenchymy i starzenie tkanek;
- (4) zmian NPQ, poziomu etylenu, kwasu salicylowego, H_2O_2 i aktywności systemu antyoksydacyjnego oraz przewodności szparkowej;
- (5) integracji funkcjonowania LSD1 i dwóch białek zaangażowanych w podstawową odporność roślin na patogeny tj. EDS1 i PAD4; ich współdziałanie wpływa na poziom ROS, kwasu salicylowego i etylenu oraz odpowiada za tkankowo specyficzną śmierć komórki np. w procesie formowania aerenchymy w korzeniach eksponowanych do stresu hypoksji.

Ponadto zaproponowałam w artykule 3 schematyczny podział retorosygnalów w zależności od czasu ich indukcji. Wyróżniłam cztery przedziały czasowe: nano – mikrosekundy dla indukcji zmian związanych z absorpcją energii w PSII i PSI, łańcuchu przekaźników fotosyntetycznego transportu elektronów, oraz generacją ROS; mikro – milisekundy dla reakcji redoks wtórnych przekaźników informacji, reakcji hormonalnych i zmian poziomu CO_2/O_2 ; sekundy - minuty dla odpowiedzi na poziomie białek LDS1/EDS1/PAD4, przewodności szparkowej, fotorespiracji, systemu antyoksydacyjnego; oraz minuty – godziny - dni dla odpowiedzi na poziomie morfologii tkanek, śmierci komórki, SAA, SAR, formowania aerenchymy i starzenia.

Na podstawie literatury, wskazałam i przedyskutowałam możliwość zaangażowania również innych czynników w przekazywanie informacji z chloroplastów do jądra komórkowego podczas indukcji programowanej śmierci komórki: MEcPP (methylerythritol cyclodiphosphate), PAP (3'-phosphoadenosine 5'-phosphate) i enzym SAL1 (bifunctional 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase) regulujący poziom PAP, hem, β -cyclocitral, HSP90 (heat shock protein), sygnały fotoelektrofizjologiczne.

Cel 5 (publikacja 5) Wpływ PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4) na metabolizm ROS, właściwości ściany komórkowej i drewna topoli hybrydowej (*Populus tremula* L. x *tremuloides*)

Jedno z kolejnych założeń zweryfikowanych eksperymentalnie dotyczyło czynników regulacyjnych, dotychczas określanych prawie wyłącznie w aspekcie interakcji roślina-patogen. Jak wskazałam w zaprezentowanej publikacji 4, regulacja ścieżek sygnałowych z udziałem LSD1/PAD4/EDS1 stanowi ważny etap indukcji SAA i SAR. LSD1 w warunkach laboratoryjnych i polowych scharakteryzowano dla *Arabidopsis* w trzech pracach, w których jestem współautorem (Mühlenbock et al. 2008, Wituszyńska i in. 2013, 2015). PAD4 do tej pory został scharakteryzowany wyłącznie w warunkach laboratoryjnych dla *Arabidopsis*

thaliana. *AtPAD4* koduje TGL (TRIACYLGLYCEROL LIPASE) i jest wymagany dla aktywacji genów odporności (*R* genes), metabolizmu kwasu salicylowego, etylenu, ROS, i dalej indukcji aklimatyzacji i śmierci komórki (Wituszyńska i in. 2013). Prezentowana praca 5 stanowi pierwsze doniesienie dotyczące weryfikacji funkcji *PAD4* u gatunku innego niż *Arabidopsis thaliana*, w warunkach stresów wieloczynnikowych (warunki naturalne) i w aspekcie holistycznej regulacji procesów przystosowawczych do zmiennych warunków środowiska. Celem przeprowadzenia eksperymentów dziki typ topoli *Populus tremula x tremuloides* t89 został transformowany za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* i z niezależnych zdarzeń transformacyjnych wyprowadzone zostały trzy linie o różnym poziomie wyciszenia ekspresji homologów *PAD4*. Eksperymenty przeprowadzone dla tych linii wskazały, że morfologia trzyletnich drzew transgenicznych z warunków polowych nie różni się w sposób istotny od roślin kontrolnych dzikiego typu. Równocześnie jednak, wyciszenie genu *PAD4*, podobnie jak u *Arabidopsis*, powoduje zmiany w metabolizmie ROS. Zaobserwowałam bowiem akumulację H_2O_2 , wyższą aktywność manganowej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) i katalazy (CAT). Zmiany te obserwowane zarówno w liściach jak i pędach, pozytywnie skorelowane były z formowaniem tkanek drewna oraz ich właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Podczas analiz poprzecznych przekrojów pędów transgenicznych roślin stwierdziłam wyższe tempo podziału komórek (szerszy pierścień ksylemu, spowodowany większą liczbą poszczególnych warstw komórek), zredukowane tempo śmierci komórek, wzrost grubości wtórnej ściany komórkowej (spowodowany głównie odkładaniem się kolejnych warstw celulozy, ale nie lignifikacji), zmniejszenie średniej wielkości i liczby tracheidów. Te cechy cytologiczne przekładały się na zmiany parametrów fizycznych i mechanicznych drewna pochodzącego z roślin transgenicznych w porównaniu do dzikiego typu. Obserwowałam większą gęstość, obniżone pęcznienie podczas hydratacji tkanek oraz większą elastyczność drewna.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że *PAD4*, który bierze udział w procesach obronnych i patogenezie, może być również uniwersalnym regulatorem zmian dostosowawczych w szerszym aspekcie, głównie pośrednicząc w regulacji metabolizmu ROS, podziałów komórkowych/śmierci komórki oraz formowania tkanek drewna i biosyntezy celulozy.

Cel 6 (publikacja 6) Zależny od fotosyntezy fizjologiczny i genetyczny "crosstalk" pomiędzy aklimacją do chłodu i indukowaną przez chłód odpornością pszenżyta ozimego (*Triticosecale Wittm.*) na patogena grzybowego

Reakcje roślin specyficzne dla EEE i śmierci komórki mogą być indukowane zarówno przez światło o wysokim natężeniu w temperaturze zbliżonej do optymalnej dla wzrostu, jak również przez światło o znacznie niższym natężeniu w warunkach obniżonej temperatury (chłodu). W obu przypadkach nadmiar energii wzbudzenia, nie może być wykorzystywany do asymilacji CO_2 , natomiast zgodnie z zaprezentowanymi dotychczas wynikami prac 1-5 oraz badaniami przedstawionymi w kolejnych pracach 6-8, nadmiar energii wzbudzenia może być użyty do uruchomienia zintegrowanych mechanizmów kontroli odpowiedzi aklimatyzacyjnych, odpornościowych i rozwojowych.

Integrację mechanizmów regulacji odporności względem patogena z aklimacją do niskiej temperatury w obecności światła o standardowym natężeniu optymalnym dla wzrostu testowałam w układzie doświadczalnym: pszenżyto ozime - patogen grzybowy *Microdochium nivale*. Przeprowadzone analizy wykazały, że traktowanie młodych siewek przez 28 dni niską temperaturą w warunkach światła indukuje odporność na infekcję, jednak odporność ta jest zależna od genotypu rośliny. Uruchamianie reakcji odpornościowych na poziomie fizjologicznym i genetycznym (publikacja 6 i Szechyńska-Hebda et al. 2011) obserwowałam bowiem wyłącznie dla niektórych odmian lub niektórych linii populacji mapującej, podczas, gdy inne odmiany i linie nie nabywały odporności pomimo zastosowania wcześniejszego chłodzenia. Jednym z czynników determinujących efektywną odporność było szybsze

kiełkowanie i rozwój liści, a w konsekwencji wcześniejsze uzyskanie metabolicznej dojrzałości chloroplastów, efektywniejszy proces fotosyntezy i dostarczenie energii niezbędnej do produkcji metabolitów zaangażowanych w reakcje obronne. Mechanizm tych procesów obejmował również dostosowanie reakcji w PSII. Genotypy, zdolne do rozwinięcia odporności w warunkach światła i temperatur chodowych, charakteryzowała wyższa maksymalna fotochemiczna wydajność PSII (ang. maximum quantum yield of PSII) oraz bardziej efektywna integracja reakcji świetlnej i ciemnej fazy fotosyntezy (ang. performance index). Genotypy te podczas chłodzenia indukowały również aktywne mechanizmy ochrony przed stresem oksydacyjnym, w tym peroksydazy usuwające nadmiar H_2O_2 . Optymalizacja fotosyntezy i aklimacja do stresu umożliwiały szybkie omijanie faz wzrostu roślin wrażliwych na infekcję grzybową. Te same mechanizmy umożliwiały szybką regenerację roślin w okresie po infekcji. Wykazałam także, że zależna od fotosyntezy aklimacja do chłodu, odporność na patogena indukowana chłodem, akumulacja biomasy, wzrost i aktywność systemu antyoksydacyjnego była zintegrowana nie tylko na poziomie fizjologicznym, ale również genetycznym. Moje badania wykonane dla populacji mapującej SaKa3006 x Modus złożonej z 95 linii podwojonych haploidów dowiodły, że określone grupy genów kontrolujące aklimację do chłodu i indukcję odporności były wspólnie regulowane przez sygnały zależne od fotosyntezy. Na chromosomach 5B i 7R znalazłam rejony zawierające *loci* cech ilościowych (QTL, ang. Quantitative Trait Loci) zlokalizowane w tej samej, wspólnej pozycji dla zmian efektywności fotosyntezy podczas chłodzenia, regulacji rozwoju liści, akumulacji świeżej i suchej masy, aktywności peroksydaz, i odporności na *M. nivale*. Ponadto, celem dalszej weryfikacji zależności pomiędzy odpowiedziami aklimatyzacyjnymi i odpornościowymi oraz roli fotosyntezy i systemu antyoksydacyjnego w tych procesach, przeprowadziłam metaanalizę eksperymentów mikromacierzowych z użyciem narzędzia Genevestigator, bazując na platformie Affymetrix Wheat Genome Array. Stosując klastrowanie hierarchiczne wskazałam, że 83 transkrypty związane z PSII miały podobny profil ekspresji dla roślin traktowanych chłodem i infekowanych patogenami grzybowymi. Ten sam system eksperymentalny zastosowany dla równoczesnej analizy 46 transkryptów związanych z peroksydazami wskazał na podobną modulację wzoru ekspresji podczas aklimacji chłodowej i odpowiedzi obronnych, z zastrzeżeniem, że infekcja wpływała bardziej efektywnie na zmiany ekspresji. Zarówno peroksydazy askorbinianowe, jak i glutationowe wydają się odgrywać kluczową rolę w tych procesach.

Cel 7 (publikacja 7) Wpływ indukowanych chłodem zmian w fizycznych i chemicznych właściwości liścia na odporność pszenżyta ozimego *Microdochium nivale*

Szybszy rozwój liści i pędów odmian, które łatwiej aklimatyzują się do chłodu i indukują reakcje obronne, umożliwia efektywniejsze procesy metaboliczne, w tym jak wskazano w poprzedniej pracy, proces fotosyntezy. Wraz z szybkim różnicowaniem komórek i liści postępuje wzmacnianie ich tkanek, zarówno na poziomie ściany komórkowej jak i na poziomie powierzchni epidermy. Cecha ta stanowi istotny czynnik determinujący podstawowe reakcje obronne. Różną efektywność odporności na patogena grzybowego *M. nivale* w zależności od potencjału roślin pszenżyta ozimego do fortyfikacji tkanek młodych liści zaobserwowałam podczas eksperymentów opisanych w pracy 7.

Pierwsza obserwacja wskazująca rolę wzmocnienia tkanek związana była z liniowym wzrostem odporności na patogena wraz z wydłużaniem okresu traktowania chłodem od 0 do 98 dni. Podobnie, jak w poprzedniej pracy, obserwowałam ścisłą zależność od genotypu rośliny. Dodatkowe przesłanki stanowiły mikroskopowe analizy, które pozwoliły na zaobserwowanie specyficznego wzrostu strzępek grzybowych w zależności od stopnia odporności. Strategia grzyba umożliwiająca dostęp do zasobów odżywczych odpornego gospodarza polegała na penetracji tkanek liści za pośrednictwem aparatów szparkowych, a następnie biotroficznym wzroście pojedynczych strzępek w przestrzeniach międzykomórkowych i wytwarzaniu

pojedynczych haustoriów w obrębie ściany komórek mezofilu. Przeciwnie, destruktywną nekrotroficzną infekcję obserwowałam dla liści roślin nieodpornych, gdzie strzępki grzybni przerastały bezpośrednio przez epidermę, mezofil i nawet tkanki przewodzące. Różny sposób infekcji spowodowany był zmianami właściwości fizycznych i chemicznych powierzchni liści odpornych, które zapobiegały zarówno adhezji grzybni *M. nivale*, jak i bezpośredniej penetracji strzępek. Liście roślin odpornych, rozwijające się w niskiej temperaturze, charakteryzowały się bardzo dużą hydrofobowością. Było to konsekwencją wykształcenia na powierzchni licznych drobnych struktur, jak i obecności substancji o charakterze lipidów, wosków, fenoli itp. które zapobiegały bezpośredniemu zwilżaniu powierzchni. Te cechy liścia niekorzystnie wpływają na wzrost grzyba silnie zależnego od obecności wilgoci. Dodatkowo ściany komórek położonych pod epidermą (mezofil, tkanki przewodzące) charakteryzowały się obniżoną przepuszczalnością, co ma znaczenie dla ograniczenia dyfuzji grzybowych enzymów trawiących ściany komórkowe gospodarza. Specyficzna stabilność ściany komórkowej, która może przeciwdziałać również mechanicznemu oddziaływaniu strzępek, została potwierdzona w kolejnych eksperymentach z wykorzystaniem równoczesnej analizy termograwimetrycznej, różnicowej kalorymetrii skaningowej i spektrometrii masowej. Na podstawie wyników badań proponowałam, że stabilność ściany komórek odpornych jest związana ze specyficznym ułożeniem długich mikrofibrilli celulozowych w ściśle zwarte agregaty o charakterze krystalicznym.

Doświadczenia zawarte w tej pracy wskazują, że sygnały uruchamiane przez nadmiar energii wzbudzenia za pośrednictwem odpowiednich retrosygnatów (opisanych w publikacjach 1-5) mogą odpowiadać za integrację mechanizmów odpornościowych i aklimatyzacyjnych również na poziomie podstawowych reakcji obronnych tj. wzmacniania tkanek i ściany komórkowej przed odpowiednią modyfikacją jej właściwości chemicznych i fizycznych. Cechy te zabezpieczają bowiem holistycznie roślinę: zarówno przed atakiem patogena, jak i są przydatne przy nagłym obniżeniu temperatury (zapobieganie utracie wody, zabezpieczenie przed rozrywaniem tkanek przez formujące się kryształy w temperaturach ujemnych).

Cel 8 (publikacja 8) *Wpływ endogennego nadtlenu wodoru indukowanego w warunkach traktowania chłodem na poprawę efektywności regeneracji*

Prace 1-5 wykazały szczególną rolę nadtlenu wodoru i systemu antyoksydacyjnego w indukcji dróg sygnałowych, których źródłem są chloroplasty oraz w procesach aktywnej integracji mechanizmów aklimatyzacyjnych i odpornościowych. Natomiast prace 5-7 prezentowały wyniki wskazujące, że efektywność aklimatyzacji, odporności i rozwoju może być zależna od modyfikacji na poziomie podziałów komórkowych, śmierci komórki i właściwości ściany komórkowej. Wspólne założenia wymienionych prac potwierdziłam również na poziomie rozwoju i morfogenezy w kulturach *in vitro*. Wyniki zamieszczone w kolejnej publikacji 8 wskazują, że podwyższona koncentracja endogennego H_2O_2 , jego specyficzna lokalizacja subkomórkowa i kontrola przez system antyoksydacyjny jest skorelowana z intensywnymi podziałami komórkowymi, z dyferencjacją i w konsekwencji wielkością komórek (zależną od właściwości ścian komórkowych), oraz z uruchamianiem określonych programów morfogenezy. Kultury *in vitro* pszenicy ozimej i bobiku, które wykazywały kompetencję do łatwej regeneracji pędów charakteryzowały się małymi komórkami wypełnionymi gęstą cytoplazmą, z dużym potencjałem do podziałów. Przeciwnie, kultury nieregenerujące miały duże, silnie zwakuolizowane komórki, łatwo obumierające. Dla obu analizowanych gatunków stwierdziłam, że na każdym etapie kultury, począwszy od wyjściowego eksplantu, indukcji kalusa oraz po zainicjowaniu procesu morfogenezy (embriogenezy w przypadku pszenicy i organogenezy w przypadku bobiku), tkanki kompetentne do regeneracji charakteryzowały się wysoką zawartością H_2O_2 i jednocześnie silną odpowiedzią systemu antyoksydacyjnego na poziomie aktywności białek i ekspresji genów kodujących te białka (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy). Jednocześnie kultury

kompetentne łatwiej ulegały aklimatyzacji do stresu niskiej temperatury (ale nie wysokiej temperatury) i w tych warunkach regeneracja pędów przebiegała z większą efektywnością. Również, analiza efektywności regeneracji na pożywkach uzupełnionych substancjami modyfikującymi poziom stresu oksydacyjnego dostarczyła dodatkowych dowodów, potwierdzających hipotezę, że H_2O_2 jest czynnikiem kontrolującym procesy wzrostowe i rozwojowe oraz regulatorem cyklu komórkowego. Zastosowanie egzogenne H_2O_2 oraz inhibitora katalazy (3-aminotriazole) indukowało powstawanie pędów, natomiast inhibitor SOD i FeEDTA silnie ograniczał kompetencje tkanek do regeneracji. Reasumując, po raz kolejny wskazałam, że H_2O_2 może być uniwersalnym przekaznikiem dla indukcji holistycznych odpowiedzi zależnych od podziałów komórkowych/śmierci komórki.

Podsumowanie

Wyniki moich badań konfrontują klasyczne podejście do reakcji aklimatyzacyjnych, odpornościowych i rozwojowych z nowymi hipotezami. W pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wskazałam, że procesy te mogą być zależne od absorpcji nadmiaru energii światła. Zmiany w intensywności światła, jego jakości, lub zmiany innych czynników, w tym temperatury, indukują nadmiar energii wzbudzenia, który przekracza poziom wymagany dla procesu fotosyntezy. W takich warunkach możliwa jest indukcja retrosygnatów, które uruchamiają odpowiednie programy komórkowe, regulują podziały komórkowe i śmierć komórki, odpowiedzi aklimatyzacyjne i odpornościowe. Rośliny rozwinęły system genetyczny, który holistycznie reguluje te procesy, umożliwiając funkcjonowanie w zmiennych warunkach środowiska. Bazując na tych wynikach, wraz z współpracownikami grupy badawczej prof. Stanisława Karpińskiego, zgłosiłam jako współautor 2 patenty, dotyczące metod polepszania wzrostu roślin, zwiększania odporności na patogeny i aklimacji do stresów środowiskowych, poprzez ich ekspozycję na światło o określonej intensywności (WO/2011/154522) oraz poprzez współdziałanie określonych genów zależnych od nadmiaru energii wzbudzenia (WO/2013/093637).

Literatura

Arias i in. (2003) *Phytopathol Z* 151:267; Ball i in. (2004) *Plant Cell* 16:2448; Berger i in. (2004) *Physiol Plant* 122:419; Chang i in. (2004) *Plant J* 38:499; Clarke i in. (2004) *Plant J* 38:432; Coll i in. (2011) *Cell Death Differ* 18:1247; Frenkel i in. (2009) *BMC Plant Biology* 26:9; Fryer i in. (2003) *Plant J* 33:691; Fufezan i in. (2002) *FEBS Lett* 532:407; Karpiński i in. (1997) *Plant Cell* 9:627; Karpiński i in. (1999) *Science* 284:654; Kunkel i Brooks (2002) *Cur Opin Plant Biol* 5:325; Luna i Ton (2012) *Plant Signal Behav* 1:615; Luna i in. (2012) *Plant Physiol* 158:844; Mateo i in. (2004) *Plant Physiol* 136:2818; Mühlenbock i in. (2007) *Plant Cell* 19:3819; Mühlenbock i in. (2008) *Plant Cell* 20:2339; Peak i in. (2004) *PNAS* 101:918; Sharma i in. (1996) *PNAS USA* 93:5099; Szechyńska-Hebda (2010) *Plant Cell* 22:2201; Szechyńska-Hebda et al (2011) *Plant genetic resources* 9:296; Szechyńska-Hebda i in. (2012) *Plant Pathology* 62:867; Szechyńska-Hebda i in. (2015) *J Plant Physiol* 177:30; Wendehenne i in. (2001) *Trends Plant Sci* 6:177; Wituszyńska i in. (2013) *Plant Physiology* 161:1795; Wituszyńska et al (2015) *Plant, Cell & Environment* 38: 315–330; Yang i Pfister (2006) *Mycologia* 98:535.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Oprócz opisanych powyżej, głównych zainteresowań zawodowych, w trakcie mojej kariery naukowej, podejmowałam różnorodne tematy badawcze. W moich badaniach stosowałam interdyscyplinarne podejście obejmujące w sposób szczególny fizjologię, biologię komórki, biologię molekularną, biochemię i biofizykę.

Na początku kariery naukowej, moje badania koncentrowały się na wpływie krótkich ciepłych przerw podczas chłodnej wiosny na procesy fizjologiczne i produktywność kukurydzy, ze szczególnym uwzględnieniem zmian antyoksydacyjnego systemu enzymatycznego. Analizowane warunki środowiskowe są specyficzne dla wiosny w Europie Środkowej, dlatego podjęta tematyka była aktualna również w aspekcie praktycznym. Stwierdziłam, że zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych dla genotypów wrażliwych i odpornych na chłód były istotnie związane z fluktuacjami temperatury. Nawet bardzo krótkie ciepłe przerwy w okresie chłodu znacznie zwiększały aktywność katalazy w odpornych genotypach. Zmiany temperatury tylko w niewielki sposób wpływały na aktywność dysmutazy nadtlenkowej obu genotypów. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowałam, że aklimatyzacja do chłodu i deaklimatyzacja w wyższych temperaturach są zależne od stresu oksydacyjnego, zwłaszcza zbalansowania nadprodukcji H_2O_2 i jego rozkładu przez system antyoksydacyjny. W siewkach kukurydzy wrażliwych na chłód mniej sprawny enzymatyczny system antyoksydacyjny powodował gromadzenie nadmiaru H_2O_2 podczas zmian temperaturowych, prawdopodobnie do poziomu, przy którym białka ulegały uszkodzeniom oksydacyjnym.

W kolejnych latach podjęłam próbę określenia mechanizmów i sposobu oddziaływania naturalnych i syntetycznych regulatorów wzrostu z błonami komórkowymi roślin, oraz wyjaśnienia roli tych interakcji podczas embriogenezy somatycznej *in vitro*. We współpracy z prof. M. Filek (Instytut Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk), dr. M. Zembalą (Instytut Katalazy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk), prof. P. Laggner (Institute of Biophysics and X-ray Structure Research, Austrian Academy of Sciences, Austria) i prof. K. Trębaczem (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin), wniosłam znaczący wkład naukowy w tej dziedzinie, wskazując, że auksyny i cytokininy w sposób specyficzny są adsorbowane do fosfolipidowych/sterolowych i białkowych domen w plazmolemie komórek pszenicy. 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) łatwiej był adsorbowany do fosfolipidów i białek komórek nieembriogennych, podczas gdy kinetyna specyficznie wiązała się z fosfolipidami i białkami membran komórek embriogennych. Wyniki te wyjaśniły, dlaczego obecność auksyn jest niezbędna do wzrostu komórek nieembriogennych, natomiast obecność cytokinin jest istotna dla komórek embriogennych. Ponadto, wskazałam, że absorbowane fitohormony mogą zmienić właściwości fizyczne domen błonowych np. przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej i kanałów jonowych, powierzchniowego ładunku elektrycznego lipidów i białek, a także grubości dwuwarstwy lipidowej. Szczególnie znaczący był wpływ auksyn i ich analogów chemicznych na zmiany grubości dwuwarstwy lipidowej plazmolemy komórek embriogennych. Regulatory wzrostu zmieniały grubość membrany komórek embriogennych do rozmiaru obserwowanego dla membran nieembriogennych, tym samym uzasadniając praktyczne podejście laboratoryjne, w którym usunięcie regulatorów jest wymagane do wywołania procesu embriogenezy somatycznej. Ponadto zearalenon (toksyna grzybowa) był podobny do cytokinin w oddziaływaniu z błonami, jednakże jego wpływ fizjologiczny i fizyczny zależał w większym stopniu od pochodzenia kultury (wyjściowego eksplantu) niż embriogennych właściwości komórek.

Antyoksydacyjny układ enzymatyczny komórek embriogennych podlegał również zmianom pod wpływem zearalenonu w komórkach embriogennych. Wyniki moich badań wykazały wpływ zearalenonu na dysmutazę nadtlenkową, katalazę i peroksydazę, a w konsekwencji na poziom endogennego H_2O_2 . Badania kontynuowałam w ramach projektu

badawczego: "Rola stresu oksydacyjnego w różnicowaniu roślin i procesach regeneracji". Wyniki uzyskane podczas jego realizacji wskazały, że regeneracja kalusa jest związana z produkcją reaktywnych form tlenu modulowanych przez poszczególne regulatory wzrostu. Najwyższą aktywność enzymów obserwowałam w komórkach nieembriogennych po zastosowaniu auksyny oraz w komórkach embriogennych po zastosowaniu cytokininy. Zmiany we wzorze aktywności poszczególnych izoform SOD obserwowałam w kulturach kalusa, hodowanych na pożywkach z dodatkiem auksyny i zearalenonu. W wyniku mojej pracy eksperymentalnej postawiłam konkluzję, że reaktywne formy tlenu pod kontrolą komórkowego systemu antyoksydacyjnego mogą pośredniczyć w szlakach sygnałowych indukowanych przez egzogennie zastosowane regulatory wzrostu i odpowiedziach morfogenetycznych komórek. W kolejnych badaniach wskazałam również różnice pomiędzy embriogenezą somatyczną regenerujących komórek oraz różnicowaniem komórek nieembriogennych na poziomie metylacji DNA.

W ramach projektu "Przygotowanie i mikroiniekcja sztucznych liposomów dla badań formowania pierwotnej ściany komórkowej" realizowanego w Plant Cell Biology Laboratory, Wageningen University, przeprowadziłam eksperymenty mające na celu poznanie i zrozumienie mechanizmów formowania pierwotnej ściany po podziale komórkowym. Badania pozwoliły uzyskać odpowiedzi na następujące pytania: Czy wprowadzone przy pomocy mikroiniekcji sztuczne liposomy mogą być transportowane i rozmieszczone w komórce? Jaki mechanizm jest związany z ich ruchem? Czy jest to mechanizm oparty na dyfuzji, czy też sztuczne liposomy mogą być transportowane czynnie lub biernie za pomocą przepływu hydrodynamicznego? Czy mogą one być transportowane w fragmoplastie? Czy podczas cytokinezy ulegają fuzji z rozwijającą się pierwotną barierą pomiędzy komórkami potomnym, podobnie jak naturalne pęcherzyki aparatu Golgiego? W komórkach, naturalne organella transportowane są wzdłuż elementów cytoszkieletu, głównie mikrotubul i aktynowych filamentów, które mają różną konfigurację zależną od fazy cyklu komórkowego. W komórce między podziałami organella przemieszczane są głównie w niciach cytoplazmatycznych, w komórce dzielącej się najistotniejszy jest transport pęcherzyków pochodzących z aparatu Golgiego poprzez fragmoplast dla tworzenia pierwotnej bariery pomiędzy dwoma komórkami potomnymi. Analizy z zastosowaniem metody mikroiniekcji wykazały, że zachowanie sztucznych liposomów jest zależne od sposobu ich wprowadzenia do komórki. Gdy małą ilość fluorescencyjnie znakowanych sztucznych liposomów wstrzyknęłam do komórek włosków pręcika *Tradescantia virginiana* pęcherzyki rozmieszczone zostały w komórce przez transport aktywny, zależny od opłaszczenia pęcherzyków naturalnymi białkami motorycznymi. Większa ilość liposomów transportowana była natomiast z udziałem przepływu hydrodynamicznego. W komórkach dzielących się mikroiniekcja sztucznych liposomów powodowała transport pęcherzyków poprzez fragmoplast i ich akumulację w powstającej ścianie komórkowej. Dodatkowym efektem mojej pracy była optymalizacja protokołu znakowania mikrotubul i filamentów aktynowych metodą „whole mount immunolabeling”. Zoptymalizowana metoda pozwoliła na lepszą wizualizację organizacji mikrotubul i aktynowych filamentów podczas kolejnych etapów podziału komórki. Uzyskane i opublikowane wyniki wskazały możliwość stosowania tej metody do znakowania i analizy różnych białek i cząsteczek w komórkach roślinnych.

Inną podjętą tematyką badań była interakcja pomiędzy patogenami a komórką roślinną oraz modyfikacje tych interakcji przez stresy abiotyczne. Podczas dwuletniego projektu MC Intra-European Fellowship realizowanego na Uniwersytecie w Sztokholmie, a następnie projektu Welcome realizowanego w SGGW w Warszawie, brałam udział w badaniach, których celem była identyfikacja funkcjonowania regulatorów białkowych LSD1/EDS1/PAD4 (LESION SIMULATING DISEASE1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, PHYTOALEXIN DEFICIENT4). Wraz z innymi naukowcami wskazałam, że białka te zaangażowane są w kontrolę programowanej śmierci komórki (odpowiedzi nadwrażliwości),

odpowiedzi aklimatyzacyjne do EEE, holistyczne odpowiedzi nabytej oporności i podstawowe odpowiedzi obronne. EDS1 i PAD4 zostały wskazane przez nas jako białka podlegające regulacji przez etylen za pośrednictwem EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2), przez APX2 (ASCORBATE PEROXIDASE2) oraz ROS. Ekspozycja roślin *Arabidopsis* do nadmiaru światła białego lub światła o długości fali 680 nm, ale nie światła o długości fali 700 nm, indukowała programowaną śmierć komórki. Ekspozycja na światło z jednoczesnym traktowaniem roślin etylenem zwiększała zasięg programowanej śmierci komórki, podczas gdy indukcja śmierci komórek mutantów z ograniczoną produkcją etylenu, była istotnie mniejsza. LSD1 również był zaangażowany w regulację odpowiedzi aklimatyzacyjnych do EEE, jako negatywny regulator PAD4 i EDS1. Rośliny *lsd1*, fenotypowo związane z uruchamianiem śmierci komórki, miały znacząco podwyższoną produkcję etylenu oraz nadtlenu wodoru po ekspozycji na czynniki odpowiedzialne za redukcję plastochinonu. Ta akumulacja etylenu i nadtlenu wodoru była ograniczona w podwójnych mutantach *pad4/lsd1* i *eds1/lsd1*. Ponadto niekontrolowana śmierć komórek w *lsd1* została zmniejszona w roślinach z mutacją *EIN2*, który koduje receptor etylenowy.

Rola LSD1/EDS1/PAD4 okazała się kluczowa w regulacji wzrostu roślin *Arabidopsis* i plonu nasion nie tylko w laboratorium, ale również w warunkach polowych. Niespodziewanie *lsd1*, o którym wiadomo, że wykazuje niekontrolowaną śmierć komórek w niesprzyjających warunkach, okazał się być bardziej tolerancyjny na stres suszy w połączeniu ze stresem powodowanym przez wysokie natężenie światła. Efekt ten był zależny od zmian w efektywności wykorzystania wody, zmian poziomu kwasu salicylowego i stężenia nadtlenu wodoru, modulacji maksymalnej wydajności fotosystemu II oraz profilu transkrypcyjnego. Uzyskane wyniki wskazały, że LSD1 vs EDS1 i PAD4 biorą udział w antagonistycznej regulacji różnorodnych procesów molekularnych i fizjologicznych, które następnie wpływają na konkurencyjność roślin w warunkach wieloczynnikowego stresu. Jednak EDS1 i PAD4 okazały się mniej podatne na regulację przez LSD1, gdy rośliny uprawiane były w środowisku naturalnym w porównaniu do roślin hodowanych w warunkach laboratoryjnych. To sugeruje nadrzędny wpływ innych ścieżek sygnałowych, które mogą modulować odpowiedzi zależne od EDS1 i PAD4, lub obecność dodatkowych czynników, które ograniczają funkcję LSD1.

W kolejnych pracach, białka LSD1 i EDS1 określone zostały jako antagonistyczne regulatory śmierci komórki indukowanej przez UV-C. Ekspozycja roślin na promieniowanie UV-C indukuje zmiany morfologiczne komórek mezofilowych liści charakterystyczne dla apoptozy (kurczenie się komórek, cytoplazmy i nukleoplazmy, zwiększanie objętości chloroplastów i degradację systemu membran tylakoidów, jak również degradację tonoplastu i otoczki jądrowej), deregulację fotosyntezy, homeostazy reaktywnych form tlenu, aktywności enzymów antyoksydacyjnych i ekspresji genów. Ponadto AtBI1 (Bax inhibitor 1), który został opisany jako negatywny regulator programowanej śmierci komórki był zaangażowany w zależną od LSD1 śmierć komórek *Arabidopsis* w odpowiedzi na promieniowanie UV-C. Śmierć komórek mutantu *lsd1* była bowiem ograniczona przez nadekspresję *AtBI1*. Na podstawie tych wyników AtBI1 został określony jako nowy zidentyfikowany element szlaku śmierci komórkowej zależnej od LSD1. Wyniki badań przeprowadzonych podczas mojej pracy naukowej sugerują zatem, że LSD1 i EDS1 regulują procesy rozpraszania nadmiaru energii, formowania reaktywnych form tlenu, a w następstwie kontrolują programowaną śmierć komórki podczas różnych stresów związanych z zaburzeniem transportu elektronów. Jednakże, kontrola indukcji programowanej śmierci komórki przez LSD1 i EDS1 powinna być uważana jako bardziej ogólny proces, powodowany przez absorpcję nadmiaru energii wzbudzenia, a nie wpływ konkretnego czynnika stresowego.