

Załącznik 3

AUTOREFERAT

przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy oraz osiągnięcie naukowe zgłaszane jako przedmiot postępowania habilitacyjnego oraz pozostałe osiągnięcia naukowe

dr Katarzyna Szafrńska

Pracownia Ekofizjologii Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 2018

I. DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

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

Magister biologii
Dyscyplina: biologia
Specjalność: biotechnologia

Katedra Regulacji Wzrostu Roślin
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UŁ
(obecnie Pracownia Ekofizjologii
Roślin, Wydział Biologii i Ochrony
Środowiska UŁ)

Łódź, czerwiec 1998

Tytuł pracy magisterskiej: „Zmiany zawartości związków fenolowych w korzeniach siewek soi traktowanych chłodem”. Promotor: prof. dr hab. Krystyna M. Janas

Doktor nauk biologicznych
Dyscyplina: biologia

Katedra Regulacji Wzrostu Roślin
(obecnie Pracownia Ekofizjologii
Roślin) Wydział Biologii i Ochrony
Środowiska UŁ

Łódź, wrzesień 2004

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Podwyższenie tolerancji na stres oksydacyjny wywołany niską temperaturą w siewkach soi (*Glycyne max* (L.) Merr.): możliwy udział związków fenolowych i enzymów antyoksydacyjnych”. Promotor: prof. dr hab. Krystyna M. Janas

II. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU

1. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

Doktorant 01.10.1998 – 07.11.1999	Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno-Mikrobiologiczne Katedra Regulacji Wzrostu Roślin*, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UŁ
Asystent 08.11.1999 – 06.11.2004	Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin**, Instytut Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ
Adiunkt 07.11.2004 – obecnie	Pracownia Ekofizjologii Roślin***, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UŁ

*Katedra Regulacji Wzrostu Roślin w roku 2000 zmieniła nazwę na: **Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin, a następnie w 2016 roku została przekształcona w ***Pracownię Ekofizjologii Roślin. Wciąż jest to jednak ta sama jednostka w strukturach Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

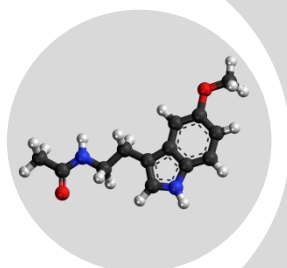
2. Informacje o długotrwałych nieobecnościach (powód nieobecności, okres)

- staż naukowy (*postdoc*) w Katedrze Biotechnologii Uniwersytetu w Weronie (01.05.2006 – 31.10.2007 – 1,5 roku)
- zwolnienie lekarskie po przebytej operacji kręgosłupa (03.01-12.06.2012 - 163 dni)
- zwolnienie lekarskie po przebytej kolejnej operacji kręgosłupa (26.11.2016 – 25.05.2017 - 182 dni)
- urlop dla poratowania zdrowia udzielony w celu kontynuacji leczenia po przebytych operacjach (26.05.2017 – 25.05.2018 – 1 rok)

III. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wskazanie osiągnięcia naukowego* 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.).

* Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie zostały zamieszczone w **Załączniku 6**



„Egzogenna melatonina jako czynnik modyfikujący odporność roślin na abiotyczne stresy środowiskowe”

Osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny stanowi monotematyczny cykl **5 oryginalnych publikacji naukowych**, oraz **1 pracy przeglądowej**, których **sumaryczny IF** podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi: **13,731**. **Suma punktów MNiSW** podana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z dnia **27 stycznia 2017** wynosi: **175**.

DANE BIBLIOGRAFICZNE					
Lp	IF rok publ	IF V-letni	Punkty MNiSW rok publ	Punkty MNiSW*	Liczba cytowań*
Publikacje oryginalne					
1	Szafrńska K , Glińska S, Janas KM. 2012. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of <i>Vigna radiata</i> seeds. <i>Journal of Plant Physiology</i> . 169: 34-40.				
	2,699	3,296	35	35	19
2	Szafrńska K , Glińska S, Janas KM. 2013. Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed <i>Vigna radiata</i> roots. <i>Biologia Plantarum</i> 57 (1): 91-96.				
	1,740	1,371	25	25	21
3	Szafrńska K , Szewczyk R, Janas KM. 2014. Involvement of melatonin applied to <i>Vigna radiata</i> L. seeds in plant response to chilling stress. <i>Central European Journal of Biology</i> 9 (11): 1117-1126.				
	0,710	0,975	15	20	6
4	Szafrńska K , Reiter R, Posmyk MM. 2016. Melatonin application to <i>Pisum sativum</i> L. seeds positively influences the function of the photosynthetic apparatus in growing seedlings during paraquat-induced oxidative stress. <i>Frontiers in Plant Science</i> 7: 1663.				
	4,291	4,672	40	40	8
5	Szafrńska K , Reiter R, Posmyk MM. 2017. Melatonin improves the photosynthetic apparatus in <i>Pisum sativum</i> L. leaves stressed by paraquat via chlorophyll breakdown regulation and accelerated <i>de novo</i> synthesis. <i>Frontiers in Plant Science</i> 8: 878.				
	4,291	40	40	40	2
Publikacje przeglądowe					
6	Szafrńska K . 2015. Melatonina roślinna – cząsteczka wielu zadań. <i>Postępy Biologii Komórki</i> 42(1): 43-66.				
	-	0,062	5	15	-
RAZEM					
	13,731	15,048	160	175	56
*Punkty MNiSW podane zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z dnia 27 stycznia 2017. Liczba cytowań według bazy Web of Science z dnia 25.03.2018.					

1. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH PRZEDŁOŻONYCH DO OCENY

Wprowadzenie

Melatonina (MEL) po raz pierwszy wyizolowana została z szyszynki wołu przez Lerner'a i wsp. (1958), a następnie zidentyfikowana jako N-acetylo-5-metoksytryptamina. Przez dziesiątki lat uważana była za neurohormon zwierzęcy odpowiedzialny za regulację snu i nastroju, rytmów okołodobowych, fizjologii siatkówki, zachowań seksualnych, sezonowości rozrodu, czy stymulację systemu immunologicznego (Hardeland 2016). Kiedy w połowie lat 90-tych odkryto obecność MEL także w organizmach roślinnych (Dubbels i wsp. 1995, Hattori i wsp. 1995) zainteresowanie tą cząsteczką wśród fitofizjologów gwałtownie wzrosło. Obecnie wiadomo, że jest to konserwatywny związek występujący u niemal wszystkich, nawet bardzo odległych ewolucyjnie gatunków.

Jedną z najważniejszych funkcji jakie MEL pełni u roślin jest działanie antyoksydacyjne. Cząsteczka ta nie tylko (1) ma zdolność bezpośredniego niwelowania reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA), ale także (2) pośrednio reguluje działanie enzymów antyoksydacyjnych, zarówno na poziomie transkrypcji jak też zwiększając ich aktywność, (3) chroni je przed uszkodzeniami, (4) stymuluje działanie innych antyoksydantów, takich jak kwas askorbinowy (AsA) i glutation (GSH), (5) wiąże metale przejściowe, (6) hamuje aktywność enzymów prooksydacyjnych na poziomie epigenetycznym oraz (7) zwiększa wydajność fosforylacji oksydacyjnej poprzez ograniczanie wycieku elektronów w mitochondriach (Reiter i wsp. 2016). Tak duża skuteczność antyoksydacyjna MEL związana jest z jej wysokim powinowactwem w stosunku do wielu RFT, jak również z faktem generowania kaskady „zmiatającej” RFT, w której produkty utleniania MEL, takie jak: cykliczna 3-hydroksymelatonina (c3OHM), N¹-acetylo-N²-formylo-5-metoksy-kynuroamina (AFMK) i N¹-acetylo-5-metoksykynuroamina (AMK), również wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą (Manchester i wsp. 2015). W efekcie niewielka amfifilowa cząstka, swobodnie penetrująca wszystkie kompartmenty komórki, nawet w niewielkich stężeniach jest wysoce efektywnym czynnikiem eliminującym RFT.

Chociaż MEL nie jest uznawana za hormon roślinny, to jednak jej wpływ na procesy wzrostowe, ryzogenezę, kwitnienie, dojrzewanie owoców i efektywność

fotosyntezy został potwierdzony (Shi i wsp. 2016). MEL wywołuje liczne zmiany w ekspresji genów, działa plejotropowo i w korelacji z innymi elementami m.in. serotoniną, auksynami, antyoksydantami enzymatycznymi i drobnocząsteczkowymi. Potwierdza to jej istotną rolę w koordynowaniu wielu aspektów rozwoju roślin (Shi i wsp. 2016).

Wyjątkowo istotną wydaje się być biostymulująca funkcja MEL w obliczu zmieniających się warunków środowiska (stresy). Kontrolowana indukcja RFT, jako sygnał komórkowy reakcji na bodźce stresowe (m.in. „wybuch” oksydacyjny) jest prawdopodobnie odpowiedzialny również za wzrost poziomu endogennej MEL (aktywacja genów związanych z jej biosyntezą) w odpowiedzi na stres. Jest więc MEL elementem naturalnej strategii obronnej roślin, co potwierdziły badania stwierdzające, że gatunki, a nawet odmiany roślin bogate w MEL są odporniejsze na stresy środowiskowe (Zhang i wsp. 2015).

W większości abiotyczne stresy środowiskowe silnie zaburzają gospodarkę wodną rośliny i zawsze generują wtórny stres oksydacyjny. Skutkuje to destabilizacją funkcjonowania błon biologicznych (zmiany w ich plastyczności, przerwanie integralności) – szczególnie istotnych w tak podstawowych szlakach metabolicznych jak fotosynteza i oddychanie, jak i wielu innych procesach komórkowych (np. sekwestracja jonów, transdukcja sygnałów) i fizjologicznych (np. transport i w efekcie wzrost). MEL może zmieniać ekspresję wielu genów i czynników regulacyjnych, tłumiących lub odwracających negatywne skutki stresów abiotycznych, jak również działając jako efektywny antyoksydant bezpośrednio chronić roślinę przed wtórnym stresem oksydacyjnym (Zhang i wsp. 2016, Martinez i wsp. 2018, Cao i wsp. 2018).

Ponieważ jednak poziom endogennej MEL u większości roślin jest bardzo niski, interesującym wydawało się zbadanie jaką rolę w warunkach stresowych może odgrywać suplementacja roślin egzogenną MEL.

Większość modeli eksperymentalnych stosowanych w badaniach efektów egzogennej MEL w fizjologii roślin opiera się na dodawaniu roztworu tej indoloaminy do podłoża lub aplikacji w postaci oprysku. Nasza jednostka - Pracownia Ekofizjologii Roślin UŁ (PER UŁ) – jest pionierem w aplikowaniu egzogennej MEL bezpośrednio do nasion z wykorzystaniem technik przesiewnego kondycjonowania.

Kondycjonowanie nasion jest powszechnie stosowane w rolnictwie, ogrodnictwie i leśnictwie w celu poprawy jakości nasion i zwiększenia ich zdolności kiełkowania. Polega na stopniowym ich uwadnianiu do wyznaczonego eksperymentalnie poziomu,

które aktywuje procesy metaboliczne, jednak nie jest wystarczające dla zapoczątkowania wzrostu i przebicia okrywy nasiennej przez kiełkujący zarodek (Kubala i wsp. 2013). Proces kończy wtórna desykcacja nasion do poziomu wilgotności inicjalnej – co pozwala na ich przechowywanie do czasu siewu. Optymalne warunki uwadniania jak i desykcacji bywają różne, i są wyznaczane eksperymentalnie dla danego gatunku rośliny. W wyniku poprawnie dobranego i przeprowadzonego kondycjonowania żywotność i wigor nasion wzrasta, podobnie jak zdolność i szybkość ich kiełkowania, zwłaszcza w suboptymalnych warunkach środowiskowych (np. rozszerza się zakres temperatur kiełkowania danego gatunku).

Niespecyficzne reakcje na różne stresy abiotyczne takie jak: susza, zasolenie, ekstremalne temperatury, czy stres oksydacyjny, często wywołują podobne skutki: negatywne - gdy stres jest zbyt silny lub działa długo; albo pozytywne - związane z przewyciężaniem stresu i generowaniem odporności. Wynika to z aktywacji uniwersalnych szlaków sygnalizacji komórkowej i podobnej odpowiedzi komórkowej. Postuluje się, że kondycjonowanie nasion (zarówno gwałtowne uwadnianie, a szczególnie wtórna desykcacja) aktywuje szlaki sygnalizacyjne reakcji na stres (jest słabym stresem) i generuje odpowiedzi obronne jak np. biosynteza i gromadzenie transkryptów genetycznych, czy gotowych białek antystresowych (np. HSP, LEA itp.) w nasionach. Tym sposobem kondycjonowane nasiona jak i wyrosłe z nich siewki są *a priori* przygotowane na potencjalny stres środowiskowy. Jednak dokładny molekularny mechanizm inicjowania tych odpowiedzi nie jest do końca poznany. Spekuluje się także, że jest on związany z akumulacją tymczasowo nieaktywnych białek sygnałowych, w kondycjonowanych komórkach. Zatem, po kolejnej ekspozycji na abiotyczny stres w środowisku, drugie zdarzenie sygnalizacyjne (bodziec stresowy) może uaktywnić w/w białka sygnałowe, wzmacniając w ten sposób transdukcję sygnału, a zatem prowadząc do szybszej i/lub bardziej intensywnej aktywacji strategii obronnych (Conrath i wsp. 2006).

Kontrolowane uwadnianie nasion pozwala wprowadzać do nich wybrane hydrofilowe pozytywnie działające substancje czynne. Taką okazała się być MEL. Badania proteomiczne PER UŁ przeprowadzone na zarodkach izolowanych z kiełkujących nasion kukurydzy kondycjonowanych wodą i wodnym roztworem MEL pomogły zidentyfikować specyficzne białka, których biosynteza indukowana była w wyniku zabiegu hydrokondycjonowania, i po raz pierwszy ujawniły takie, które ulegały ekspresji tylko w obecności MEL (Kołodziejczyk i wsp. 2016 a, b). Były to białka

związane z intensyfikacją metabolizmu energetycznego, antyoksydacyjne, detoksykujące, antystresowe. Potwierdziło to, że odpowiednio dobrana technika kondycjonowania z jednoczesną aplikacją optymalnej dawki MEL, poprzez modyfikację proteomu zarodków nasion kiełkujących w warunkach optymalnych (Kołodziejczyk i wsp. 2016 a) i stresu chłodu (Kołodziejczyk i wsp. 2016 b) skuteczniej przygotowuje rośliny do potencjalnych niekorzystnych warunków środowiskowych (działanie prewencyjne) lub efektywniej wspomaga je w przezwyciężaniu stresu chłodu (działanie interwencyjne) niż kondycjonowanie samą wodą. Jest to kolejny argument wyjaśniający dlaczego rośliny o wyższej zawartości MEL wykazują zwiększoną tolerancję na stres.

Różnorodność strategii obronnych uruchamianych aplikacją egzogennej MEL do nasion jest ogromna i od lat stanowi obiekt moich zainteresowań naukowych.

Celem badań przedstawionych w monotematycznym cyklu publikacji było:

1. zbadanie czy i jak MEL aplikowana do nasion *Vigna radiata* wpływa na metabolizm związków fenolowych oraz akumulację innych markerów stresu w młodych siewkach fasoli mung poddanych działaniu chłodu (poszukiwanie korelacji funkcjonalnych MEL ze zdefiniowanymi już niespecyficznymi strategiami obronnymi);
2. określenie potencjalnej roli MEL aplikowanej do nasion *Pisum sativum* w procesie fotosyntezy zakłócanej działaniem parakwatu (PQ) u kilkutygodniowych siewek grochu (zdefiniowanie mechanizmów obronnych indukowanych MEL w specyficznej reakcji na celowany stres oksydacyjny).

Omówienie wyników

Spośród związków chemicznych występujących w roślinach metabolity wtórne, a w szczególności związki fenolowe (PhC) (polifenole i flawonoidy) mają ogromne znaczenie w relacjach roślina-środowisko (Rezanejad 2009). Od początku drogi naukowej obiektem moich zainteresowań był udział tych związków w reakcjach obronnych roślin eksponowanych na stres chłodu. Istnieją liczne doniesienia na temat aktywacji szlaku fenylopropanoidowego i pozytywnej roli jaką odgrywają metabolity wtórne u roślin rosnących w warunkach stresu chłodu (Amarowicz i wsp. 2010, Król i wsp. 2015). Z uwagi na pozytywne efekty i plejotropowy charakter działania MEL w różnych stresach środowiskowych postanowiłam sprawdzić, czy może ona również modyfikować metabolizm roślinny polifenoli w chłodzie.

Publikacja [1]



Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds

Katarzyna Szafrńska^{a,*}, Sława Glińska^b, Krystyna Maria Janas^a

^a Department of Ecophysiology and Plant Development, University of Lodz, Faculty of Biology and Plant Environmental Protection, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

^b Laboratory of Electron Microscopy, University of Lodz, Faculty of Biology and Plant Environmental Protection, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

Celem pierwszej pracy wchodzącej w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego było zbadanie wpływu MEL aplikowanej do nasion *Vigna radiata* na zawartość związków fenolowych, ich charakter oraz lokalizację komórkową w korzeniach 3-dniowych siewek ($T_0 - 3d/25^{\circ}C$) poddanych stresowi chłodu ($T_0 + 2d/5^{\circ}C$) i następnie regenerowanych w warunkach optymalnych ($T_0+2d/5^{\circ}C+2d/25^{\circ}C$). Należy zaznaczyć, że krótkotrwały chłód jest specyficznym stresem – niska, nieujemna temperatura spowalnia procesy metaboliczne (reguła van't Hoffa), jednak negatywne jej skutki w tkankach (uszkodzenia) manifestują się dopiero po ustąpieniu stresu, tj. w wyższych temperaturach. Wyniki eksperymentów odnoszono do odpowiednich siewek rosnących cały czas ($T_0+2d/25^{\circ}C$) w temp. optymalnej.

Przeanalizowano również wybrane markery stresu (TBARS, prolina) oraz parametry fizjologiczne korzeni siewek. Warianty eksperymentalne obejmowały siewki wyrosłe z nasion niczym przedsięwzięcie nie traktowanych - kontrolnych (C), hydrokondycjonowanych (H) i hydrokondycjonowanych wodnym roztworem MEL w stęż. 20 μM (H-MEL). Aby znaleźć odpowiedź na nurtujące pytanie, czy MEL wpływa na szlak fenylopropanoidowy, zbadano poziom związków absorbujących promieniowanie UV (UVAC) w korzeniach *V. radiata*. Analiza spektralna ekstraktów etanolowych ujawniła dwa maksymalne piki absorpcji we wszystkich trzech badanych wariantach (C, H, H-MEL): w obszarze pomiędzy 250-270 nm i 300-330 nm, co najprawdopodobniej odpowiada kwasom fenolowym i flawonoidom. We wszystkich 3 wariantach poddanych stresowi chłodu zaobserwowano niewielki spadek absorpcji w pierwszym zakresie i dość znaczący w drugim (Rys. 3). Choć bardzo często rośliny w odpowiedzi na stres akumulują związki fenolowe, to nie zawsze w warunkach stresowych ich poziom rośnie (Płażek i wsp. 2000, Roitto i wsp. 2005, Weidner i wsp. 2009). Związki te są również ważnymi składnikami strukturalnymi ściany komórkowej, a intensyfikacja jej lignifikacji stanowi rodzaj mechanicznej obrony w warunkach biotycznych i abiotycznych stresów. Dlatego też zmniejszenie ilości polifenoli nie musi oznaczać ich mniej intensywnej biosyntezy, a może wskazywać na wzmożone ich wykorzystanie - polimeryzację, którą trudno wykryć przy użyciu standardowych metod kolorymetrycznych. Zatem, choć na poziomie biochemicznym trudno było jednoznacznie określić intensyfikujący wpływ MEL na zawartość PhC, to jednak interesujących danych przysporzyło zbadanie lokalizacji tych związków na poziomie ultrastrukturalnym w korzeniach. Do tych analiz wybrano komórki merystematyczne, ponieważ są one najbardziej wrażliwe na czynniki środowiskowe (Lee i wsp. 2002), a także są dobrym materiałem do wizualizacji zmian lokalizacji PhC (Kuraś i wsp. 1999, Szafrńska i wsp. 2005). Związki te deponowane były głównie w wakuolach, w dwóch postaciach gęstych elektronowo złożeń: dużych owalnych i drobnych ziarnistych. Były one wizualizowane za pomocą OsO_4 i choć ich chemiczny charakter pozostaje nieznany to sugeruje się, że w wakuolach przechowywane są głównie pochodne kwasów hydroksycynamonowych (Dixon i Paiva, 1995). Dodatkowo zastosowanie kofeiny w mieszaninie utrwalającej nie tylko zapobiegło wyciekaniu polifenoli z wakuoli do cytoplazmy, ale także umożliwiło wizualizację PhC epikatechino-podobnych. Tak więc w badanym materiale analizowano zmiany ilości wakuol z dwoma formami depozytów fenolowych -

utrwalanych bez oraz w obecności kofeiny (Rys. 5). W komórkach merystematycznych korzeni rosnących w temp. 25°C, wakuole z ziarnistym, gęstym elektronowo materiałem fenolowym stanowiły ok 50% wszystkich obserwowanych wakuol. Owalne duże złogi PhC w wakuolach materiału utrwalonego z kofeiną pojawiały się w wariantach C i H - nie obserwowano ich w ogóle w wakuolach wariantu H-MEL utrwalonego z kofeiną.

Stres chłodu nie zmienił profilu rozkładu fenolowych złogów w wakuolach korzeni utrwalonych bez kofeiny, ale znacznie zmniejszył liczbę wakuol z owalnymi złogami fenolowymi w wariantach C i H utrwalonych z kofeiną. W chłodzonych korzeniach wariantu H-MEL liczba wakuol ze złogami fenolowymi (tylko drobno-ziarnistymi) była zbliżona do tej w korzeniach rosnących w 25°C (Rys. 5).

Po ustąpieniu stresu – podczas regeneracji, zaobserwowano gwałtowny wzrost liczby wakuol z depozytami fenolowymi we wszystkich trzech wariantach eksperymentalnych, lecz co ciekawe, zarówno w materiale C, jak i H, niezależnie od metody utrwalania, dominowały wakuole z dużymi owalnymi złogami. W materiale H-MEL sytuacja uległa odwróceniu. Po regeneracji w wariacie H-MEL dominowały wakuole z drobno-ziarnistymi depozytami, a wakuole z dużymi owalnymi złogami stanowiły jedynie około 20% wszystkich wakuol. Ponieważ merystem korzeniowy jest częściowo odpowiedzialny za wydłużenie korzenia, prawdopodobne jest, że ten inny charakter złogów fenolowych zlokalizowanych w wakuolach wariantu H-MEL może być powiązany z pozytywnym wpływem tej indoloaminy na wzrost siewek *V. radiata* po regeneracji (Tab. 1). W pozostałych wariantach efekt ten nie był widoczny.

MEL ograniczyła także stopień peroksydacji lipidów w korzeniach siewek chłodzonych (obniżony poziom TBARS), co szczególnie widoczne było po 2-dniowej regeneracji (Rys. 1). Kolejnym markerem stresu analizowanym w powyższej pracy był poziom proliny (Pro). Ekspozycja siewek *V. radiata* na chłód spowodowała znaczny wzrost zawartości Pro, szczególnie w korzeniach H-MEL. Jednak po regeneracji ilość Pro drastycznie spadła (Rys. 2). Wiadomo jednak, że po ustąpieniu stresu zgromadzona w tkankach Pro zostaje utleniona w mitochondriach, a uzyskana energia prawdopodobnie przyczynia się do regeneracji komórek roślinnych.

Reasumując, choć w warunkach optymalnych i w stresie chłodu przewidziane kondycjonowanie nasion *V. radiata* roztworem MEL nie wpływało znacząco na całkowitą zawartość PhC i ich profil UVAC w korzeniach siewek, to jednak patrząc na rodzaj złogów polifenolowych gromadzących się w wakuolach po ustąpieniu stresu,

ich ilość w formie drobnoziarnistych kompozytów znacznie wzrosła. Proporcje te były całkowicie odwrócone w korzeniach C i H, gdzie duże owalne złogi stanowiły ogromną większość. Być może to ten odmienny charakter złogów polifenolowych w wariancie nasion traktowanych MEL odgrywa znaczącą rolę w efektywniejszej regeneracji wyrosłych z nich siewek *V. radiata* po ustąpieniu czynnika stresowego.

Zastosowanie techniki mikroskopii elektronowej (TEM) w celu lokalizacji i obserwacji struktur depozytów związków polifenolowych jak i całych organelli w komórkach merystematycznych korzeni *V. radiata* pozwoliło analizować ich modyfikacje ultrastrukturalne. Były one na tyle specyficzne i interesujące, że zostały opisane w kolejnej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego.

Publikacja [2]

DOI: 10.1007/s10535-012-0253-5

BIOLOGIA PLANTARUM 57 (1): 91-96, 2013

Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed *Vigna radiata* roots

K. SZAFRAŃSKA^{1*}, S. GLIŃSKA², and K.M. JANAS¹

Department of Ecophysiology and Plant Development¹ and Laboratory of Electron Microscopy², Faculty of Biology and Plant Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, PL-90237, Lodz, Poland

Celem pracy była ocena, czy egzogenna MEL może odwrócić zmiany ultrastrukturalne zachodzące w komórkach merystematycznych chłodzonych korzeni 3-dniowych siewek *V. radiata* ($T_0 - 3d/25^\circ\text{C}$). Porównanie 3 wariantów eksperymentalnych siewek (C, H, H-MEL) wzrastających w 3 różnych warunkach temperaturowych ($T_0+2d/25^\circ\text{C}$, $T_0+2d/5^\circ\text{C}$ i $T_0+2d/5^\circ\text{C}+2d/25^\circ\text{C}$) przyniosło ciekawe spostrzeżenia.

Komórki merystematyczne korzeni roślin kontrolnych (C) w temp. 25°C wykazywały typową ultrastrukturę: plastydy miały gęstą elektronowo stronę, rzadkie tylakoidy i małe ziarna skrobi. Mitochondria wykazywały niską gęstość macierzy i zwykle wąskie grzebienie, typowe dla ich ortodoksyjnej konfiguracji. Pojedyncze cysterny retikulum endoplazmatycznego (ER) układały się w różnych kierunkach, a aparaty Golgiego (GA) składały się z 5-6 cystern i umiarkowanej liczby pęcherzyków (Rys. 1A). Zabieg hydrokondycjonowania nasion (H) zwiększył liczbę GA w komórkach

merystematycznych i liczbę pęcherzyków wokół nich aż w 54% analizowanych profili komórkowych (Rys. 1B, C, E). Cysterny ER były rzadkie, ułożone kuliście i lekko nabrziałe (Rys. 1D). Ultrastruktura mitochondriów nie uległa zmianie, ale plastydy często pozbawione były skrobi (Rys. 1E).

Natomiast w materiale H-MEL doszło do dość częstego przegrupowania cystern ER w kolistą postać (13% profili komórek) i były one znacząco nabrziałe (Rys. 1F). Niekiedy łączyły się one z małymi pęcherzykami zawierającymi elektronowo-gęsty materiał i znajdowały się w pobliżu ciał wielopęcherzykowych (MVB) (Rys. 1F). Warto zauważyć, że ultrastruktura mitochondriów, plastydów i aparatu Golgiego w komórkach korzeni siewek H-MEL nie uległa zmianie (Rys. 1F).

Organelami najwcześniej i najsilniej dotkniętymi stresem chłodu są chloroplasty (Sowiński i wsp. 2005). Chociaż plastydy w komórkach korzeniowych wydają się być mniej wrażliwe na zimno niż chloroplasty pędów, to jednak zmiany ultrastrukturalne plastydów w komórkach merystematycznych chłodzonych korzeni C zaobserwowano u około jednej czwartej tych organelli. Były one nabrziałe, z bardzo małą liczbą tylakoidów (Rys. 2A), a czasem przyjmowały kształt miseczki (Rys. 2B). Niektóre plastydy w komórkach chłodzonych korzeni *V. radiata* zawierały plastoglobuliny (2%) i gęste elektronowo granule (6%) (Rys. 2A, C), które prawdopodobnie reprezentują białka stresu (Čiamporová i Mistrík 1993). Niemal wszystkie plastydy zostały pozbawione ziaren skrobi (Rys. 2A-C), co może być konsekwencją wykorzystania wcześniej istniejących, w obliczu deficytu energetycznego generowanego suboptymalną temperaturą i ograniczanych wydatków na reakcje anaboliczne (Vartapetian i Jackson 1997).

Mitochondria w komórkach merystematycznych chłodzonych korzeni C miały jaśniejszą macierz i zmniejszoną liczbę grzebieni, które czasami były nieco zdeorganizowane (Rys. 2E). Ponadto czasami w cytoplazmie występowały ciała mielinopodobne (MB) (7% profili komórek, Rys. 2A), co sugeruje wzmocnienie procesów litycznych. Ultrastruktura komórek korzeni chłodzonych siewek H (Rys. 2E) była podobna do tej u siewek C rosnących w 5°C. Główną różnicą była sporadyczna obecność fitoferrytyny i ziaren skrobi w plastydach wariantu H (Rys. 2E), których nie stwierdzono w wariacie C. Fitoferrytyna umiejscowiona w plastydach mogła obniżać zawartość żelaza w cytoplazmie i w ten sposób chronić komórki przed wtórnym stresem oksydacyjnym (Lipiński i Drapier 1997).

W siewkach H-MEL, ultrastruktura komórkowa chłodzonych korzeni była mniej zmieniona niż w siewkach C (Rys. 2F-H). Plastydy często zawierały skrobię i czasami fitoferrytynę (Rys. 2H). Mieczkowate plastydy nie pojawiały się. W komórkach obecne były dwa typy mitochondriów: 1) z macierzą o gęstości elektronowej zbliżonej do cytoplazmy i cienkich grzebieniach - postać ortodoksyjna (70%, Rys. 2F-G) i 2) z macierzą skondensowaną i nabrzmiąłych grzebieniach - postać skondensowana (30%; Rys. 2H). W wariancie tym (H-MEL) reakcja strukturalna ER na chłodzenie była dwojaka. Niektóre gładkie cysterny ER (13% profili komórek) były nabrzmięte i ułożone kuliście (Rys. 2F), natomiast druga reakcja polegała na tworzeniu się złożonych, równoległych, ostrych cystern rozmieszczonych liniowo (13% profili komórek, Rys. 2G). Sugeruje się, że proliferacja cystern ER powiązana może być z syntezą białek stresowych (Čiamporová i Mistrík 1993) lub związków fenolowych (Stefanowska i wsp. 2003), co może tłumaczyć pozytywne efekty zastosowanej MEL. Po regeneracji, we wszystkich 3 wariantach (C, H i H-MEL) zmiany ultrastrukturalne wywołane chłodzeniem odnotowano tylko sporadycznie (Rys. 2I-K). Najbardziej charakterystyczną cechą była powszechna obecność gęstych elektronowo złożeń w wakuolach (Rys. 2I-K). Zarówno w siewkach C jak i H dominowały wakuole z dużymi owalnymi skupiskami elektronowymi (odpowiednio 58 i 45%, Rys. 2I, J), natomiast w siewkach H-MEL najliczniejsze były wakuole z ziarnistymi złożami (48%, Rys. 2K). Wyniki te przedstawiłam już w pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego [1].

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy pokazały, że pozytywny efekt MEL na poziomie ultrastrukturalnym pojawia się już po zadziałaniu stresu chłodu, a po przeniesieniu siewek *V. radiata* do warunków optymalnych zostaje utrzymany. Ten pozytywny wpływ szczególnie widoczny był w przypadku plastydów, które są najbardziej wrażliwe na stres chłodu.

Prezentowana analiza ultrastrukturalna badanych komórek merystematycznych potwierdziła pozytywne działanie MEL na poziomie cytologicznym już w trakcie działania chłodu. Co prawda pozytywne efekty na poziomie fizjologicznym – takie jak: stymulacja wzrostu korzeni siewek oraz ograniczenie peroksydacji lipidów - były widoczne typowo, dopiero po ustąpieniu stresu, to jednak ochronne działanie MEL względem organelli komórkowych manifestuje się nawet w niskiej temperaturze.

W kolejnej pracy, kontynuując badania związane z potencjalnym wpływem MEL na szlak fenylopropanoidów powróciłam do wyjaśnienia, czy MEL wpływa na ich syntezę *de novo* w analizowanym przeze mnie materiale roślinnym, a także jaki jest potencjał antyoksydacyjny tych związków.

Publikacja [3]

Cent. Eur. J. Biol. • 9(11) • 2014 • 1117-1126
DOI: 10.2478/s11635-014-0330-1



Central European Journal of **Biology**

Involvement of melatonin applied to *Vigna radiata* L. seeds in plant response to chilling stress

Research Article

Katarzyna Szafrńska^{1,*}, Rafał Szewczyk², Krystyna Maria Janas¹

Celowym było sprawdzenie jak proces hydrokondycjonowania nasion *V. radiata* z MEL wpływa na aktywność amoniakolizazy L-fenyloalaniny (PAL) w korzeniach siewek wyrosłych z wyżej opisywanych wariantów nasion. PAL jest pierwszym kluczowym enzymem na szlaku fenylopropanoidów i na podstawie jego aktywności można antycypować, czy pula związków fenolowych akumulujących się w tkankach jest syntetyzowana *de novo*, czy być może obecna jest tam konstytutywnie lub/i uwalniana z wcześniej istniejących konjugatów.

Aby upewnić się, czy na aktywność badanego enzymu oraz zawartość związków fenolowych w kilkudniowych siewkach *V. radiata* może mieć wpływ aplikowana do nasion MEL należało zweryfikować jej poziom w korzeniach poszczególnych wariantów eksperymentalnych roślin. Metodą HPLC-MS-MS oznaczono zawartość MEL w korzeniach *V. radiata* rosnących w warunkach optymalnych, stresu chłodu i podczas regeneracji. W korzeniach C najwyższy poziom endogennej MEL odnotowano w warunkach optymalnych, po chłodzeniu nieznacznie spadł, osiągając najniższy poziom po regeneracji (Rys. 1). W korzeniach H inkubowanych w temp. 25°C poziom endogennej MEL był prawie dwukrotnie niższy w porównaniu do korzeni C, natomiast w stresie chłodu i po regeneracji był już bardzo zbliżony do tego w korzeniach C. Mimo, że kondycjonowanie nasion *V. radiata* 50 µM roztworem

MEL spowodowało prawie 7-krotny wzrost zawartości MEL w porównaniu z korzeniami C, to tendencje spadkowe jej zawartości w korzeniach H-MEL i C były podobne po chłodzeniu (odpowiednio 25% i 24%) i nieco inne po regeneracji (odpowiednio 62% i 78%) w porównaniu z korzeniami siewek hodowanych w sposób ciągły w temp. 25°C. Wyniki te mogą sugerować, że zarówno endo-, jak i egzogenna MEL może być podobnie metabolizowana w warunkach stresu i regeneracji. Niższy poziom MEL w chłodzonych i regenerowanych korzeniach może również być związany z transportem indoloaminy do górnych części siewek, jednak taka analiza nie była przedmiotem niniejszej pracy. Ponieważ było to pierwsze doniesienie dotyczące zawartości MEL w korzeniach roślin po przedświejnej aplikacji tej indoloaminy do nasion, dlatego trudno było porównać te wyniki z badaniami innych autorów. Obecnie sugeruje się, że spadek MEL może być wynikiem jej utleniania w reakcjach z RFT (ochrona antyoksydacyjna komórki) i skutkuje akumulacją jej metabolitów (Kołodziejczyk i wsp. 2015), co w przypadku prezentowanej pracy nie było zweryfikowane.

Istnieją liczne doniesienia wskazujące, że stres chłodu zmniejsza płynność błon komórkowych poprzez modyfikacje składu oraz proporcje lipidów (wzrost nienasyconych kwasów tłuszczowych) i białek w błonie komórkowej (Wang i wsp. 2006). Strukturalne zmiany w błonach zaburzają ich integralność, zwiększając przepuszczalność dla jonów i wody, co ostatecznie zakłóca homeostazę procesów metabolicznych w komórce (Lukatkin 2005). Aby oszacować stopień uszkodzenia błon biologicznych w badanych korzeniach, oznaczano % wypływu elektrolitów z tkanek. Najniższą wartość tego wskaźnika odnotowano w korzeniach C hodowanych w temperaturze optymalnej. Zgodnie z przewidywaniami zwiększał się on po chłodzeniu i regeneracji. W korzeniach H % wypływu elektrolitów był porównywalny przez cały okres trwania eksperymentu (Tabela 1). Zaburzenia w funkcjonowaniu błon utrzymywały się zarówno w chłodzonych, jak i regenerowanych korzeniach H, co jak w przypadku nasion C sugeruje pojawienie się nieodwracalnych uszkodzeń integralności błon komórkowych. Natomiast w korzeniach H-MEL, % wypływu elektrolitów istotnie zmniejszał się po ustąpieniu stresu tj. w okresie regeneracji (Tabela 1), co wydaje się potwierdzać moją poprzednią sugestię dotyczącą ochronnej i antyoksydacyjnej roli MEL [1]. W chłodzonych (5°C) korzeniach C poziom TBARS był podobny do tych inkubowanych w temp. 25°C, lecz zwiększał się znacząco po ich regeneracji w wyższej temperaturze – kiedy ujawniły się uszkodzenia oksydacyjne

zaindukowane chłodem. W korzeniach siewek H i H-MEL, chłodzenie i regeneracja powodowały znaczne obniżenie TBARS, ale w korzeniach H-MEL spadek ten był znacznie bardziej widoczny [1].

W prezentowanych badaniach [1, 3] ewidentnie wykazano antyoksydacyjną funkcję MEL manifestującą się zachowaniem integralności błon w wariancie H-MEL (mniejszy wpływ elektrolitów i niższy poziom TBARS) po ustąpieniu stresu. Łącząc to z faktem spadku ilości MEL podczas stresu i regeneracji wydaje się wysoce prawdopodobnym, że została ona wykorzystana jako substrat w ochronie antyoksydacyjnej. Zatem, może ona poprawiać potencjał antyoksydacyjny komórek roślinnych *per se*, ale i pośrednio gdyż spekulujemy, że MEL jest również zaangażowana w metabolizm polifenoli. Założenie to można oprzeć na wynikach Bajwa i wsp. (2014), którzy odkryli, że indukcja za pomocą egzogennej MEL genów kodujących białka sygnałowe stresu chłodu może stymulować biosyntezę związków ochronnych, takich jak związki polifenolowe, i przyczyniać się do zwiększenia tolerancji na stres chłodu. Poprzez zapobieganie uszkodzeniom oksydacyjnym, polifenole także ograniczają produkcję TBARS, co jest korzystne dla poprawnego funkcjonowania błon komórkowych [1].

Jak już wspomniałam kluczową rolę w biosyntezie związków fenolowych odgrywa PAL. Aktywność tego enzymu różni się znacznie między gatunkami i wykazuje zmienność swoistą zarówno dla tkanki jak i fazy rozwojowej roślin. Chociaż czynniki stresowe zwykle zwiększają aktywność PAL, chłód z uwagi na swą specyfikę obniżył ten parametr we wszystkich badanych wariantach (Rys. 2), podczas gdy zawartość polifenoli wzrosła, szczególnie w korzeniach H-MEL (Rys. 3). Okazuje się, że nie zawsze można znaleźć bezpośrednią korelację między aktywnością tego enzymu i zawartością PhC. Prawdopodobnie, pod wpływem stresu chłodu polifenole nie były syntetyzowane *de novo* na szlakach związanych z aktywnością PAL, ale były konstytutywnie obecne w tkankach. Związki te mogą pochodzić z wcześniej istniejących struktur komórkowych lub konjugatów, które działają jako rezerwuar aglikonów i mogą być mobilizowane w momentach krytycznych (Piślewska i wsp. 2002, Janas i wsp. 2002).

W badanym materiale roślinnym PAL wydaje się być enzymem chłodowrażliwym – jego aktywność spada we wszystkich wariantach *V. radiata* w czasie działania stresu. Dopiero po regeneracji wzrasta, zwłaszcza w korzeniach H-MEL (Rys. 2), co może sugerować, że była ona dodatkowo aktywowana poprzez zastosowanie egzogennej

MEL. Podobne profile zawartości fenoli całkowitych po regeneracji (Rys. 3) mogą wskazywać, że akumulacja tych związków jest zależna od aktywności PAL. Nieco wyższa aktywność PAL i zawartość PhC w korzeniach H-MEL tym razem wyraźnie potwierdzają moją wcześniejszą hipotezę o udziale MEL w aktywacji szlaku fenylopropanoidowego [1].

Biorąc pod uwagę szeroko rozpowszechnione w literaturze właściwości przeciwutleniające PhC i MEL, kolejnym etapem badań było określenie potencjału antyoksydacyjnego etanolowych ekstraktów z korzeni *V. radiata*.

Aktywność antyoksydacyjna związków fenolowych głównie wynika z ich właściwości redoks, i polega na adsorbowaniu i neutralizowaniu wolnych rodników, niwelowaniu tlenu singletowego i trypletowego czy też rozkładaniu nadtlenu (Osawa 1994). Ze względu na różnorodność polifenoli oraz fakt, że występują one w roślinach jako złożone mieszaniny związków ich aktywność przeciwutleniającą dobrze jest mierzyć co najmniej dwoma komplementarnymi metodami. W niniejszej pracy zastosowano więc test zdolności niwelowania kationorodnika ABTS^{•+} oraz test FRAP pozwalający określić siłę redukcyjną badanych substancji. Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów oznaczone za pomocą testu ABTS^{•+} korelowały z profilem i były wprost proporcjonalne do zawartości związków fenolowych. Stres chłodu zwiększał właściwości antyoksydacyjne ekstraktów pochodzących z wszystkich 3 wariantów, ale po regeneracji ekstrakty z korzeni H-MEL miały najwyższy potencjał antyoksydacyjny (Ryc. 4).

Pomiar potencjału redukcyjnego (test FRAP) jest również wskaźnikiem aktywności antyoksydacyjnej. Zdolność związków zawartych w ekstraktach do redukcji jonów Fe³⁺ do Fe²⁺ (Rys. 5) różniła się od potencjału antyoksydacyjnego zmierzonego metodą ABTS^{•+} (Rys. 4), a wyniki nie pokrywały się z poziomem PhC (Rys. 3). Zdolność redukcyjna ekstraktów etanolowych była raczej skorelowana z aktywnością PAL (Rys. 2) i wykazywała spadek po chłodzeniu i znaczny wzrost po regeneracji, szczególnie w korzeniach H-MEL (Rys. 5). Może to sugerować, że siła redukująca badanych ekstraktów była efektem aktywności produktów szlaku fenylopropanoidowego syntetyzowanych *de novo*.

Konkludując, przedstawione powyżej wyniki dostarczają dowodów na to, że przedsięwzięta aplikacja MEL do nasion *V. radiata* może usprawniać mechanizmy obronne roślin podczas aklimatyzacji do chłodu, głównie poprzez ograniczenie

wtórnego stresu oksydacyjnego. Pozytywny efekt jest osiągany zarówno przez samą MEL, która generuje metaboliczną kaskadę antyoksydantów powstałych w wyniku jej utleniania, jak również, poprzez intensyfikację aktywności PAL po ustąpieniu stresu. Wzmaga to akumulację polifenoli, które także posiadają znaczne własności redukujące i antyoksydacyjne.

Mechanizmy tolerancji na stresy, w tym chłodu, są jednak bardzo złożone i aby utrzymać prawidłowe funkcje fizjologiczne w niesprzyjających warunkach różne strategie muszą współdziałać na poziomach molekularnym, biochemicznym i fizjologicznym.

Z uwagi na wyjątkowo efektywne własności antyoksydacyjne MEL oraz jej bezpośrednie i pośrednie działanie modyfikujące status redoks w komórkach roślinnych zainteresowało mnie, czy badana indoloamina może pozytywnie wpływać na podstawowy proces anaboliczny roślin – fotosyntezę.

Aparat fotosyntetyczny jest typowym fizjologicznym, endogennym źródłem RFT w komórkach roślinnych (Foyer i Shigeoka, 2011). Niedostateczne rozproszenie energii podczas fotosyntezy powoduje nadmierne wzbudzenie chlorofilu, które inicjuje reakcję z O_2 , dając tlen singletowy (1O_2). Ten jest odpowiedzialny za uszkodzenie fotosystemów i innych układów biorących udział w fotosyntezie. Tworzenie RFT w błonach tylakoidowych może być również inicjowane przez redukcję O_2 z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) (PSI) (Tambussi i wsp. 2004). Zatem biorąc pod uwagę wysoce skuteczne właściwości antyoksydacyjne MEL i jej pozytywną rolę w fizjologii roślin, postanowiłam sprawdzić jej potencjalną rolę w ochronie aparatu fotosyntetycznego.

Publikacja [4]

ORIGINAL RESEARCH
published: 04 November 2016
doi: 10.3389/fpls.2016.01663

Melatonin Application to *Pisum sativum* L. Seeds Positively Influences the Function of the Photosynthetic Apparatus in Growing Seedlings during Paraquat-Induced Oxidative Stress

Katarzyna Szafrńska¹, Russel J. Reiter² and Małgorzata M. Posmyk^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Wei Hu,¹ Laboratory of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland,
² Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio,
San Antonio, TX, USA

W prezentowanej pracy zastosowałam nowy model badawczy, który miał wyjaśnić, czy jednorazowa aplikacja MEL do nasion w jakikolwiek sposób wpływa na efektywność procesu fotosyntezy w wyrosłych z nich roślinach. W badaniach tych dodatkowo zastosowałam bezpośredni, celowany stres oksydacyjny wywołany działaniem parakwatu (PQ). Materiał stanowiły krążki wycięte z liści 24-dniowych roślin grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), wyrosłych z nasion kontrolnych (niczym nie traktowanych) (C), hydrokondycjonowanych (H) i hydrokondycjonowanych dwoma roztworami MEL: 50, i 200 μM (H-MEL50 i H-MEL200). Każdy z wariantów roślin inkubowano przez 48 h w 75 μM roztworze PQ.

Celem kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego było sprawdzenie, czy przedsięwzięta aplikacja MEL wpłynie pozytywnie na parametry fluorescencji chlorofilu oraz zawartość tego barwnika w liściach grochu, szczególnie w czasie działania stresu oksydacyjnego wywołanego przez PQ.

U roślin, energia absorbowana przez chlorofil *a* jest wykorzystywana w większości w fazie jasnej fotosyntezy do syntezy ATP i NADPH (niecykliczny transport elektronów) lub wyłącznie ATP (cykliczny transport elektronów), natomiast jej nadmiar jest rozpraszany w postaci ciepła, a część jest re-emitowana w postaci światła (fluorescencja) (Iriel i wsp. 2014). Pomiar fluorescencji chlorofilu jest idealnym

narzędziem do określania wydajności fotosyntezy, zwłaszcza w warunkach stresu. Spośród wielu dostępnych technik, pomiar modulowanej fluorescencji chlorofilu (PAM) jest szeroko stosowany jako szybkie, czułe i nieinwazyjne narzędzie do oceny zaburzeń w procesie przenoszenia elektronów w PS II (Moustaka i wsp. 2015).

Ponieważ parametry fluorescencji chlorofilu są bardzo czułe na czynniki stresowe, ich oceny dokonano w czasie T_0 oraz już po 2, 4 i 6 h inkubacji w roztworze PQ. Przeanalizowano następujące współczynniki: (a) maksymalną fotochemiczną wydajność kwantową PSII po zaadoptowaniu do ciemności (F_v/F_m); (b) wydajność kompleksu rozszczepienia wody po donorowej stronie PSII (F_v/F_0); (c) wskaźnik witalności (R_{fd}); (d) wydajność kwantową PSII (Φ_{PSII}); (e) wygaszanie fotochemiczne (qP), oraz (f) wygaszanie nefotochemiczne (NPQ). Pierwsze godziny działania stresu nieznacznie obniżyły większość z analizowanych wskaźników we wszystkich wariantach, jednak po 6 h inkubacji w PQ gwałtowny ich spadek odnotowano w krążkach C i H. W wariantach z MEL (H-MEL50 i H-MEL200) wartości tych parametrów pozostawały nadal na bardzo wysokim poziomie (Rys. 1A-E). Niewątpliwie można więc stwierdzić, że w obliczu silnego stresu oksydacyjnego, przedsięwzięta aplikacja MEL do nasion usprawnia mechanizmy odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego wyrosłych z nich roślin.

Warto również zauważyć, że obniżonej wydajności kwantowej PS II (Φ_{PSII}) i wygaszaniu fotochemicznemu (qP) towarzyszył wzrost NPQ, szczególnie po pierwszych 2 i 4 h traktowania PQ. Współczynnik qP określa proporcję energii świetlnej zaabsorbowanej przez PS II do energii wykorzystanej przez otwarte centra do reakcji fotosyntezy (Maxwell i Johnson 2000), zatem obniżenie jego wartości świadczy o zamknięciu centrów reakcji na skutek wysycenia fotosystemu światłem. Znaczący spadek qP w liściach C i H spowodowany 6-godzinną ekspozycją na PQ wskazuje, że ten herbicyd zmniejsza liczbę otwartych centrów PS II. Liście wariantów z MEL (H-MEL50 i H-MEL200) w warunkach stresu oksydacyjnego miały dużo większą zdolność do fotochemicznego wygaszania. Wygaszanie nefotochemiczne (NPQ) natomiast odzwierciedla rozpraszanie zgromadzonej energii w postaci ciepła i ma działanie fotoprotekcyjne. Jest ono związane ze stężeniem protonów wewnątrz tylakoidów i indukuje wygaszanie energii cieplnej w cyklu ksantofilowym (Jahns i Holzwarth, 2012). Cykl ten przekształca energię wzbudzenia w ciepło, a tym samym zapobiega powstawaniu szkodliwych RFT (Wang i wsp. 2010). Po 2 h traktowania PQ we wszystkich badanych wariantach wystąpił tylko mały spadek qP , podczas gdy NPQ

znacząco wzrastał. Pokazuje to, że qP, jako miara frakcji otwartych centrów reakcji PSII, nieznacznie się zmienia w krótkim okresie działania stresu. Znacznie zwiększone NPQ sugeruje, że przeważające procesy powodujące wygaszanie fluorescencji mają charakter fotoprotekcyjny (Serôdio i Lavaud, 2011).

Pomiar fluorescencji, w połączeniu z analizą poziomu barwników fotosyntetycznych, prowadzą do pełniejszego zrozumienia szlaków rozpraszania energii w centrach reakcji PS II i kompleksach pigmentów wychwytyjących światło. O ile analiza parametrów fluorescencji chlorofilu pozwala wykryć zmiany zachodzące bardzo szybko u roślin - jeszcze zanim pojawią się symptomy uszkodzeń (Lichtenthaler 2007), to jednak aby zaobserwować różnice w zawartości chlorofilu i karotenoidów należało wydłużyć czas inkubacji krążków liściowych w PQ do 24 i 48 h.

Traktowanie liści 75 μ M PQ znacząco obniżało intensywność ich zabarwienia. Po 24 h różnice między wariantami roślinnymi były jeszcze słabo widoczne ale po 48 h krążki liści C i H były niemal całkowicie odbarwione, podczas gdy zielona barwa liści H-MEL50 była prawie w pełni zachowana (Rys. 2). Ta wizualna obserwacja została potwierdzona przez testy biochemiczne. Po 24 h traktowania PQ poziom chlorofilu *a* zmniejszył się w liściach C, H i H-MEL50 odpowiednio o 45, 40 i 34%, podczas gdy w liściach H-MEL200 nie zaobserwowano prawie żadnych zmian. We wszystkich badanych wariantach przedłużenie działania stresu PQ do 48 h spowodowało istotne obniżenie zawartości chlorofilu *a*, ale w krążkach H-MEL50 była ona i tak najwyższa - prawie 2,5-krotnie większa niż w krążkach C. Zawartość chlorofilu *b* jest znacznie niższa niż chlorofilu *a* w roślinach. Jego poziom po 24 h inkubacji w PQ nie zmienił się znacząco w krążkach C, H i H-MEL50. W wariantach H-MEL200 parametr ten wzrósł nawet o 28%. Wyraźne obniżenie poziomu chlorofilu *b* zaobserwowano dopiero po 48 h, szczególnie w liściach C i H, podczas gdy w wariantach z MEL było ono wciąż stosunkowo wysokie (Rys. 3B). Schemat zmian zawartości karotenoidów był podobny, 24 h inkubacji w PQ spowodowały znaczne jej obniżenie we wszystkich wariantach, choć najwyższy poziom zachowany został w liściach H-MEL200. Po 48 h traktowania PQ spadek ten był drastyczny, ale ostatecznie najwyższy poziom karotenoidów znów odnotowano w liściach H-MEL50 (Rys. 3D). Tak więc, analiza ilościowa barwników fotosyntetycznych i towarzyszących wykazała, że rośliny wyrosłe z nasion hydrokondycjonowanych MEL skuteczniej przeciwdziałają degradacji chlorofilu w warunkach stresu oksydacyjnego niż rośliny wyrosłe z nasion kontrolnych (C) i hydrokondycjonowanych (H).

Aplikacja MEL do nasion pozytywnie wpłynęła również na relatywną zawartość wody (RWC – marker stopnia uwodnienia tkanek roślinnych) w komórkach. PQ jako szybko działający herbicyd bezpośrednio wnika do liści i w ciągu kilku godzin może doprowadzić do śmierci roślin z powodu utraty wody (Ekmekci i Terzioğlu, 2005). RWC w krążkach liści H-MEL50 i H-MEL200C była wyższa niż w C i H jeszcze zanim poddano je stresowi oksydacyjnemu (T_0) i w trakcie ekspozycji na herbicyd również znacząco rosła (Tab. 1). Natomiast 48-godzinna inkubacja w PQ powodowała istotny ubytek wody w krążkach liści C, co może pośrednio świadczyć o utracie integralności błon komórkowych w tych roślinach. Jest to więc kolejny dowód, że aplikowana MEL przeciwdziała oksydacyjnym uszkodzeniom błon komórkowych.

PQ jest herbicydem o zdefiniowanym działaniu – z udziałem intensywnego światła blokuje proces fotosyntezy nadmierną produkcją RFT. Intensyfikuje przekształcanie O_2 w $O_2^{\cdot-}$, czyli produkcję rodników nadtlenkowych, które mogą reagować następnie z nienasyconymi lipidami błon, bądź być przekształcane w inne RFT.

W celu wizualizacji nagromadzenia $O_2^{\cdot-}$ w tkankach liścia zastosowano barwienie NBT. W czasie T_0 oraz w trakcie pierwszych 2 h inkubacji w PQ anionorodnik ten zlokalizowano jedynie na obrzeżach wszystkich krążków liściowych (Rys. 4), jednak powstał on tam na skutek urazu mechanicznego (cięcie korkoborem). Po 6 h $O_2^{\cdot-}$ pojawił się wewnątrz krążków C i dopiero po 48 h pojawił się również wewnątrz krążków H. W krążkach H-MEL50 i H-MEL200 podczas całego eksperymentu nie wykryto obecności $O_2^{\cdot-}$ (Rys. 4). Brak akumulacji $O_2^{\cdot-}$ w liściach roślin wyhodowanych z nasion wstępnie traktowanych MEL był prawdopodobnie wynikiem podwyższonej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w tych roślinach (Rys. 5). W stresie oksydacyjnym indukowanym przez PQ, aktywność SOD wzrosła we wszystkich wariantach eksperymentalnych, ale najwyższa była w krążkach liści H-MEL50 i H-MEL200 (Rys. 5), gdzie nie zlokalizowano $O_2^{\cdot-}$ (Rys. 4).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że kondycjonowanie nasion roztworem MEL podwyższa u wyrosłych z nich roślin tolerancję na stres oksydacyjny. Ten korzystny efekt został potwierdzony zmniejszoną akumulacją $O_2^{\cdot-}$ w tkankach liści, skorelowaną ze zwiększoną aktywnością SOD; zachowaniem barwników fotosyntetycznych; efektywniejszym funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego i wyższą zawartością wody w tkankach podczas stresu wywołanego PQ. Nadal jednak pozostawało pytanie czy pozytywny wpływ MEL na działanie aparatu

fotosyntetycznego liści grochu traktowanych PQ związany był jedynie z ograniczoną degradacją chlorofilu, czy być może również z jego zwiększoną syntezą *de novo*. Próbę odpowiedzi na to pytanie podjęłam zatem w kolejnej pracy.

Publikacja [5]



ORIGINAL RESEARCH
published: 29 May 2017
doi: 10.3389/fpls.2017.00878



Melatonin Improves the Photosynthetic Apparatus in Pea Leaves Stressed by Paraquat *via* Chlorophyll Breakdown Regulation and Its Accelerated *de novo* Synthesis

Katarzyna Szafrńska¹, Russel J. Reiter² and Małgorzata M. Posmyk^{1*}

¹ Laboratory of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Łódź, Poland.

² Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX, United States

Kontynuując badania mające na celu uzyskanie odpowiedzi na postawione powyżej pytanie, zastosowałam ten sam model eksperymentalny [4]. Materiał badawczy do analiz aktywności chlorofilazy (Chlase) i zawartości kwasu aminolewulinowego (ALA) stanowiły krążki liściowe wycięte z 24-dniowych roślin grochu traktowane 75 μ M PQ przez 1, 2, 4 i 6 h, zaś dla oznaczenia zawartości chlorofilu (Chl), karotenoidów (Car), feofityny (Pheo), chlorofilidu (Chlide) i porfiryn - traktowane 24 i 48 h.

W roślinach w warunkach stresu ważne jest utrzymywanie równowagi pomiędzy rozkładem uszkodzonego Chl i jego syntezą *de novo*. Aby uniknąć uszkodzenia komórek na skutek fotodynamicznej aktywności Chl lub jego barwnych pochodnych, konieczna jest ich szybka degradacja (Takamiya i wsp. 2000). Rozkład Chl jest także bezpośrednim warunkiem wstępnej remobilizacji białek, lipidów chloroplastów i metali (Christ and Hörtensteiner, 2014), dlatego też proces ten odbywa się nie tylko w warunkach stresowych, ale także optymalnych w różnych fazach cyklu życia roślin. Pierwszym enzymem biorącym udział w degradacji Chl jest Chlase, zatem uzasadnione było oznaczenie aktywności tego enzymu we wszystkich badanych

wariantach. Aplikacja MEL prowokowała znaczące podwyższenie aktywności Chlase w liściach grochu H-MEL50 i H-MEL200, zarówno w czasie T_0 (przed inkubacją w PQ) jak też podczas działania stresu oksydacyjnego, choć po 4 i 6 h różnice te nie były już tak istotne (Rys. 3A). Rezultaty te były nieco zaskakujące, zażywszy na fakt, że u *A. thaliana*, aplikacja MEL hamowała ekspresję genu Chlase (CLH1) (Weeda i wsp. 2014). Nie zawsze jednak ekspresja tego genu i aktywność kodowanego przez niego enzymu korelują z utratą zielonej barwy podczas fizjologicznego dojrzewania owoców i starzenia, co oznaczałoby, że albo Chlase nie jest kluczowym enzymem warunkującym szybkość rozpadu Chl, albo jej działanie regulowane jest post-translacyjnie. Ponieważ poziom Chl jest stale modulowany przez cały okres życia rośliny, a szlak kataboliczny musi być ściśle kontrolowany, aby uniknąć nadmiaru fotodynamicznie aktywnych barwników, post-translacyjny mechanizm regulacyjny jest ergonomiczny i ma sens fizjologiczny; pozwala to roślinie na większą elastyczność (szybką adaptację) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe (Harpaz-Saad i wsp. 2007). Ponieważ rozkład uszkodzonego Chl i jego synteza *de novo* są naturalnymi procesami zachodzącymi w komórkach roślinnych, następnym krokiem było zbadanie, czy w stresie oksydacyjnym MEL wpływa na zawartość prekursora Chl – ALA. Aplikacja MEL do nasion grochu znacząco podwyższyła zawartość ALA natychmiast po potraktowaniu liści PQ (Rys. 3B), co sugeruje, że odgrywa ona ważną rolę w indukowaniu syntezy Chl *de novo*. W wariantach bez MEL (C i H) szlak biosyntezy Chl był spowalniany poprzez zmniejszoną syntezę tego prekursora. Wydłużona inkubacja w PQ (48 h) spowodowała znaczne odbarwienie krążków C i H, podczas gdy MEL w stęż. 50 i 200 μM zdecydowanie łagodziła ten symptom (Rys. 4). Zatem, podwyższona aktywność Chlase i zawartość ALA w krążkach liści H-MEL50 i H-MEL200 sugeruje, że w czasie pierwszych godzin inkubacji w PQ, MEL może przyspieszać zarówno rozpad uszkodzonego chlorofilu jak też jego syntezę *de novo*. Przedłużenie tego czasu do 24 i 48 h powodowało stopniowe, widoczne odbarwienie krążków liściowych. Barwniki fotosyntetyczne, w tym Chl *a*, Chl *b* i Car są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu fotosyntezy. Uważa się, że Car chronią Chl przed absorpcją nadmiaru energii, która mogłaby go uszkodzić. Stężenia tych barwników są ściśle ze sobą skorelowane, a stosunek Chl *a+b* do całkowitej zawartości Car to wskaźnik „zieloności” roślin. Generalnie stosunek ten maleje w starzejących się, chorych roślinach a rośnie w energicznie rosnących. W niniejszej pracy, przed aplikacją PQ (T_0), nie było różnic w stosunku Chl *a+b*/Car pomiędzy wszystkimi

wariantami, ale po 24 h wzrósł on, osiągając maksimum w krążkach liściowych H-MEL50 (Rys. 5). Znaczące obniżenie tego parametru zaobserwowano w krążkach C i H po 48 h inkubacji w PQ, podczas gdy w wariantach z MEL (H-MEL50 i H-MEL200) stosunek ten wciąż wzrastał. Było to związane z drastycznym spadkiem zawartości Chl i Car w krążkach liści C i H oraz ich znacznie wyższą zawartością w wariantach z MEL, co może potwierdzać pozytywny wpływ MEL na biosyntezę Chl i Car. Ponieważ Car mają znaczny potencjał w zakresie poprawy jakości odżywczej i wydajności roślin, uprawy roślin z podwyższoną zawartością tych związków są wysoce pożądane. Jest to więc kolejny argument świadczący na korzyść potencjalnego wykorzystania MEL do kondycjonowania nasion roślin uprawnych.

W wyniku działalności Chlase, inicjującej oddzielenie reszty fitolu od pierścienia porfiryнового, powstaje Chlide (Takamiya i wsp. 2000; Hörtensteiner, 2006). Im wyższy stosunek Chl/Chlide tym rozpad chlorofilu w tkankach jest mniej intensywny. W czasie T_0 najwyższy stosunek zarówno Chl *a*/Chlide *a*, jak i Chl *b*/Chlide *b* odnotowano w krążkach liści H-MEL200 (Rys. 7A, B). Po 24 h inkubacji w PQ stosunek Chl *a*/Chlide *a* zmniejszył się o około 20% we wszystkich badanych wariantach (Rys. 7A), podczas gdy Chl *b*/Chlide *b* pozostawał niemal nie zmieniony (Rys. 7B). Istotne zmiany pojawiły się dopiero po 48 h inkubacji, gdzie oba wskaźniki gwałtownie obniżyły się w krążkach liści C i H, podczas gdy w wariantach z MEL pozostały wysokie, zwłaszcza w krążkach H-MEL50.

Ponieważ jednak wykazano, że u niektórych roślin pierwszym produktem rozpadu chlorofilu jest feofityna *a* (Pheo *a*) (Schelbert i wsp. 2009, Dissanayake i wsp. 2012), zakłada się, że szlak degradacji tego barwnika nie musi przebiegać tylko za pośrednictwem Chlide *a*, ale obejmuje również tę pochodną Chl. Zatem kolejnym krokiem było sprawdzenie czy w analizowanym materiale pojawi się Pheo i czy na jej zawartość ma wpływ aplikacja egzogennej MEL do nasion. W czasie T_0 najniższą zawartość Pheo odnotowano w krążkach liści C, jednak po 24 h inkubacji w PQ zwiększyła się ona prawie 3-krotnie (Rys. 6B). Chociaż 24-godzinny stres wywołany przez PQ powodował znaczny wzrost zawartości Pheo we wszystkich badanych wariantach, to jednak najniższą akumulację odnotowano w krążkach liści H-MEL200. Podwyższony poziom Pheo w krążkach liści C prawdopodobnie wiązał się ze zwiększoną szybkością degradacji Chl poprzez tworzenie Pheo jako jego pochodnej. Potwierdza to hipotezę, że być może Chlide nie jest jedynym, uważanym przez wiele lat, pierwszym produktem rozpadu Chl. Wskazuje na to prawie niezmienny

stosunek Chl/Chlide po 24 h traktowania PQ. Gwałtownemu spadkowi zawartości Chl w krążkach liści C i H inkubowanych 48 h w PQ (Rys. 6A), towarzyszyły śladowe ilości Pheo, podczas gdy w krążkach liści H-MEL50 i H-MEL200 jej zawartość stanowiła odpowiednio 27 i 47% wartości T_0 (Rys. 6B). 48-godzinna inkubacja w PQ powodowała także drastyczny spadek zawartości ważnych prekursorów na szlaku biosyntezy Chl - protoporfiryny (Proto), Mg-protoporfiryny (MgProto) i protochlorofilidu (Pchlide) w krążkach liści C i H, podczas gdy w krążkach H-MEL50 i H-MEL200 ich zawartość była około dwa razy wyższa (Ryc. 8). To kolejny dowód na to, iż jednorazowa aplikacja MEL do nasion pozytywnie wpływa na przyspieszenie biosyntezy Chl w wyrosłych z nich roślinach.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że MEL opóźniając rozpad Chl i jednocześnie przyspieszając jego syntezę *de novo* pomaga utrzymać podwyższoną zawartość Chl w liściach grochu, zarówno zanim pojawi się stres (T_0) jak i w pierwszych godzinach jego działania. Przedłużenie czasu ekspozycji na działanie herbicydu pokazało, że MEL ewidentnie opóźnia degradację Chl w stresowanych tkankach. Wiadomo, iż na skutek regulacji post-transkrypcyjnych i post-translacyjnych, aktywacja genów lub poziom ich transkryptów nie zawsze korelują z efektami fizjologicznymi, jednak w niniejszej pracy taki wpływ MEL udokumentowano na poziomie biochemicznym i fizjologicznym. Niewątpliwie dalsze badania w tej materii pozwolą szczegółowo wyjaśnić mechanizmy działania MEL w obliczu stresów środowiskowych.

W związku z ogromnym zainteresowaniem jakim w ostatnich latach cieszy się rola jaką MEL odgrywa w organizmach roślinnych, oraz brakiem doniesień w języku polskim na ten temat, postanowiłam zebrać dostępną wiedzę w formie pracy przeglądowej. Stanowi ona kolejną część przedłożonego do oceny osiągnięcia naukowego.

Publikacja [6]

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

TOM 42 2015 NR 1 (43–66)

**MELATONINA ROŚLINNA – CZĄSTECZKA
WIELU ZADAŃ**

MELATONIN IN PLANTS – MULTIPURPOSE MOLECULE

Katarzyna SZAFRAŃSKA

Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

Celem tej pracy było zebranie i podsumowanie dostępnej wiedzy na temat fitomelatoniny, począwszy od historii jej odkrycia u roślin, poprzez najnowsze badania na temat jej biosyntezy w komórkach roślinnych, po przegląd najważniejszych funkcji jakie pełni. Właściwości antyoksydacyjne bezpośrednie i pośrednie, które pozwalają utrzymać odpowiedni stan redoks komórek są jedną z najistotniejszych jej cech, dlatego też znaczna część pracy dotyczyła tej właśnie funkcji. Kolejnym aspektem, który opisałam był wpływ MEL na proces fotosyntezy. Opóźniając degradację chlorofilu, przyspieszając transport elektronów oraz zwiększając asymilację CO₂ może ona podnosić efektywność i wydajność tego procesu, zwłaszcza w suboptymalnych warunkach. Zebrałam również dane na temat udziału MEL w regulacji wzrostu i rozwoju roślin, a także w regulacji rytmu okołodobowego i reakcji fotoperiodycznych. W ostatnim rozdziale opisałam rolę tej indoloaminy jaką pełni w ochronie tkanek przed szkodliwym działaniem stresów środowiskowych, poprzez udział w regulacji ekspresji genów i białek zaangażowanych w reakcje obronne.

Jest to obecnie najbardziej aktualna spośród opublikowanych w języku polskim publikacji naukowych dotyczących fitomelatoniny.

OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z OPISYWANEGO CYKLU PRAC

Za najważniejsze osiągnięcia zawarte w monotematycznym cyklu prac można uznać wykazanie że:

1. przedśiewne kondycjonowanie nasion *Vigna radiata* roztworem MEL modyfikuje charakter i sposób deponowania związków fenolowych akumulujących się po ustąpieniu stresu chłodu, co najprawdopodobniej sprzyja efektywnej regeneracji roślin;
2. MEL aplikowana do nasion działa protekcyjnie na ultrastrukturę komórek merystematycznych korzeni *Vigna radiata*, zarówno podczas działania stresu chłodu, jak i po jego ustąpieniu;
3. pozytywny efekt MEL w ograniczaniu wtórnego stresu oksydacyjnego przejawia się intensyfikacją aktywności PAL po ustąpieniu stresu chłodu, co wzmacnia biosyntezę *de novo* polifenoli, posiadających znaczne własności redukujące;
4. zabieg kondycjonowania nasion *Pisum sativum* L. z dodatkiem MEL poprawia późniejsze funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego wyrosłych z nich siewek podczas stresu oksydacyjnego indukowanego parakwatem, poprzez podwyższenie parametrów fluorescencji chlorofilu i ograniczenie ilości RFT w tkankach;
5. MEL usprawnia aparat fotosyntetyczny liści *Pisum sativum* L. traktowanych parakwatem regulując rozpad uszkodzonego chlorofilu i przyspieszając jego syntezę *de novo*.

Bibliografia

- Amarowicz R, Weidner S, Wojtowicz I, Karmać M, Kosińska A, Rybarczyk A. 2010. Influence of low-temperature stress on changes in the composition of grapevine leaf phenolic compounds and their antioxidant properties. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 4: 90–96.
- Bajwa VS, Shukla MR, Sherif SM, Murch SJ, Saxena PK. 2014. Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Pineal Res.* 56: 238-245.
- Cao S, Shao J, Shi L, Xu L, Shen Z, Chen W, Yang Z. 2018. Melatonin increases chilling tolerance in postharvest peach fruit by alleviating oxidative damage. *Sci. Rep-UK.* 8:806.
- Christ B, Hörtensteiner S. 2014. Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *J. Plant Growth Regul.* 33: 4–20.

- Čiamporová M, Mistrík I 1993. The ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environ. Exp. Bot.* 33: 11-26.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1062–1071.
- Dissanayake PK, Yamauchi N, Shigyo M. 2012. Presence of pheophytin and its formation as a chlorophyll derivative in selected crop species. *J. Agric. Sci.* 7: 127–134.
- Dixon RA, Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–97.
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwarah W, Schloot W. 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28-31.
- Ekmekci Y, Terzioğlu S. 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83: 69–81.
- Foyer C, Shigeoka S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155: 93–100.
- Hardeland R. 2016. Melatonin in plants – diversity of levels and multiplicity of functions. *Front. Plant Sci.* 7:198.
- Harpaz-Saad S, Azoulay T, Arazi T, Ben-Yaakov E, Mett A, Shibolet Y, et al. 2007. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is post-translationally regulated. *Plant Cell* 19: 1007–1022.
- Hattori A, Migita H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ. 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35: 627-634.
- Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 55–77.
- Iriel A, Novo JM, Cordon GB, Lagorio MG. 2014. Atrazine and methylviologen effects on chlorophyll *a* fluorescence revisited—implications in photosystems emission and ecotoxicity assessment. *Photochem. Photobiol.* 90: 107–112.
- Jahns P, Holzwarth AR. 2012. The role of xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 182–193.
- Janas KM, Cvikrová M, Pałagiewicz A, Szafrńska K, Posmyk MM. 2002. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperatures. *Plant Sci.* 163: 369–373.
- Kołodziejczyk I, Bałabusta M, Szewczyk R, Posmyk MM. 2015. The levels of melatonin and its metabolites in conditioned corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during storage *Acta Physiol. Plant.* 37(6):105.
- Kołodziejczyk I, Dzitko K, Szewczyk R, Posmyk MM 2016 a. Exogenous melatonin expediently modifies proteome of maize (*Zea mays* L.) embryo during seed germination. *Acta Physiol. Plant.* 38:146.
- Kołodziejczyk I, Dzitko K, Szewczyk R, Posmyk MM. 2016 b. Exogenous melatonin improves corn (*Zea mays* L.) embryo proteome in seeds subjected to chilling stress. *J. Plant Physiol.* 193: 77–56.
- Król A, Amarowicz R, Weidner S. 2015. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 189: 97–104.
- Kubala S, Wojtyła T, Garnczarska M. 2013. Kondycjonowanie jako strategia uszlachetniania nasion. *Post. Biol. Kom.* 40(2): 215-230.
- Kuraś M, Stefanowska-Wronka M, Lynch JF, Zobel AM. 1999. Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of root cap in seeds of *Brassica napus* – changes in the localization of phenolic compounds during germination. *Ann Bot* 84:135–43.
- Lee SH, Singh AP, Chung GC, Kim YS, Kong IB. 2002. Chilling root temperature causes rapid ultrastructural changes in cortical cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) root tips. *J. Exp. Bot.* 53:2225–37.

- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. 1958. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am. Chem. Soc.* 80(10): 2587-2587.
- Lichtenthaler H K. 2007. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α – tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthesis irradiance. *Photosynth. Res.* 92, 163-179.
- Lipiński P, Drapier JC. 1997. Interplay between ferritin metabolism, reactive oxygen species and nitric oxide. *J. biol. Inorg. Chem.* 2: 559-566.
- Lukatkin AS. 2005. Initiation and development of chilling injury in leaves of chilling sensitive plants. *Russ. J. Plant Phys.* 52(4): 542-546.
- Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan D-X, Reiter RJ. 2015. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res.* 59: 403-419.
- Martinez V, Nieves-Cordones M, Lopez-Delacalle M, Rodenas R, Mestre TC, Garcia-Sanchez F, Rubio F, Nortes PA, Mittler R, Rivero RM. 2018. Tolerance to stress combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. *Molecules* 2018, 23: 535
- Maxwell K, Johnson NG. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Moustaka J, Tanou G, Adamakis ID, Eleftheriou EP, Moustakas M. 2015. Leaf age-dependent photoprotective and antioxidative response mechanisms to paraquat-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 13989-14006.
- Osawa T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems, pp 241-251. In: Uritani I., Garcia V.V., Mendosa E.M. (Eds), Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in the tropics. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press, 1994.
- Piślewska M, Bednarek P, Stobiecki M, Zieliński M, Wojtaszek P. 2002. Cell wall-associated isoflavonoids and β -glucosidase activity in *Lupinus albus* plants responding to environmental stimuli. *Plant Cell. Environ.* 25: 29-40.
- Plažek A, Skrzypek E, Žur I. 2000. The change of heat emission and phenolic compounds level in *Hordeum vulgare* (L.) and *Festuca pratensis* (Huds.) calli treated with *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem, phytochemicals. *J. Agron. Crop Sci.* 184: 1-72.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 61: 253-278.
- Rezanejad F. 2009. Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L. (*Cupressaceae*). *Grana* 48: 205-213.
- Roitto M, Rautio P, Julkunen-Tiitto R, Kukkola E, Huttunen S. 2005. Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environ. Pollut.* 137: 603-9.
- Shi H, Chen K, Wei Y and He C. 2016. Fundamental issues of melatonin-mediated stress signalling in Plants. *Front. Plant Sci.* 7:1124.
- Schelbert S, Aubry S, Burla B, Agne B, Kessler F, Krupińska K, Hörtensteiner S. 2009. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 767-785.
- Serôdio J, Lavaud J. 2011. A model for describing the light response of the non- photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosyn. Res.* 108: 61-76.
- Sowiński P, Rudzińska-Langwald A, Adameczyk J, Kubica I, Fronk J. 2005. Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature. *J. Plant Biol.* 162: 67-80.
- Stefanowska M, Zobel AM, Kuraś M. 2003. Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of the root cap during maturation of seeds of *Brassica napus* L. *Plant Biol.* 5: 378-382.
- Szafrńska K, Kalwinek J, Gabara B, Janas KJ. 2005. Phenolic compounds level and localization in chilled roots of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *J. Biol. Res.* 4: 157-66.

- Takamiya KI, Tsuchiya T, Ohta H. 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.* 5: 426–431.
- Tambussi EA, Bartoli CG, Guiamet JJ, Beltrano J, Araus JL. 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Sci.* 167: 19–26.
- Vartapetian BB, Jackson MB. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. - *Ann. Bot.* 79: 3-20.
- Wang N, Li B, Feng HL, Zhang QY, Yang XH, Meng QW. 2010. Antisense-mediated suppression of tomato zeaxanthin epoxidase alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance. *Photosynthetica* 48: 409–416.
- Wang X, Li W, Welti R. 2006. Profiling lipid changes in plant responses to low temperatures. *Physiol. Plant.* 126: 90-96.
- Weeda S, Zhang N, Zhao X, Ndip G, Guo Y, Buck GA, Fu C, Ren S. 2014. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS ONE* 9:e93462.
- Weidner S, Kordala E, Brosowska-Arendt W, Karamač M, Kosińska A, Amarowicz R. 2009. Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under low-temperature stress followed by recovery. *Acta Soc. Bot. Pol.* 78: 279–86.
- Zhang N, Sun Q, Zhang H, Cao Y, Weeda S, Ren S, Guo Y-D. 2015. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp. Bot.* 66(3): 647–656.
- Zhang N, Sun Q, Li H, Li X, Cao Y, Zhang H, Li S, Zhang L, Qi Y, Ren S, Zhao B and Guo Y-D. 2016. Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Front. Plant Sci.* 7:197.

IV. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

1. PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

W 1993 r. rozpoczęłam wyższe studia magisterskie na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UŁ, a na IV roku studiów po wyborze specjalności biotechnologia miałam możliwość zapoznania się z tematyką badawczą Katedry Regulacji Wzrostu Roślin. Tam, pod kierownictwem prof. dr hab. Krystyny M. Janas włączyłam się w nurt badawczy Katedry i zajęłam się analizą wpływu niskiej temperatury na zawartość związków fenolowych w korzeniach siewek soi. W ramach mojej pracy magisterskiej wykazałam, że pod wpływem chłodu w korzeniach gromadziły się syntetyzowane *de novo* związki fenolowe, gdyż zastosowanie AIP (inhibitora amonikolizacji L-fenyloalaniny (PAL) – kluczowego enzymu na szlaku fenylopropanoidów) ograniczało ich zawartość. Dowiodłam również, iż w korzeniach soi z serii kontrolnej – niestresowanej, gromadziły się flawonoidy: daidzeina oraz glikozydowa pochodna genisteiny – genistina, natomiast pod wpływem chłodu genistina zanikała, zaś poziom daidzeiny wzrastał. Opisałam więc jakościową modyfikację indukowaną chłodem. Ponadto, wykazałam, że ekstrakty fenolowe uzyskane z chłodzonych korzeni soi hamują rozwój bakterii *Rhodococcus aquii*. Już wtedy zauważyłam, iż gromadzące się pod wpływem stresu abiotycznego związki fenolowe mogą mieć szersze, krzyżowe znaczenie ochronne, gdyż hamują rozwój niektórych niesymbiotycznych bakterii żyjących w glebie.

Po uzyskaniu w 1998 r. tytułu magistra biologii rozpoczęłam studia doktoranckie w Stacjonarnym Studium Doktoranckim Fizjologiczno-Mikrobiologicznym UŁ, i pod kierownictwem prof. dr hab. Krystyny M. Janas kontynuowałam tematykę związaną z udziałem metabolizmu polifenoli w reakcjach adaptacyjnych siewek soi do niskich temperatur. Po roku (08.11.1999) zostałam zatrudniona w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, na stanowisku asystenta w Katedrze Regulacji Wzrostu Roślin (obecnie Pracownia Ekofizjologii Roślin), a w latach 2001/2002 kierowałam projektem finansowanym przez Komitet Badań Naukowych nt. „Rola izoflawonoidów w aklimatyzacji siewek soi do niskiej temperatury” – (6 PO4C 029 20).

W ramach pracy doktorskiej wykazałam, że stres niskiej temperatury wywoływał spadek potencjału wody w komórkach korzeni i hipokotyli soi, czemu towarzyszyła synteza proliny. W tkankach tych rosła aktywność PAL, która jednak nie była skorelowana ze wzrostem zawartości polifenoli rozpuszczalnych i izoflawonoidów. Przedłużający się chłód powodował spadek zawartości aglikonów (daidzeiny i genisteiny), lecz wzrost glukozydu genisteiny – genistiny, co może sugerować, że formy glukozydowe izoflawonoidów mogą działać jak magazyn, mobilizowany w krytycznych momentach. Dowiodłam także, że niska temp. wywoływała wtórny stres oksydacyjny, o czym świadczył podwyższony poziom H_2O_2 . Zjawisku towarzyszył spadek aktywności CAT oraz podwyższona aktywność peroksydaz, co wskazywało, że główną rolę w eliminowaniu RFT w pierwszych dniach chłodzenia może odgrywać cykl fenolo/peroksydazo/askorbinowy. W teście z ABTS^{•+} i DPPH[•] potwierdzone zostały także właściwości antyoksydacyjne etanolowych ekstraktów polifenoli. Wykazałam również, że ekstrakty z chłodzonych korzeni siewek soi wykazywały silniejsze własności grzybobójcze niż ekstrakty z korzeni siewek kontrolnych i chłodzonych w obecności AIP, co może świadczyć o krzyżowej odporności, jaką nabywają dzięki syntetyzowanym związkom rośliny poddane działaniu stresu chłodu. Obrona mojej dysertacji doktorskiej pt. „Podwyższenie tolerancji na stres oksydacyjny wywołany niską temperaturą w siewkach soi (*Glycine max* (L.) Merr.): możliwy udział związków fenolowych i enzymów antyoksydacyjnych” odbyła się we wrześniu 2004 r. Promotorem pracy była prof. dr hab. Krystyna M. Janas, a recenzentami prof. dr hab. Henryk Urbanek (UŁ) i prof. dr hab. Zbigniew Miszański (PAN Kraków).

Wyniki badań prowadzonych w latach 1998-2004 zostały opublikowane w 5 artykułach (Janas i wsp. 1999, 2002, Szafrńska i wsp. 2002, 2004, Posmyk i wsp. 2002) (**Załącznik 9**) jak również przedstawione na 7 konferencjach krajowych i zagranicznych (Janas i wsp. 1999 (Kraków); Janas i wsp. 2000 (Poznań); Szafrńska i wsp. 2001 (Kraków); Posmyk i wsp. 2001 (Kraków); Posmyk i wsp. 2002 (Heraklion); Szafrńska i wsp. 2003 (Stará Lesná); Posmyk i wsp. 2003 (Olsztyn)) (**Załącznik 10**).

2. PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Ekofizjologii i Rozwoju Roślin UŁ. W dalszym ciągu przedmiotem moich badań były związki fenolowe akumulujące się w odpowiedzi roślin na stres niskiej temperatury. Tym razem postanowiłam zbadać to zjawisko na poziomie ultrastrukturalnym - cytologicznym, w tym celu nawiązałam współpracę z Katedrą Cytologii i Cytochemii Roślin UŁ, dzięki której byłam w stanie zlokalizować złogi fenolowe na poziomie komórkowym i częściowo określić ich charakter. Analiza ultrastrukturalna wykazała obecność związków fenolowych, w postaci ciemnych różniących się kształtem i wielkością złogów, w cytoplazmie i wakuolach zarówno korzeni soi rosnących w warunkach optymalnych - kontrolnych (25°C), jak i w stresie chłodu (5°C). W grupie kontrolnej - niestresowanej złogi te zlokalizowane były głównie w cytoplazmie, natomiast w korzeniach chłodzonych – w wakuolach. W chłodzie, w preparatach utrwalanych z kofeiną, złogi te nie pojawiały się już w cytoplazmie, a wakuole z 1-2 złogami i wyraźnym tonoplastem (wakuole typu pierwszego) dominowały nad wakuolami z małymi złogami częściowo pokrywającymi tonoplast (wakuole typu drugiego) oraz z małymi licznymi złogami prawie całkowicie pokrywającymi tonoplast (wakuole typu trzeciego). Uzyskane wyniki sugerują, że przynajmniej część złogów zlokalizowanych w cytoplazmie i w pierwszym typie wakuol (z czystym tonoplastem) reprezentowała fenole epikatechino-podobne. Wyniki te opisano w publikacji Szafrńska i wsp. 2005 (Załącznik 9) oraz przedstawiono na III zjeździe PTB w Toruniu (Szafrńska i wsp. 2004 (Toruń)) (Załącznik 10).

Poszukując dalszych inspiracji naukowych nawiązałam współpracę z Pracownią Biotechnologii Instytutu Warzywnictwa w Skierniewicach, gdzie odbyłam 3-tygodniowy staż naukowy, podczas którego szkoliłam się w uzyskiwaniu linii homozygotycznych z kultur pylnikowych i izolowanych mikrospor marchwi. W przyszłości zaowocowało to nawiązaniem ścisłej współpracy i pozyskaniem grantu przyznanego przez MNiSW nt. „Wykorzystanie kultur pylnikowych marchwi do poszukiwania genotypów odpornych na toksyczne działanie jonów miedzi” (N305 040 31/1576), którego byłam kierownikiem. Celem badań było określenie wpływu Cu^{2+} na zdolności regeneracyjne zarodków androgenicznych 4 różnych odmian

marchwi (Narbonne, Feria, 1014 i Kazan) oraz stwierdzenie, czy rozety powstałe z tych zarodków można wykorzystać do selekcji odmian odpornych/wrażliwych na miedź. Cu^{2+} dodawano do pożywki w 4 stężeniach: 0,1 μM (kontrola), 1 μM , 10 μM , 100 μM i po 24 tygodniach analizowano uzyskane rozety. Wrażliwość marchwi na Cu^{2+} oceniano na podstawie zahamowania wzrostu, zmian w utlenianiu lipidów błonowych oraz zawartości wolnej proliny i chlorofilu. Wyniki osiągnięte w ramach projektu wskazują, że badane genotypy kultur marchwi reagują odmiennie na Cu^{2+} dodaną do medium hodowlanego. W przypadku wszystkich odmian niskie stężenie Cu^{2+} (1 μM) nie wpływało lub pobudzało regenerację kultur, podczas gdy u większości stężenia 10 i 100 μM były toksyczne szczególnie po II pasażu (16 tyg). Spośród czterech kultur wziętych do badań, na podstawie wzrostu wybrano dwie: Feria i linię hodowlaną 1014. Marchew odm. Feria wykazywała wyższe zdolności regeneracyjne niż 1014 gdy rosła w obecności 100 μM Cu^{2+} . Duża ilość Cu gromadziła się w tkankach marchwi gdy rosły wobec najwyższego z badanych stężeń. Początkowo po II pasażu więcej Cu gromadziło się u odm. Feria niż 1014, lecz po III pasażu (24 tyg.) sytuacja była odwrotna i więcej Cu akumulowało się w linii 1014. Utlenianie lipidów błon komórkowych nie zmieniało się u odm. Feria podczas gdy w rozetach marchwi linii 1014 obserwowano 2-krotny wzrost zawartości TBARS po II pasażu w porównaniu z pasażem III. Gromadzący się metal powodował stres oksydacyjny, który prowadził do mniejszych zdolności regeneracyjnych kultur linii 1014. Wzrost stężenia Cu^{2+} w pożywce hodowlanej powodował także obniżenie stężenia chlorofilu. Wraz ze wzrostem stężenia Cu^{2+} w pożywce u odm. Feria po II i III pasażu rosła natomiast zawartość proliny. Podobny trend obserwowano u linii 1014, lecz chociaż w rozetach regenerujących w obecności 10 μM Cu^{2+} obserwowano 2-krotny wzrost zawartości proliny, to jednak 100 μM Cu^{2+} w medium powodowało znaczny spadek zawartości tego aminokwasu. Wyższa regeneracja kultur 1014 w obecności 10 μM Cu^{2+} wydaje się być spowodowana niższym stężeniem Cu w tkankach i wyższą zawartością proliny. Zdaje się więc, że w tej linii ważną rolę w ochronie przed stresem metalu odgrywa prolina, która zabezpiecza błony lipidowe przed uszkodzeniami spowodowanymi Cu^{2+} . Jednakże, stres spowodowany wysokim stężeniem Cu^{2+} (100 μM) był tak wysoki, że system antyutleniający był niezdolny do przeciwstawienia się stresowi. W badanym materiale analizowano również poziom poliamin (Put, Spd, Spm, Dap i Cad) i jak wynika z przeprowadzonych badań, większe znaczenie w ochronie przed

stresem spowodowanym badanym metalem miały poliaminy rozpuszczalne w PCA niż te nierozpuszczalne. W kulturach marchwi sprawdzono także poziom kwasów fenolowych (zarówno wolnych jak i w postaci estrów), które są ważnymi związkami zabezpieczającymi rośliny przed stresem. Szczególną rolę odgrywał tu kwas chlorogenowy, którego zawartość była wyższa u odm. Feria lepiej znoszącej wysokie stężenia Cu^{2+} . Wyniki uzyskane w ramach tego projektu wskazują, że reakcja kultur marchwi na Cu^{2+} jest zróżnicowana i zależy nie tylko od genotypu użytego do badań, ale też wydaje się od środowiska, z którego pochodziły rośliny mateczne. Efektem współpracy z Pracownią Biotechnologii i realizacji w/w projektu było 7 publikacji (Górecka i wsp. 2007; Janas i wsp. 2007; Szafrńska i wsp. 2009a; 2009b; 2010a, 2010b, Kowalska i wsp. 2012) (**Załącznik 9**) w czasopismach polskich i zagranicznych oraz 4 komunikaty konferencyjne (Janas i wsp. 2007 (Warszawa); Szafrńska i wsp. 2008 (Kraków); Szafrńska i wsp. 2008 (Tampere); Szafrńska i wsp. 2009 (Shanghai)) (**Załącznik 10**). W ramach tej kooperacji Pracownia Biotechnologii zleciła także naszej Katedrze wykonanie usług badawczych, których byłam głównym wykonawcą i sprawozdawcą. Między Instytutem Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach a Uniwersytetem Łódzkim nawiązane zostały dwie umowy na wykonanie prac badawczych w ramach tematu: „Nowa Technologia wprowadzania materiałów wyjściowych hodowli mieszańców F_1 marchwi”

- 1) UDA-POIG.01.03.01-10-114/08-03
- 2) UDA-POIG.01.03.01-10-114/08-05

Moją ogromną ambicją było dalsze pogłębianie wiedzy i rozwijanie swoich kwalifikacji w jakimś prestiżowym ośrodku naukowym, dlatego też nawiązałam współpracę z prof. Massimo Delledonne - kierownikiem Katedry Biotechnologii Uniwersytetu w Weronie. W międzyczasie aplikowałam o 6-cio miesięczne stypendium naukowe na wyjazd zagraniczny w Biurze Uznawalności Wykształcenia i Wymiany Międzynarodowej, które otrzymałam. W 2006 r. Prof. Delledonne zaprosił mnie do swojego laboratorium gdzie w sumie odbyłam 1,5 roczny staż podoktorski (**Załącznik 11**). Podczas tego pobytu miałam okazję poznać wiele technik biologii molekularnej, lecz moim głównym projektem było wykorzystanie metody cDNA-AFLP do analizy ekspresji genów podczas interakcji pomiędzy melonem (*Cucumis melo* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis (FOM). Projekt „Fusamelo” wykonywany był we współpracy z Centrum Naukowym Patologii Roślin w

Rzymie oraz Centrum Naukowym Ogrodnictwa w Monsanpolo. Był on niezwykle ważny, ponieważ FOM jest grzybem zasiedlającym glebę powodującym bardzo poważną chorobę plantacji melona na całym świecie, a mianowicie naczyniowe więdnienie melona, nazywane inaczej tracheofuzariozą. Patogen ten jest bardzo niebezpieczny dla upraw, gdyż poprzez formowanie chlamydospor zasiedla glebę na wiele lat, co stanowi naprawdę duży problem we Włoszech. Celem tego projektu była charakterystyka oporności i wrażliwości melona na FOM, dzięki analizie profili transkrypcyjnych (cDNA-AFLP) w łodygach melona infekowanych szczepami FOM oraz identyfikacji fragmentów FOM ulegających ekspresji, które mogą pomóc w różnicowaniu szczepów oraz charakterystyce wirulentnych dominantów. Materiałem doświadczalnym do analizy cDNA-AFLP były rośliny melona odmiany Charentais Fom-2, która jest oporna na szczep 0 i 1 oraz wrażliwa na szczep 2 i 1,2. Zastosowano 3 izolaty FOM: izolat 1070 należący do szczepu 1 będący awirulentnym dla melona oraz 2 wirulentne izolaty należące do szczepu 1,2 - izolat 1018 (zakłócający wzrost waskularny) i izolat 1083 (dający silniejsze symptomy, zakłócający wzrost waskularny i parenchymatyczny). Rośliny melona w stadium czwartych liści były inokulowane poprzez 30-to minutowe zanurzenie korzeni w zawieszynie konidiów FOM o stężeniu 1×10^6 /ml. W badaniach zastosowano technikę AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) pozwalającą na selekcyjną amplifikację restrykcyjnych fragmentów genomu lub cDNA, które są rozdzielane na żelu poliakrylamidowym. Wykonano około 50 takich dużych żeli poliakrylamidowych, analizując 128 kombinacji primerów, co pozwoliło na wizualizację około 7000 transkryptów. Większość z nich nie wykazywała żadnych zmian transkrypcyjnych. Do dalszych analiz wyselekcjonowano zatem około 900 fragmentów, różniących się ekspresją w czasie kompatybilnych i niekompatybilnych interakcji. Spośród fragmentów pochodzących z *Fusarium oxysporum* wybrano 150. Kolejnym etapem było wycięcie z żeli interesujących nas prążków, ponowna amplifikacja tych wyselekcjonowanych fragmentów, oczyszczenie i zsekwencjonowanie. Analiza klastrów przedstawiających wybrane fragmenty wykazała, że ogromna liczba genów była modulowana w późniejszym stadium infekcji szczepem 1,2 (kompatybilna interakcja) prawdopodobnie dzięki rozwijającym się symptomom lub ekspresji genów grzybowych w silnie zainfekowanych roślinach. Liczba genów ulegająca specyficznej ekspresji podczas niekompatybilnej interakcji była relatywnie niska. Transkrypty pochodzenia grzybowego ulegające specyficznej (lub preferencyjnej) ekspresji

w poszczególnych szczepach mogą stanowić podstawę późniejszych badań nad metodami szybkiej detekcji szczepu 1,2 oraz genetyczną kontrolą mechanizmów wirulencji. Jest wiele szczepów *Fusarium*, nasze badania dotyczyły tylko 3 izolatów, lecz uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do bardziej szczegółowych analiz. Rezultaty otrzymane w ramach tego projektu zostały przedstawione na 5 konferencjach naukowych (Szafrńska i wsp. 2007 (Perugia); Fusari i wsp. 2007 (Riva del Garda); Szafrńska i wsp. 2008 (Avignon); Szafrńska i wsp. 2008 (Alghero); Szafrńska i wsp. 2008 (Padova)) (**Załącznik 10**).

Po powrocie do kraju pod koniec 2007 r. włączyłam się w nurt badań naukowych Katedry Ekofizjologii i Rozwoju Roślin nad rolą MEL aplikowanej do nasion w późniejszej odpowiedzi siewek na czynniki stresowe. Byliśmy pierwszą jednostką naukową, która jako formę aplikacji MEL zastosowała kondycjonowanie nasion roztworem MEL. Nikt inny tego nie robił, a jako formę aplikacji najczęściej stosowano opryski lub podlewanie roślin roztworem MEL. Zważywszy na moje wcześniejsze zainteresowania naukowe, tym razem również postanowiłam sprawdzić, czy aplikacja egzogennej MEL do nasion *Vigna radiata* wpływa na metabolizm związków fenolowych w kilkudniowych siewkach poddanych stresowi chłodu i ponownej regeneracji. W efekcie tych badań powstały 3 publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, które szczegółowo omówione zostały w części III (Szafrńska i wsp. 2012, 2013, 2014) (**Załącznik 5**). Wyniki przedstawiono także na jednej konferencji naukowej (Szafrńska i wsp. 2013a, b (Olsztyn)) (**Załącznik 10**).

Kolejnym zagadnieniem, które postanowiłam zgłębić był potencjalny wpływ MEL aplikowanej do nasion na proces fotosyntezy zachodzący w wyrosłych z nich roślinach. Tym razem model badawczy stanowiły siewki grochu poddawane stresowi oksydacyjnemu na skutek działania parakwatu (PQ). Wyniki moich badań opublikowano w 2 publikacjach w wysoko punktowanym czasopiśmie, które również wchodzi w skład osiągnięcia naukowego (Szafrńska i wsp. 2016, 2017) (**Załącznik 5**). Rezultaty tych badań zaprezentowane zostały na 3 konferencjach naukowych (Szafrńska i wsp. 2015 (Poznań); Szafrńska i wsp. 2014 (Zakopane), Szafrńska i wsp. 2017 (Zakopane)) (**Załącznik 10**).

Na posiedzeniu Rady Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 06.03.2018 r. przedstawiłam tezy mojej rozprawy habilitacyjnej, które zostały przyjęte jednomyślnie.

Osiągnięcia naukowe	Liczba	IF (rok publ)	IF V-letni	Punkty MNiSW (rok publ)	Punkty MNiSW *
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (seria monotematycznych publikacji)	6	13,731	15,048	160	175
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych (bez publikacji włączonych do osiągnięcia naukowego) w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR)					
Przed doktoratem	2	1,763	4,951	22	55
Po doktoracie	6	14,654	18,788	172	200
Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopiśmie międzynarodowych lub krajowych, nieuwzględnionych na liście Journal Citation Reports (JCR)					
Przed doktoratem	3	-	-	9	39
Po doktoracie					
Prace oryginalne	5	-	-	21	57
Publikacje przeglądowe	2	-	-	12	24
Proceedings	2	-	-	10	10
Rozdziały w monografii zagranicznej	3	-	-	15	15
RAZEM	29	30,148	38,787	421	575

Sumaryczne parametry	
Index Hirscha*	8
Suma cytowań*	258
Liczba projektów badawczych	3
Funkcja Kierownika	2
Funkcja Wykonawcy	1
Nagrody za działalność naukową	3
Udział w krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych	25
Liczba wygłoszonych referatów	1

dr Katarzyna Szafrńska



Łódź 25.03.2018