

**Załącznik nr 2**

**AUTOREFERAT**

**Dr Ewelina Ratajczak**

Instytut Dendrologii  
Polskiej Akademii Nauk  
Pracownia Biochemii Nasion

Kórnik, październik 2015 r.

## **1. Ewelina Ratajczak**

### **2. Posiadane tytuły zawodowe i stopnie naukowe:**

#### **a) Magister biologii (1999)**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii.

Tytuł pracy: „**Peptydy tiolowe w korzeniach roślin motylkowych w warunkach stresu oksydacyjnego spowodowanego działaniem jonów ołowiu.**”

Promotor pracy prof. dr hab. Barbara Tomaszewska

#### **b) Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii (2004)**

Instytut Dendrologii PAN w Kórniku, Pracownia Biochemii Nasion

Tytuł pracy: „**Stres oksydacyjny jako czynnik wpływający na żywotność nasion buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) podczas przechowywania i podsuszania.**”

Promotor pracy prof. dr hab. Stanisława Pukacka

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

a) **1998 - 1999** młodszy technik dokumentalista- ½ etatu Instytut Dendrologii PAN w Kórniku;

b) **2000 - 2003** stypendium doktoranckie- Instytut Dendrologii PAN w Kórniku;

c) **2004 - 2007** biolog – Instytut Dendrologii PAN w Kórniku;

d) **od 2007** adiunkt- Instytut Dendrologii PAN w Kórniku;

**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:**

**„Molekularne podstawy starzenia się nasion drzew”**

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

- 1. Ratajczak E, Małecka A, Bagniewska-Zadworna A, Kalemba EM (2015) The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. Journal Plant Physiology 174:147–156.**

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował zainicjowanie badań, zaplanowanie doświadczeń, przygotowanie nasion do zaplanowanych analiz. Analizę poziomu reaktywnych form tlenu: anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru. Pomiar aktywności enzymu antyoksydacyjnego katalazy. Opracowanie i interpretacja wyników wchodzących w skład pracy. Przygotowanie, napisanie manuskryptu i jego korektę. Jestem autorem korespondencyjnym tego artykułu. Mój udział szacuję na 65%.*

**IF- 2,557; MNiSW-35; MNiSW (2014) – 35**

- 2. Pukacka S, Ratajczak E (2014) Factors influencing the storability of *Fagus sylvatica* L. seeds after release from dormancy. Plant Growth Regulation 72:17-27.**

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował zbiór nasion i przygotowanie materiału badawczego do analiz. Analizę poziomu reaktywnych form tlenu: anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu wodoru. Pomiar zawartości kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego, glutationu jego formy zredukowanej i utlenionej. Analizę stanu błon cytoplazmatycznych: pomiar zawartości fosfolipidów, kwasów tłuszczowych, wolnych kwasów tłuszczowych,  $\alpha$ -tokoferolu. Udział w opracowaniu otrzymanych danych. Udział w interpretacji wyników, w pisaniu manuskryptu oraz w jego korekcie. Mój udział szacuję na 60%.*

**IF- 1,672; MNiSW-30; MNiSW (2014) – 30**

- 3. Ratajczak E, Kalemba EM, Pukacka S (2015) Age-related changes in protein metabolism of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during alleviation of dormancy and in early stage of germination. Plant Physiology Biochemistry 94:114-121.**

*Mój udział w powstanie pracy obejmował przygotowanie nasion buka do analiz. Analizę zawartości białek w tym białek rozpuszczalnych obecnych w nasionach, analizę aktywności enzymów proteolitycznych: endopeptydaz, karboksypeptydaz i aminopeptydaz oraz zawartości wolnych aminokwasów. Analizę syntezy białek przy zastosowaniu radioizotopu  $^{14}\text{C}$ -leucyny. Udział w opracowaniu otrzymanych danych. Współuczestniczenie w interpretacji otrzymanych wyników. Udział w korekcie manuskryptu. Mój udział szacuję na 50%.*

**IF- 2.756; MNiSW-35; MNiSW (2014) – 35**

4. **Ratajczak E**, Ströher E, Oelze ML, Kalemba EM, Pukacka S, Dietz KJ (2013) The involvement of the mitochondrial peroxiredoxin Prx IIF in defining physiological differences between orthodox and recalcitrant seeds of two *Acer* species. *Functional Plant Biology* 40:1005-1017.

*Mój wkład w powstanie pracy obejmował zainicjowanie badań, zaplanowanie doświadczeń, zbiór materiału badawczego i jego przygotowanie do analiz. Wykonanie doświadczeń dotyczących: identyfikacji mitochondrialnej peroksyredoksyny IIF (PrxIIF) przy zastosowaniu metody Western-blot, analizy zawartości białek regulujących stan redoks w komórkach nasion obu klonów przez wykonanie diagonalnej elektroforezy 2D redoks, analizy poziomu transkryptu białka PrxIIF metodą RT-PCR. Opracowanie i interpretację wyników, pisanie manuskryptu i jego korektę. Jestem autorem korespondencyjnym tego artykułu. Mój udział szacuję na 60%.*

**IF 2,569; IF (2014)- 3,145; MNiSW-30; MNiSW (2014) – 35**

**Suma IF- 9,554/10,13**

**Suma punktów MNiSW – 130/135**

IF podano według roku publikacji oraz dla roku 2014.

Punkty MNiSW według listy wykazu czasopism naukowych w roku wydania publikacji oraz z roku 2014.

### c) Cel naukowy ww. prac i osiągniętych wyników.

Nasiona są organami roślinnymi służącymi do reprodukcji i rozprzestrzeniania gatunku. Podobnie jak każdy organ roślinny podlegają procesowi starzenia, który w efekcie prowadzi do spadku żywotności i utraty najważniejszej ich właściwości jaką jest kiełkowanie. Problem starzenia się nasion jest bardzo ważny z punktu widzenia gospodarczego jak i naukowego. Starzenie się nasion połączone jest z mniejszym lub większym ograniczeniem metabolizmu. Finałem procesu starzenia się nasion jest ich śmierć. Proces ten bada się różnymi metodami biorąc pod uwagę, że zachowanie żywotności nasion zależy od ich właściwości genetycznych. Starzenie się nasion związane jest ze stopniem odporności nasion na działanie całego kompleksu czynników abiotycznych (wilgotności, temperatury, oświetlenia, czynników mechanicznych i chemicznych) oraz biotycznych (głównie grzybów, bakterii itp.). Generalnie uważa się, że reaktywne formy tlenu (RFT) inicjują proces starzenia się nasion, powodując degradację fosfolipidów błon komórkowych, jak również degradację strukturalno-funkcyjną białek oraz materiału genetycznego.

W Pracowni Biochemii Nasion Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku starzenie się nasion drzew jest jednym z głównych tematów badań, a najczęstszymi obiektami modelowymi są nasiona buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.), klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) oraz klonu jaworu (*Acer pseudoplatanus* L.). Nasiona buka, należą do kategorii *intermediate* (pośrednie), tracą stosunkowo szybko żywotność w porównaniu z nasionami *orthodox* (odpornymi). Lata nasienne buka powtarzają się nieregularnie. Istnieje wobec tego duża gospodarcza potrzeba długoterminowego przechowywania nasion, w celu zapewnienia materiału do reprodukcji. Nasiona klonów różnych gatunków są bardzo ciekawym obiektem badawczym ponieważ należą do tego samego rodzaju, jednakże charakteryzują się różną odpornością na podsuszanie. Klon zwyczajny produkuje nasiona odporne na wysychanie (*orthodox*), natomiast nasiona jaworu są wrażliwe (*recalcitrant*), cechuje je wysoka wilgotność wyjściowa, a obniżenie jej poniżej 27% zawartości wody przyczynia się do stopniowej utraty żywotności.

Głównym celem badań było poznanie przyczyn i mechanizmów starzenia się nasion drzew. Realizując ten cel starałam się odpowiedzieć na następujące pytania:

- 1) Gdzie zlokalizowane są RFT w osiach zarodkowych nasion buka zwyczajnego i czy ta lokalizacja może powodować spadek żywotności nasion i tym samym czy RFT są istotnym czynnikiem starzenia się nasion buka? [1]

- 2) Jak nasiona buka przed i po ustąpieniu spoczynku reagują na proces przechowywania? [2]
- 3) Czy proces długoterminowego przechowywania nasion buka wpływa na aktywność enzymów proteolitycznych, zawartość wolnych aminokwasów oraz syntezę *de novo* białek? [3]
- 4) Czy białka peroksyredoksyny mają wpływ na zachowanie żywotności nasion i czy uczestniczą w definiowaniu różnic między nasionami *orthodox* i *recalcitrant*? [4]

We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że utracie żywotności nasion buka zwyczajnego przechowywanych przez okres 10 lat towarzyszył wzrost poziomu RFT: nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) i anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\bullet-}$ ) oraz produktów peroksydacji lipidów. Wykazano wysoką, ujemną korelację między żywotnością nasion a poziomem RFT, oraz lipidowych hydroksynadtlenków (LPHO) i wzrostem wypływu elektrolitów (**Załącznik nr 4; pkt. II9**). Wszystkie te obserwacje skłoniły mnie do dokładniejszego zbadania poziomu RFT w przechowywanych nasionach buka zwyczajnego. Skupiłam się głównie na lokalizacji i rozprzestrzenianiu się RFT w osiach zarodkowych nasion buka, jako organach bezpośrednio związanych z kiełkowaniem nasion. Nasiona buka zwyczajnego były przechowywane przez okres 2, 5, 8, 11 i 13 lat w stałych warunkach wilgotności i temperatury (8-10 %  $H_2O$ , -10 °C) [1]. Wykazano, że traciły one żywotność proporcjonalnie do czasu przechowywania. Nasiona przechowywane przez 2 lata kiełkowały w 100%, natomiast przechowywane przez okres 5-8 lat kiełkowały w 82-84%. 13-letnie nasiona okazały się najbardziej uszkodzone i kiełkowały tylko w 14% [1]. W przechowywanych nasionach buka zwyczajnego obserwowano wzrost wypływu elektrolitów, proporcjonalny do czasu przechowywania nasion. W porównaniu z nasionami przechowywanymi przez 2 lata wzrost wypływu elektrolitów był 2-krotnie wyższy w nasionach 5 letnich i prawie 4-krotnie wyższy w nasionach przechowywanych przez 13 lat. Spadek żywotności nasion był silnie ujemnie skorelowany ze wzrostem wypływu elektrolitu oraz zwiększoną produkcją  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  oraz rodnika hydroksylowego ( $\cdot OH$ ) [1]. Otrzymane wyniki wskazują ponadto na wyraźną różnicę w produkcji RFT między osiami zarodkowymi a liścieniami nasion buka zwyczajnego podczas długoterminowego przechowywania. Poziom RFT jest istotnie wyższy w osiach zarodkowych niż w liścieniach, może to wskazywać, że osie zarodkowe są bardziej narażone na stres oksydacyjny, pomimo że, jak wskazują nasze wcześniejsze wyniki (**Załącznik nr 4; pkt. II13**), osie zarodkowe mają aktywniejszy system antyoksydacyjny niż liścienie. Sugeruje to, że osie zarodkowe są organem który szybciej

ulega procesowi starzenia, co może mieć istotny wpływ na spadek żywotności nasion podczas długoterminowego przechowywania. Stwierdzono również istotną korelację między poziomem  $H_2O_2$  oraz rodnika  $\cdot OH$  podczas inkubacji z 2-deoxy-D-Rib: po 1h ( $r=0,93$ ;  $p<0,01$ ), 3h ( $r=0,96$ ;  $p<0,01$ ) oraz 6h ( $r=0,97$ ;  $p<0,01$ ) [1]. Może to wskazywać, że  $\cdot OH$  powstaje głównie w wyniku reakcji Habera-Weissa. Rodnik ten atakuje wszystkie makromolekuły, powoduje uszkodzenia deoksyrybozy co prowadzi do fragmentacji DNA. Wyraźną fragmentację DNA wykryto również w badanych nasionach. Szczególnie widoczna była ona w osiach zarodkowych nasion przechowywanych przez okres 5 lat i dłużej [1].

Poszczególne części nasion różnią się wrażliwością na uszkodzenia. Obszary merystematyczne, szczególnie merystem wierzchołkowy korzenia zarodkowego jest najbardziej podatny na uszkodzenia. Po pierwsze dlatego, że obszar ten jest przepuszczalny dla wody podczas pęcznienia nasion, po drugie obszary merystematyczne potrzebują dużo energii i dlatego posiadają więcej mitochondriów niż inne tkanki. Lokalizacja *in situ* wykazała obecność  $O_2\cdot$  oraz  $H_2O_2$  w czapeczce korzenia zarodkowego [1]. W nasionach dłużej przechowywanych (8-11 lat) sygnał fluorescencji nasilał się w obrębie merystemu wierzchołkowego. Po 13 latach przechowywania sygnał fluorescencji był intensywny i w przypadku  $H_2O_2$  obejmował cały obszar kory pierwotnej oraz walca osiowego [1]. Wysoki poziom RFT w osiach zarodkowych w regionie merystemu może przyspieszać proces starzenia i hamować proces kiełkowania podczas długoterminowego przechowywania nasion. Lokalizacja RFT w centralnej części czapeczki oraz w region merystematycznym w osiach zarodkowych nasion buka przechowywanych przez okres 2-5 lat może wskazywać na ich funkcję sygnałną, szczególnie  $H_2O_2$  [1].

Istotną rolę w regulacji homeostazy w komórkach nasion, w usuwaniu RFT i przeciwdziałaniu potencjalnym molekularnym uszkodzeniom odgrywa niskocząsteczkowy i enzymatyczny system antyoksydacyjny. W omawianej pracy wykazano, że enzym katalaza (CAT) może odgrywać ważną rolę w ochronie komórek nasion przed indukowanymi podczas starzenia RFT. Wraz z czasem przechowywania obserwowano spadek aktywności tego enzymu zarówno w osiach zarodkowych jak i w liścieniach [1]. Spadek aktywności CAT był również istotnie skorelowany ze spadkiem żywotności nasion.

Wszystkie uzyskane wyniki sugerują, że zachowanie żywotności przez nasiona buka podczas ich długoterminowego przechowywania zależy od kilku czynników: wysokiej produkcji RFT, ograniczonej aktywności systemu antyoksydacyjnego oraz uszkodzenia błon

wywołanego przez nadmierną produkcję RFT. Sugerujemy, że produkcja oraz lokalizacja RFT w obrębie merystemu wierzchołkowego są kluczowym czynnikiem, które wpływają negatywnie na zdolność kiełkowania nasion po ich długoterminowym przechowaniu.

Nasiona buka zwyczajnego cechuje stan głębokiego spoczynku fizjologicznego, który ustępuje tylko w chłodzie i tylko w napęczniałych nasionach. Nasiona buka przetrzymuje się wówczas przez 10-12 tygodni w temperaturze  $+3^{\circ}\text{C}$  i przy 37-39% wilgotności względnej (RH). Natomiast przechowywanie tych nasion przy wilgotności 34% gwarantuje likwidację spoczynku, a równocześnie jest to wilgotność zbyt niska do wywołania kiełkowania. W celu sprawdzenia czy nasiona buka przed i po ustąpieniu spoczynku różnią się wrażliwością na przechowywanie, jedną partię nasion buka przechowywano przez 10 tygodni w  $+3^{\circ}\text{C}$  i 34% zawartości wody a następnie nasiona te podsuszono do 10% zawartości wody, w ten sposób pozyskano nasiona niespoczynkowe (ND). Drugą partię stanowiły nasiona spoczynkowe (D). Opierając się na wynikach naszych wcześniejszych badaniach, które pokazały, że przechowywanie nasion w wysokiej temperaturze i wilgotności względnej wywołuje w nasionach proces starzenia obie partie nasion (ND) oraz (D) przechowywano w różnych wariantach temperatury i wilgotności:  $4^{\circ}\text{C}/45\%\text{RH}$ ;  $4^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$ ;  $20^{\circ}\text{C}/45\%\text{RH}$ ;  $20^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$  [2]. Analizy poziomu RFT: anionorodnika nadtlenkowego oraz nadtlenku wodoru pokazały wyższy ich poziom w nasionach ND niż nasionach D przechowywanych w  $20^{\circ}\text{C}$  i w przy 45% oraz 75%RH. Wykazano negatywną korelację między zdolnością kiełkowania nasion a produkcją RFT w nasionach ND i D przechowywanych w różnych wariantach temperatury i wilgotności [2]. Wzrostowi poziomu RFT towarzyszył wzrost wpływu elektrolitów zarówno w osiach zarodkowych i liścieniach oraz zmiany w lipidowych komponentach błon komórkowych. Wyniki wskazują, że nasiona ND są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny niż D. Większe zmiany w fosfolipidach błon nasion ND mogą wskazywać na większą wrażliwość błon na działanie RFT. Konsekwencją oddziaływania RFT na błony cytoplazmatyczne jest peroksydacja lipidów i deestryfikacja fosfolipidów. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych wzrastała istotnie w osiach zarodkowych nasion ND w zarówno w temperaturze  $4^{\circ}$  jak i  $20^{\circ}\text{C}$  oraz przy wilgotności 45 i 75%RH, zaś w liścieniach wzrosła dopiero w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$  [2]. O zmianach w strukturze błon świadczy obniżenie zawartości szeregu ważnych fosfolipidów błon: fosfatydylocholiny (PC), fosfatydyloetanolaminy (PE) oraz dwóch kwasów tłuszczowych (18:2 i 18:3). Największe zmiany zachodziły w nasionach ND. Większą degradację fosfolipidów odnotowano w osiach zarodkowych niż w liścieniach, może to wynikać z różnicy w zawartości wody między tymi



organami. Wyższa zawartość wody jest w osiach zarodkowych [2]. Na większą wrażliwość nasion ND na przechowywanie nie miał wpływu układ antyoksydacyjny, nie odnotowano większych różnic między nasionami w poziomie niskocząsteczkowego antyoksydantu kwasu askorbinowego. W nasionach D wykazano obecność glutationu zarówno jego formy utlenionej (GSSG) jak i zredukowanej (GSH). Przy czym poziom GSSG był wyższy niż poziom GSH. Nasiona ND posiadały wyższy poziom GSSG niż nasiona D [2]. Uzyskane wyniki wskazują, że nasiona bezspoczynkowe są bardziej wrażliwe na warunki przechowywania, szybciej tracą żywotność niż nasiona spoczynkowe.

W kolejnej pracy [3] badaliśmy wpływ starzenia się nasion buka na metabolizm białek. Analizy zawartości białek zapasowych, rozpuszczalnych, aktywności enzymów proteolitycznych: endopeptydaz, karboksypeptydaz i aminopeptydaz, poziomu wolnych aminokwasów oraz aktywności syntezy białka, wykonano na nasionach zebranych w danym roku owocowania (nieprzechowywanych) i w nasionach po 9 latach przechowywania w optymalnych warunkach (8-9% zawartości wody i  $-10^{\circ}\text{C}$ ) w zamkniętych kontenerach. Nasiona pochodziły z tego samego drzewa. Badania wykonano na osiach zarodkowych i liścieniach nasion suchych, po ich napęcznieniu, następnie w 3-cim, 6- tym, 9-tym tygodniu stratyfikacji chłodnej w wilgotnym podłożu w temperaturze  $+3^{\circ}\text{C}$ , oraz w nasionach kiełkujących (o długości kiełka do 1cm). Nasiona nieprzechowywane charakteryzowały się 100% żywotnością, która w nasionach przechowywanych spadła do 75% [3]. Poziom całkowity białek oraz białek rozpuszczalnych był najwyższy w nasionach świeżych i obniżał się podczas przechowywania nasion. Proporcjonalne zmiany obserwowano w tych nasionach podczas tygodni stratyfikacji i w początkowej fazie kiełkowania. Istotne różnice zaobserwowano między nasionami nieprzechowywanymi i przechowywanymi w aktywności enzymów proteolitycznych takich jak endopeptydaz, aminopeptydaz oraz karboksypeptydaz, jak również w poziomie wolnych aminokwasów [3]. Synteza *de novo* białek po ustąpieniu spoczynku i w początkowej fazie kiełkowania była niższa w nasionach przechowywanych. Otrzymane wyniki potwierdzają istotne znaczenie aktywności metabolizmu białek dla utrzymania żywotności przez nasiona, bowiem konsekwencją obniżenia się aktywności metabolizmu w wyniku starzenia jest spadek żywotności nasion.

Zachowanie równowagi redoks w komórkach nasion ma duży wpływ na utrzymanie ich żywotności podczas podsuszania i długoterminowego przechowywania. Nasze wyniki wskazują, że białka peroksyredoksyny pełnią istotną rolę w regulacji środowiska redoks w nasionach drzew [4]. Peroksyredoksyny (Prxs) są to białka o charakterze tiolowo-

specyficznych antyoksydantów, które katalizują reakcje detoksyfikacji m.in. wodorotlenków alkilowych, nadtlenu azotu, a w szczególności nadtlenu wodoru. Dane literaturowe wskazują, że Prxs pełnią trzy istotne funkcje: (i) antyoksydacyjną, (ii) oraz uczestniczą w regulowaniu stanu redoks komórek roślin podczas rozwoju i adaptacji do warunków środowiska, (iii) w modulowaniu sygnałów szlaków komórkowych. Większość badań nad występowaniem i rolą peroksyredoksyn dotyczyła: *Pisum sativum* L. oraz *Brassica rapa* L. Jak dotąd niewiele jest badań nad aktywnością tych białek w nasionach drzew, a pierwsze badania dotyczyły topoli.

Prxs ze względu na ich właściwości strukturalne i biochemiczne dzielimy na 4 grupy wzajemnie spokrewnionych białek: 1-Cys peroksyredoksyn (1-CysPrx), 2-Cys peroksyredoksyn (2-CysPrx), peroksyredoksyny związane z białkiem YLR109 (typ II) oraz białka współmigrujące z bakterioferytyną (Prx Q). Brak dokładnych danych literaturowych o funkcji PrxIIF (jednej z Prxs typu II) w komórkach nasion drzew.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują na istotną rolę PrxIIF w regulowaniu równowagi redoks w komórkach nasion i w definiowaniu fizjologicznych różnic między nasionami drzew typu *orthodox* i *recalcitrant* i są pierwszymi wynikami na ten temat [4]. PrxIIF zlokalizowana jest w mitochondriach, co zostało potwierdzone w liściach *A. thaliana*, *P. sativum* i bulwach *Solanum tuberosum* L. PrxIIF katalizuje reakcję detoksyfikacji RFT w następującej kolejności:  $H_2O_2$  > wodorotlenek butylu (t-BOOH) > wodorotlenek miedzi (CuOOH). Prxs przechodzą zmiany konformacyjne w zależności od stanu redoks. PrxIIF jest aktywna jako monomer. Utleniona forma PrxIIF może być regenerowana przez tioredoksyny, glutaredoksyny i w mniejszym stopniu przez glutation.

Badania [4] wykonane na dwóch gatunkach klonów: klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) oraz klonu jaworu (*Acer pseudoplatanus* L.), rosnących w podobnych warunkach klimatycznych ale produkujących nasiona różniące się tolerancją na wysychanie. Nasiona obu klonów zaraz po ich zebraniu charakteryzowały się około 50% zawartością wody. Poduszono je do różnej zawartości wody (40, 20 i 7%) [4]. Występowanie mitochondrialnej PrxIIF stwierdzono w nasionach obu gatunków, jednak poziom białka PrxIIF okazał się wyższy w nasionach klonu zwyczajnego, odpornych na desykcję, niż w wrażliwych na podsuszanie nasionach klonu jaworu. Ponadto w nasionach klonu jaworu poziom tego białka obniżył się istotnie po podsuszeniu nasion do 7% zawartości wody tj. do wilgotności przy której nasiona te tracą żywotność. Wyższy poziom PrxIIF może powodować

większą odporność na warunki stresu odwodnienia. Półilościowa analiza RT-PCR wykazała, że poziom transkryptu PrxIIF obniżał się w trakcie podsuszania nasion obu gatunkach klonów, jednak najbardziej w nasionach klonu jaworu [4]. Za pomocą metody 2D-Western blot, oznaczono wartości punktu izoelektrycznego (pI) PrxIIF. Dla klonu zwyczajnego wykazano jedną wartość pI (około 5,7) a dla klonu jaworu dwie wartości pI 5,7 oraz 6,0 [4]. Wyniki te sugerują, że PrxIIF w nasionach klonu zwyczajnego ulega całkowitej fosforylacji, natomiast w nasionach klonu jaworu tylko częściowo podlega modyfikacji potranslacyjnej. Poznane sekwencje genowe i aminokwasowe PrxIIF porównano z sekwencjami PrxIIF innych roślin. Wysokie podobieństwo sekwencji obserwowano między sekwencjami PrxIIF *Populus trichocarpa* L. oraz *Arabidopsis thaliana* L. Podsumowując, obserwowane różnice między nasionami *A. platanoides* oraz *A. pseudoplatanus* w poziomie transkryptu PrxIIF oraz w poziomie białka PrxIIF, jak również na poziomie post-translacyjnych modyfikacji mogą wskazywać, że PrxIIF może być jednym z czynników w definiowaniu fizjologicznych różnic między nasionami *orthodox* oraz *recalcitrant*. Odgrywa ona kluczową rolę w utrzymaniu równowagi redoks w mitochondriach, co może być istotne dla utrzymania żywotności nasion podczas podsuszania.

### **Podsumowanie**

Przedstawione powyżej wyniki badań wnoszą wiele nowych informacji do fizjologii i biochemii nasion:

1. Proces starzenia się nasion jest wynikiem działania wielu czynników zarówno tych wewnętrznych (genetyczne, strukturalne, fizjologiczne) oraz zewnętrznych (głównie warunki przechowywania: temperatura i wilgotność) lecz najważniejszym czynnikiem, który przyspiesza proces starzenia jest nadmierna produkowane RFT:  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  oraz  $\cdot OH$ .
2. Nasiona drzew podczas długoterminowego przechowywania narażone są na procesy związane ze starzeniem. Wykazano, że produkcja  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  oraz  $\cdot OH$  wywołała uszkodzenia DNA, białek i lipidów i była skorelowana z obniżeniem kiełkowania nasion. Ponadto poziom poszczególnych RFT był wyższy w osiach zarodkowych niż w liścieniach. Nagromadzenie RFT w strefie merystemu wierzchołkowego korzenia osi zarodkowych może spowodować zablokowanie podziałów komórek i w konsekwencji spowodować zahamowanie kiełkowania nasion.

3. Obniżenie aktywności metabolizmu białek w wyniku procesu starzenia w przechowywanych nasionach istotnie obniża ich żywotność.
4. Zaobserwowane różnice w poziomie białka PrxIIF oraz w poziomie transkryptu PrxIIF w nasionach klonu zwyczajnego oraz klonu jaworu podczas podsuszania do niskiej zawartości wody, mogą potencjalnie wskazywać na udział tego białka w definiowaniu różnic między nasionami *orthodox* i *recalcitrant*, jak również w regulowaniu homeostazy redoks w mitochondriach, co może wpływać na wyższą żywotność nasion i spowalniać proces starzenia.
5. Nasiona bezspoczynkowe buka zwyczajnego tracą szybciej żywotność niż nasiona spoczynkowe podczas ich przechowywania. Wpływa na to wyższa produkcja RFT w tych nasionach i większe niekorzystne zmiany w błonach komórkowych.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### a) Dotychczasowe osiągnięcia naukowo - badawcze

W 1995 roku rozpoczęłam studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na kierunku biotechnologia. Moje szczególne zainteresowanie biochemią i fizjologią roślin, interesujące wykłady prof. dr hab. Barbary Tomaszewskiej oraz ćwiczenia laboratoryjne w Jej zakładzie przyczyniły się do mojego wyboru realizacji pracy magisterskiej pod Jej kierunkiem. Praca dotyczyła badania roli peptydów tiolowych występujących w korzeniach roślin motylkowych w ochronie przed stresem oksydacyjnym, wywołanym działaniem jonów ołowiu. Najważniejszym osiągnięciem było wyznaczenie współczynnika tolerancji (IT) na działanie jonów ołowiu dla roślin motylkowych fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) oraz grochu (*Pisum sativum* L.). Rośliną charakteryzującą się wyższą tolerancją na działanie jonów ołowiu okazał się groch. W korzeniach grochu wykazano wyższą aktywność systemu antyoksydacyjnego: wyższy poziom glutationu, homoglutationu, fitochelatyn, homofitochelatyn oraz aktywności katalazy i dysmutazy nadtlenkowej. Wyższej aktywności systemu antyoksydacyjnego towarzyszył niższy poziom reaktywnych form tlenu w porównaniu z wynikami jakie uzyskano w korzeniach fasoli. Realizując pracę magisterską otrzymałam propozycję pracy w Pracowni Biochemii Nasion Instytutu

Dendrologii PAN u prof. dr hab. Stanisławy Pukackiej. W 1998 roku rozpoczęłam pracę w Instytucie Dendrologii PAN na stanowisku młodszego technika. Pracę magisterską obroniłam w 1999 roku i w styczniu 2000 roku rozpoczęłam studia doktoranckie jako uczestniczka studium doktoranckiego UAM w Poznaniu realizując pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisławy Pukackiej w Instytucie Dendrologii PAN. Badania były częściowo finansowane w ramach projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (PO6H 061 19), kierowanego przez prof. Stanisławę Pukacką. Tytuł pracy doktorskiej brzmiał: „**Stres oksydacyjny jako czynnik wpływający na żywotność nasion buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) podczas ich podsuszania i przechowywania**”. Wykazałam, że stres oksydacyjny jest główną przyczyną utraty żywotności nasion buka przechowywanych w różnych warunkach wilgotności i temperatury oraz podsuszanych w podwyższonej temperaturze. Stres ten powoduje utratę integralności błon cytoplazmatycznych i w efekcie prowadzi do śmierci komórek. Nasiona buka są bardziej narażone na ten stres niż inne nasiona *orthodox*, ponieważ ich osie zarodkowe mają większe właściwości sorpcyjne i w danej relatywnej wilgotności poziom wody w nich jest zawsze znacząco wyższy niż w liścieniach. Jednym z ważnych osiągnięć pracy było wykazanie za pomocą techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), że w osiach zarodkowych nasion buka podczas podsuszania powstaje struktura szkła, zależna od stopnia uwodnienia. Im wyższa wilgotność tym struktura szkła tworzy się w niższej temperaturze. Na podstawie zależności Tg (temperatura przejścia w stan szklisty) wyznaczono bezpieczny zakres wilgotności i temperatury do przechowywania nasion, przy których struktura szkła jest najbardziej stabilna. Wynosi on od 9 do 15% zawartości wody i temperaturze -7 do 18°C. Warunki te można uznać za optymalne do przechowywania nasion. Wyniki uzyskane w ramach doktoratu zostały opublikowane w 4 artykułach, indeksowanych w JCR ukazały się w czasopismach: *Acta Physiologiae Plantarum* 2003, 25:163-169; *Biochemica et Biophysica Acta* 2003, 1621:48-56; *Acta Physiologiae Plantarum* 2005, 27:3-12; *Journal of Plant Physiology* 2005, 162:873-885.

Moje badania poza realizowanymi w ramach doktoratu i po uzyskaniu tytułu doktora dotyczyły określenia przyczyn utraty żywotności nasion różnych gatunków drzew podczas ich podsuszania i przechowywania, badania roli cyklu askorbinowo-glutationowego w tych procesach. Materiał badawczy stanowiły nasiona charakteryzujące się różną tolerancją na utratę wody czyli nasiona *orthodox* - klon zwyczajny (*Acer platanoides* L.), *recalcitrant* - klon jawor (*Acer pseudoplatanus* L.), klon srebrzysty (*Acer saccharinum* L.), dąb szypułkowy

(*Quercus robur* L.) oraz nasiona kategorii *intermediate* - buk zwyczajny (*Fagus sylvatica* L.). Wykazano, że nasiona typu *orthodox* czyli nasiona odporne na desykcję, osiągają tę odporność podczas dojrzewania w przeciwieństwie do nasion *recalcitrant*. Nasiona klonu zwyczajnego charakteryzowały się wyższą aktywnością cyklu askorbinowo-glutationowego niż nasiona klonu jaworu. Wykazano, że wysoka wartość stosunku formy zredukowanej do utlenionej glutationu i kwasu askorbinowego pary GSH/GSSG oraz ASA/DHA w komórkach nasion klonu zwyczajnego należących do kategorii *orthodox* może być jednym z głównych czynników ich odporności na desykcję. Wyniki opublikowano w artykułach, które zamieszczone są w czasopiśmie indeksowanym przez JCR (*Journal of Plant Physiology* 2006, 163:1259-1266; *Functional Plant Biology* 2007, 34:601-613).

Nasiona klonu srebrzystego to typowe nasiona *recalcitrant*, które nie mogą być podsuszane poniżej i tak wysokiej zawartości wody ponieważ tracą szybko żywotność. W celu sprawdzenia czy aktywność cyklu askorbinowo-glutationowego ma wpływ na żywotność nasion klonu srebrzystego podczas ich przechowywania, dwie partie nasion o różnej zawartości wody 50% oraz 55% przechowywano w temperaturze +3° przez 6 miesięcy. Stwierdzono, że żywotność nasion podczas przechowywania zależała od zawartości wody. Niższy poziom żywotności (30%) zaobserwowano w nasionach klonu srebrzystego, które posiadały 55% zawartości wody, podczas gdy 100% żywotności odnotowano w nasionach o niższej zawartości wody 50%. Aktywność cyklu askorbinowo-glutationowego była istotnie wyższa w osiach zarodkowych niż w liścieniach w obu analizowanych partiach nasion. Wykazano również niższy poziom glutationu (GSH i GSSG) w nasionach o niższej zawartości wody. Jednakże poziom kwasu askorbinowego (ASA i DHA) oraz aktywność enzymów cyklu askorbinowo-glutationowego (peroksydazy askorbinowej, reduktazy monodehydroaskorbinowej, reduktazy dehydroaskorbinowej oraz reduktazy glutationowej) była wyższa w nasionach o niższej zawartości wody (50%) szczególnie w osiach zarodkowych tych nasion niż w nasionach o 55% zawartości wody. Podsumowując, obserwowane zmiany w cyklu askorbinowo-glutationowego w przechowywanych nasionach klonu srebrzystego sugerują, że system ten pełni istotną rolę w utrzymaniu żywotności nasion podczas ich przechowywania (*Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2006, 1:23-27).

Ważnym osiągnięciem było wykazanie przyczyn utraty żywotności przez nasiona buka zwyczajnego podczas ich długoterminowego przechowywania. Stwierdzono, że utrata żywotności przez nasiona buka jest wynikiem zachodzącego w nich procesu starzenia, związanego z nagromadzeniem reaktywnych form tlenu: anionorodnika ponadtlennego i

nadtlenku wodoru oraz uszkodzeniem błon cytoplazmatycznych w wyniku peroksydacji lipidów błon i związanym z tym procesem nagromadzeniem lipidowych hydroksynadtlenków (LPHO). Cykl askorbinowo-glutationowy w nasionach buka zwyczajnego podczas ich rozwoju i podsuszania przebiega podobnie jak w nasionach *orthodox*. Jednakże aktywność sytemu antyoksydacyjnego w nasionach buka zwyczajnego była niższa niż w nasionach *orthodox*, odnotowano niską aktywność enzymów: peroksydazy glutationowej, reduktazy monodehydroaskorbinowej, reduktazy dehydroaskorbinowej oraz reduktazy glutationowej w warunkach stresu oksydacyjnego, wywołanego warunkami podsuszania. Obserwowano także niski poziom glutationu w nasionach buka zwyczajnego podczas ich podsuszania w porównaniu z nasionami *orthodox*. Z drugiej strony zaobserwowano korzystne zmiany, które mogą wpływać na utrzymanie żywotności przez nasiona buka zwyczajnego, aktywność enzymów cyklu askorbinowo-glutationowego była wyższa w osiach zarodkowych niż w liścieniach. Sugeruje to, że osie zarodkowe są bardziej chronione przed stresem oksydacyjnym niż liścienie i może to mieć to duże znaczenie w utrzymaniu żywotności przez nasiona buka podczas ich podsuszania jak również podczas długoterminowego przechowywania (*Seed Sciences Research* 2007, 17:45-53; *Plant Growth Regulation* 2010, 62:77-83).

Wiele związków może wpływać na ochronę nasion podczas ich podsuszania, takim związkami są m.in. cukry nieredukujące. Cukry takie jak sacharoza, oraz oligosacharydy rodziny rafinozy (RFO): rafinoza czy też stachioza pełnią ważną rolę w nasionach, są wykorzystywane jako materiał zapasowy, który kumulowany jest w nasionach podczas ich rozwoju i wykorzystywany już w pierwszych godzinach ich kiełkowania. Najważniejszą jednak rolę cukrów nieredukujących jest ochrona komórek nasion podczas utraty wody w wyniku podsuszania czy też długoterminowego przechowywania. Poziom cukrów: sacharozy, rafinozy oraz stachiozy został przeanalizowany w nasionach buka zwyczajnego podczas rozwoju, dojrzewania, podsuszania i przechowywania przez okres 1-12 lat. Ważnym osiągnięciem było wykazanie, że żywotność nasion buka zwyczajnego była istotnie dodatnio skorelowana z zawartością stachiozy oraz ujemnie istotnie skorelowana z zawartością sacharozy, aktywnością enzymu  $\alpha$ -galaktozydazy oraz wartościami stosunku sacharozy do sumy zawartości rafinozy i stachiozy. Otrzymane wyniki wskazują, że cukry nieredukujące pełnią istotną rolę w utrzymaniu żywotności przez nasiona buka zwyczajnego podczas ich długoterminowego przechowywania. Kompozycja cukrów nieredukujących wpływa na

nabywanie tolerancji na desykcję przez nasiona buka zwyczajnego (*Journal of Plant Physiology* 2009, 166:1381-1390).

Następnym istotnym osiągnięciem było wykazanie wpływu szybkości podsuszania osi zarodkowych nasion dębu szypułkowego na zachowanie ich żywotności. Materiał badawczy stanowiły nasiona o wyjściowej wilgotności na poziomie 56%. Zastosowano dwa warianty podsuszania : szybkie (w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze i wilgotności) oraz wolne (w eksykatorze nad żelem krzemionkowym wąskoporowatym). Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane przez Leśne Banki Genów. Wykazano, że szybkie podsuszanie osi zarodkowych nasion dębu szypułkowego jest znacznie korzystniejsze dla zachowania żywotności niż podsuszanie wolne. Może to wynikać z tego, że w osiach zarodkowych nasion dębu podsuszanych szybko aktywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego, szczególnie dwóch enzymów peroksydazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej, była znacząco wyższa niż w podsuszanych wolno. Ponadto stwierdzono, że główną przyczyną spadku żywotności nasion dębu szypułkowego podczas podsuszania powolnego jest wyższa produkcja reaktywnych form tlenu: anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, co powoduje większe uszkodzenie błon cytoplazmatycznych w wyniku peroksydacji lipidów błon (*Acta Physiologiae Plantarum* 2011, 33:2219-2227).

Kolejnym ważnym osiągnięciem badawczym było wykazanie pozytywnej roli selenu na poprawę żywotności nasion klonu srebrzystego podczas podsuszania. Są to pierwsze opublikowane wyniki na temat roli selenu w utrzymaniu żywotności nasion drzew. Rola selenu związana jest z jego wpływem na poprawę integralności błon komórkowych nasion głównie przez indukowanie aktywności enzymu peroksydazy glutationowej, czyli enzymu chroniącego błony komórkowe przed toksycznym działaniem lipidowych hydroksynadtlenków (*Journal of Plant Physiology* 2011, 168:220-225).

Moja praca naukowa i zainteresowania związane z problemem rozwoju, przechowywania i podsuszania nasion różnych gatunków drzew zaowocowały powstaniem projektu badawczego dotyczącego roli białek peroksyredoksyn oraz zmian w stanie redoks podczas podsuszania nasion z rodzaju *Acer*. W 2006 roku otrzymałam stypendium DAAD (Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej) na realizację tego projektu i wyjechałam na staż do Instytutu Biochemii i Fizjologii Roślin Uniwersytetu Bielefeld w Niemczech. Tam badania realizowałam pod kierunkiem prof. dr hab. Karla-Josefa Dietza. Najważniejsze osiągnięcia badawcze zostały przeze mnie szczegółowo omówione w **załączniku nr 2 pkt. 4c** ponieważ stanowią one część mojego osiągnięcia naukowego .



Wprowadzenie nowych metod badawczych jak również chęć odpowiedzi na pytania, które powstały podczas realizacji projektu były inspiracją do napisania przeze mnie projektu badawczego dotyczącego występowania i roli białek peroksyredoksyn w nasionach różnych gatunków drzew podczas ich dojrzewania i przechowywania. W 2009 roku otrzymałam finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i rozpoczęłam realizację badań. Najważniejsze wyniki badań uzyskane w ramach realizowanego projektu stały się podstawą osiągnięcia naukowego przedstawionego dla celów ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (**Załącznik nr 2; pkt. 4c**). Wyniki, które osiągnięto w ramach projektu uzupełniają naszą wiedzę na temat fizjologii i biochemii nasion. W nasionach charakteryzującymi się odmiennymi cechami fizjologicznymi wykazano występowanie następujących peroksyredoksyn: 1-CysPrx, PrxIIF, PrxIIC, PrxIIE oraz PrxQ. Może to sugerować, że są one ważnym białkowym elementem regulacji redoks w komórkach nasion drzew. O roli peroksyredoksyn w regulacji redoks w komórkach nasion podczas ich rozwoju i przechowywania może również świadczyć ich obecność, potwierdzona identyfikacją, poza linią diagonalną w rozdziałach 2D redoks SDS-PAGE. Tym bardziej, że w nasionach klonu zwyczajnego występowały w formie aktywnej 1-CysPrx i 2-CysPrx, natomiast w nasionach klonu jaworu tylko 2-CysPrx. Stwierdzono wysoki poziom mitochondrialnej PrxIIF w osiach zarodkowych nasion klonu zwyczajnego, klonu jaworu oraz buka zwyczajnego podczas rozwoju, jak również w osiach zarodkowych nasion buka zwyczajnego podczas przechowywania. Białka te wykazują również funkcje antyoksydacyjne dotyczące regulacji równowagi między szybkością tworzenia i usuwania  $H_2O_2$  w nasionach podczas ich przechowywania. Wykazano, że peroksyredoksyny występują głównie w czapeczce korzenia osi zarodkowych przechowywanych nasion buka zwyczajnego, w miejscu gdzie zostały zlokalizowane RFT:  $O_2^{\bullet-}$  oraz  $H_2O_2$  (**Załącznik 2; pkt. 4c**). Lokalizacja peroksyredoksyn w tym rejonie może wskazywać na ich udział w regulacji poziomu  $H_2O_2$  w nasionach przechowywanych przez krótki okres czasu od 2 do 5 lat. W nasionach buka zwyczajnego przechowywanych przez dłuższy czas sygnał fluorescencji był słabszy, wzrastał natomiast sygnał fluorescencji RFT:  $O_2^{\bullet-}$ , a w szczególności  $H_2O_2$ . Wyniki są opracowywane i przygotowywane do opublikowania, a częściowo były już prezentowane na konferencjach (**Załącznik nr 6, konferencje 13, 17, 25, 26, 28**).

W trakcie swojej pracy naukowej w Instytucie Dendrologii PAN uczestniczyłam w 7 projektach badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz przez Narodowe Centrum Nauki. Wyniki uzyskane w ramach realizowanych projektów

badawczych wnoszą wiele nowych informacji i mogą mieć zastosowanie praktyczne. Dwa projekty realizowane i zakończone w ostatnich latach zasługują na uwagę.

W latach 2010-2012 brałam udział w projekcie kierowanym przez dr Joannę Muchę. Badania w ramach tego projektu dotyczyły zmian zachodzących w roślinach w odpowiedzi na infekcję grzybów o różnym sposobie odżywiania (grzyba patogenicznego, saprotroficznego i mykoryzowego). Wykonano infekcję *in vitro* sadzonek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) przez 3 troficznie różne grzyby *Fusarium oxysporum* E. F. Sm. & Swingle (grzyb patogeniczny), *Trichoderma harzianum* Rifai (grzyb saprotroficzny) and *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quéf (grzyb mykoryzowy). Głównym celem tych badań było określenie, które z badanych czynników: apoplastowe, cytoplazmowe pH komórki, reaktywne formy tlenu, glutation czy też śmierć komórki odgrywają rolę w kolonizacji korzeni siewek drzew iglastych przez grzyb pasożytniczy, saprofityczny oraz mykoryzowy. Mój wkład w pracę obejmował analizę poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, zawartości glutationu jego, formy zredukowanej i utlenionej oraz określenie potencjału redoks dla pary 2GSH/GSSG. Ważnym wynikiem badań było wykazanie, dużego nagromadzenia RTF w komórkach gospodarza w odpowiedzi na obecność grzyba patogenicznego i saprotroficznego. Silna reakcja gospodarza na grzyba *T. harzianum* była powiązana z szybkim nagromadzeniem nadtlenu wodoru oraz wysoką śmiertelnością komórek korzeni. Wykazano, że nadtlenek wodoru może wpływać na kolonizację roślin przez patogena. Stwierdzono dodatnią korelację między poziomem nadtlenu wodoru a śmiercią komórek gospodarza podczas kolonizacji grzyba ektomikoryzowego (*Tree Physiology* 2013, 34:73-86).

Brałam udział w projekcie realizowany w latach 2010 do 2014 pt: „Zachowanie w postaci nasion zasobów genowych zagrożonego gatunku topoli czarnej (*Populus nigra* L.)”, kierowanym przez dr Jana Suszkę. Podstawowym celem badań było stworzenie podstaw długoterminowego, bezpiecznego przechowywania zasobów genowych w postaci nasion tego gatunku. Topola czarna uważana jest za zagrożony gatunek. Jednym z założeń projektu było zbadanie zmian, jakie zachodzą w błonach oraz w systemie antyoksydacyjnym i sprawdzenie czy uzyskane wyniki mogą być przydatne w ustaleniu przyczyn szybkiego starzenia się nasion topoli czarnej, co może ułatwić ustalenie warunków ich długoterminowego przechowywania. Ważnym osiągnięciem było wykazanie, że produkcja anionorodnika ponadtlenkowego oraz akumulacja nadtlenu wodoru miała wpływ na spadek żywotności nasion topoli czarnej, szczególnie w nasionach przechowywanych w temperaturze +3°C oraz -3°C. W nasionach przechowywanych w tych temperaturach zachodziły niekorzystne zmiany

w błonach komórkowych w wyniku zachodzącego procesu peroksydacji lipidów błon, a aktywność enzymów cyklu askorbinowo-glutationowego była na niskim poziomie. Natomiast przechowywanie nasion w temperaturze:  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  oraz  $-196^{\circ}\text{C}$  gwarantuje utrzymanie ich wyższej żywotności. W wymienionych temperaturach odnotowano niewielkie uszkodzenia w nasionach, które wywoływane są przez procesy starzenia się, zachodzące podczas przechowywania. Wyniki badań sugerują, że metoda kriokonserwacji jest najlepszą metodą gwarantującą najkorzystniejsze warunki dla przechowywania nasion topoli czarnej przez okres dłuższy niż 2 lata (*Functional Plant Biology* 2015, 42:630-642).

Podsumowanie najważniejszych osiągniętych wyników:

1. Wykazano obecność struktury szkła w osiach zarodkowych buka zwyczajnego podczas podsuszania i na podstawie wartości  $T_g$  (temperatury przejścia) wyznaczono bezpieczny zakres wilgotności i temperatury do przechowywania nasion buka.
2. Stwierdzono, że aktywność cyklu askorbinowo-glutationowego istotnie wpływa na utrzymanie żywotności przez nasiona klonu zwyczajnego i buka podczas ich podsuszania i przechowywania.
3. Cukry nieredukujące pełnią istotną rolę w utrzymaniu żywotności przez nasiona buka zwyczajnego podczas ich długoterminowego przechowywania, a kompozycja tych cukrów ma wpływ na nabywanie przez te nasiona tolerancji na desykację.
4. Szybkie podsuszanie nasion dębu szypułkowego jest znacznie korzystniejsze dla zachowania ich żywotności niż podsuszanie wolne. Enzymatyczny system antyoksydacyjny jest bardziej aktywny i zaangażowany w obronę komórek przed RFT w przypadku podsuszania szybkiego nasion.
5. Selen ma istotny wpływ na poprawę żywotności nasion klonu srebrzystego podczas podsuszania, po przez indukcję aktywności peroksydazy glutationowej chroniącej błony komórkowe osi zarodkowych przed szkodliwym działaniem lipidowych hydroksynadtlenków (LPHO).
6. Peroksyredoksyiny (1Cys-Prx, PrxIIF, PrxIIC, PrxIIE oraz Prx Q) są ważnymi białkowymi elementami regulacji stanu redoks w komórkach nasion drzew podczas ich rozwoju, podsuszania i przechowywania. Uczestniczą w definiowaniu różnic

fizjologicznych między nasionami drzew kategorii: *orthodox*, *recalcitrant* i *intermediate*.

7. Wykazano, że metoda kriokonserwacji jest najlepszą metodą gwarantującą przeżywalność nasion topoli czarnej przez okres dłuższy niż 2 lata.

Mój dotychczasowy dorobek publikacyjny obejmuje 21 pozycji (nie licząc doniesień konferencyjnych). Wszystkie prace to artykuły zamieszczone w indeksowanych w bazie JCR czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak: *Journal of Plant Physiology*, *Functional Plant Biology*, *Plant Growth Regulation*, *Journal of Plant Growth Regulation*, *Tree Physiology*, *Acta Physiologia Plantarum*, *Seed Sciences Research*, *Biochemica et Biophysica Acta*. W 2007 roku otrzymałam nagrodę Dyrektora Instytutu Dendrologii PAN za zajęcie 3 miejsca w konkursie „na najlepszą publikację”. Publikacje w których jestem autorem były cytowane wg bazy Web of Science w sumie 293/240 w związku z tym indeks Hirscha (HI) wynosi 10, sumaryczny impact factor zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 38,274.

Wyniki swoich badań prezentowałam samodzielnie albo jako współautor na 29 konferencjach międzynarodowych i krajowych (po doktoracie 20). Moja prezentacja ustna wyników dotyczących występowania peroksyredoksyn w nasionach drzew podczas ich rozwoju została nagrodzona I miejscem na konferencji „Interdyscyplinarne i aplikacyjne znaczenie nauk botanicznych” 56 Zjazdu Polskiego Towarzystwa Botanicznego”.

Moja praca dydaktyczna jest ograniczona w związku z pracą w instytucji o charakterze badawczym, jednak starałam się przekazywać swoją wiedzę na temat roślin zarówno dzieciom w wieku przedszkolnym jak i młodzieży licealnej. Przeprowadziłam lekcje na terenie Arboretum Kórnickiego dla dzieci z Przedszkola w Szczodrzykowie. Za zgodą Pani Dyrektora tego przedszkola zaprosiłam dzieci do zbioru nasion klonu srebrzystego. Wywołało to wielkie zainteresowanie wśród dzieci, które z ochotą podjęły się tego zadania, podczas którego wprowadziłam je w tajniki rozwoju nasion przedstawiając trudne procesy w zrozumiałym dla nich sposób. Opracowałam oraz przeprowadziłam wykłady dla młodzieży z Liceum Ogólnokształcącego w Kórniku nad którym Instytut Dendrologii PAN sprawuje opiekę naukową. Przeprowadziłam lekcje pokazowe w Pracowni Biochemii Nasion dla studentów II roku Biologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Zajęcia ze studentami prowadziłam również podczas studium doktoranckiego były to zajęcia z biochemii dla studentów II roku Biologii na Uniwersytecie A. Mickiewicza w Poznaniu, trwające dwa semestry w roku

akademickim 2000/2001. W tych samych latach prowadziłam lekcje z zakresu biologii na kursach przygotowawczych do matury organizowanych przez Fundację „Universitatis Posnaniensis” pod patronatem Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Brałam też aktywny udział w organizowanych I, II i III Kórnickich Dniach Nauki. Jest to bardzo ważne przedsięwzięcie, które łączy świat „naukowców kórnickich” ze społecznością Gminy Kórnik, która w ten sposób może poznać naszą pracę. Opracowałam i przeprowadziłam wykłady pt. „Czy rośliny się stresują?” oraz „Kwiaty i ich tajemnice” dla dzieci ze szkół podstawowych w Kórniku, w Bninie oraz w Szczodrzykowie. Do moich osiągnięć dydaktycznych należy również opieka merytoryczna i techniczna nad pracą magisterską Marka Malca, studenta Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pt: „Produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) oraz aktywność systemu antyoksydacyjnego w osiach zarodkowych nasion dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.), poddanych różnym warunkom podsuszania” wykonywaną w naszej pracowni pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisławy Pukackiej. Uczestniczyłam również jako opiekun merytoryczny i współwykonawca w pracy badawczej dr Ewy Gojło z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z Wydziału Biologii. Dr Ewa Gojło wykonywała swoje badania w ramach stażu doktorskiego a dotyczyły one analizy zmian w białkach LEA, antyoksydantach oraz w poziomie reaktywnych form tlenu w nasionach *Vicia hirsuta* podczas podsuszania.

Jestem członkiem dwóch komisji powołanych przez Dyrektora Instytut Dendrologii PAN. W 2012 roku zostałam powołana do komisji ds. oceny merytorycznej oświadczeń składanych w sprawie naliczania zwiększonych kosztów uzyskania przychodu pracownika z tytułu przeniesienia praw autorskich na pracodawcę. W komisji tej działałam do dnia dzisiejszego. Od 2013 roku jestem członkiem komisji ds. oceny wniosków na dotację na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących młodym naukowców. Projekty te finansowane są przez Instytut Dendrologii PAN – „Młody naukowiec”.

Jestem nie tylko naukowcem, ale również żoną i matką 2 córek (12 i 3 lata) i staram się wykonywać swoje obowiązki jak najlepiej.

Uważam, że moja działalność naukowa rozwija się, jest nastawiona na wprowadzania nowych metod badawczych i na realizację nowych projektów badawczych, które mogą mieć znaczenie praktyczne.

## **b) Dalsze plany badawcze**

Moje dalsze badania będą dotyczyły dokładniejszego przeanalizowania regulacji stanu redoks w nasionach różnych gatunków drzew podczas ich rozwoju i przechowywania, gdyż stan redoks komórek nasion w istotnym stopniu może wpływać na utrzymanie żywotności przez nasiona. Uzyskane wyniki wskazują, że peroksyredoksyny występują w nasionach różnych gatunków drzew podczas rozwoju, poduszania i przechowywania. Dlatego istotne jest określenie czy zidentyfikowane peroksyredoksyny występują w nasionach w formie zredukowanej czy też w formie utlenionej oraz czy aktywność peroksyredoksyn jest regulowana przez fosforylację. Wskazane jest także zbadanie występowania i roli tioredoksyn w nasionach drzew, które różnią się tolerancją na desykację. Tioredoksyny to ważne białka, NADPH-zależne, reduktazy disulfidowe. Wykazano, że białka te występują w nasionach *Arabidopsis thaliana*, pomidorach, ryżu, koniczynie, topoli. Stwierdzono, że tioredoksyny pełnią ważną rolę w fizjologii nasion, gdyż uczestniczą w regulacji aktywności białek, w regulacji redoks poprzez detoksyfikację wolnych rodników, w regulacji metabolizmu węgla oraz w regulacji procesu kiełkowania nasion. Interesująca wydaje się być próba powiązania występowania peroksyredoksyn i tioredoksyn w nasionach oraz ich współdziałanie w regulacji stanu redoks na poziomie białek.

#### **b) Dalsze plany badawcze**

Moje dalsze badania będą dotyczyły dokładniejszego przeanalizowania regulacji stanu redoks w nasionach różnych gatunków drzew podczas ich rozwoju i przechowywania, gdyż stan redoks komórek nasion w istotnym stopniu może wpływać na utrzymanie żywotności przez nasiona. Uzyskane wyniki wskazują, że peroksyredoksyny występują w nasionach różnych gatunków drzew podczas rozwoju, podsuszania i przechowywania. Dlatego istotne jest określenie czy zidentyfikowane peroksyredoksyny występują w nasionach w formie zredukowanej czy też w formie utlenionej oraz czy aktywność peroksyredoksyn jest regulowana przez fosforylację. Wskazane jest także zbadanie występowania i roli tioredoksyn w nasionach drzew, które różnią się tolerancją na desykację. Tioredoksyny to ważne białka, NADPH-zależne, reduktazy disulfidowe. Wykazano, że białka te występują w nasionach *Arabidopsis thaliana*, pomidorach, ryżu, koniczynie, topoli. Stwierdzono, że tioredoksyny pełnią ważną rolę w fizjologii nasion, gdyż uczestniczą w regulacji aktywności białek, w regulacji redoks poprzez detoksyfikację wolnych rodników, w regulacji metabolizmu węgla oraz w regulacji procesu kiełkowania nasion. Interesująca wydaje się być próba powiązania występowania peroksyredoksyn i tioredoksyn w nasionach oraz ich współdziałanie w regulacji stanu redoks na poziomie białek.

20.X.2015      E. Kotojnak

