

**dr inż. Ewa Pocięcha**  
**Katedra Fizjologii Roślin**  
**Wydział Rolniczo-Ekonomiczny**  
**Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie**

Załącznik 2  
**Autoreferat**  
**przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych,**  
**w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy**  
**w języku polskim**

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych,  
w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy  
w języku polskim**

**1. Imię i nazwisko** Ewa Pociecha (nazwisko panięskie Chilmonik)

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania**

**magister inżynier rolnictwa**, specjalizacja biologia stosowana, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Rolniczy, 1997

Tytuł pracy: Wpływ warunków wzrostu przed hartowaniem na kształtowanie mrozoodporności jarych i ozimych form rzepaku (*Brassica napus ssp. oleifera*)

Promotor: dr Marcin Rapacz

**doktor nauk rolniczych w zakresie agronomii**, specjalność naukowa: fizjologia roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, 2006

Tytuł rozprawy: Fizjologiczne podstawy odporności na mróz i pleśń śniegową (*Microdochium nivale*) androgenicznych form *Festulolium* sp.

Promotor: dr hab. Agnieszka Płażek

Recenzenci: prof. dr hab. Franciszek Dubert  
dr hab. Maria Prończuk

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

**1997 – 1999** starszy referent techniczny, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

**1999 – 2009** asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

**od 2009 – obecnie** adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

W latach 2005 – 2008 przebywałam dwukrotnie na urlopie macierzyńskim

**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:**

cykl publikacji powiązanych tematycznie pt.:

**Rola mechanizmów indukowanych chłodem w odporności żyta ozimego na stres abiotyczny i biotyczny**

**b) publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego:**

Autor/autorzy, data wydania, tytuł, wydawca lub czasopismo, tom, strony

**b. 1. Pocięcha E.,** Płazek A., Janowiak F., Dubert F., Kolasińska I., Irla M. 2013. Factors contributing to enhanced pink snow mould resistance of winter rye (*Secale cereale* L.) - pivotal role of crowns. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81: 54-63. **IF<sup>2013</sup> = 1.987/ IF<sup>5-letni</sup> = 2.043**; punkty MNiSW: 30

**b. 2. Żur I.,** Dubas E., **Pocięcha E.,** Dubert F., Kolasińska I., Płazek A. 2011. Cytological analysis of infection process and the first defence responses induced in winter rye (*Secale cereale* L.) seedlings inoculated with *Microdochium nivale*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 189-196. **IF = 1.377<sup>2011</sup>/ IF<sup>5-letni</sup> = 2.169**; punkty MNiSW: 30

**b. 3. Pocięcha E.,** Janowiak F., Dubas E., Żur I., Tokarz K., Kolasińska I., Płazek A. 2013. Progress of snow mould infection in crowns of winter rye (*Secale cereale* L.) is related to photosynthetic activity during cold acclimation. *Plant Physiology And Biochemistry* 70: 360-367. **IF = 2.352<sup>2013</sup>/ IF<sup>5-letni</sup> = 3.051**; punkty MNiSW: 35

**b. 4. Pocięcha E.,** Dziurka M. 2015. *Trichoderma* stimulates photosynthesis during cold acclimation but decreases soluble carbohydrates content and pink snow mould (*M. nivale*) resistance of winter rye. *Environmental and Experimental Botany* 109: 193-200. **IF = 3.712<sup>2015</sup>/ IF<sup>5-letni</sup> = 3.707**; punkty MNiSW: 40

**b. 5. Pocięcha E.,** Rapacz M., Dziurka M., Kolasińska I. 2016 Mechanisms involved in the regulation of photosynthetic efficiency and carbohydrate partitioning in response to low- and high-temperature flooding triggered in winter rye (*Secale cereale*) lines with distinct pink snow mold resistances. *Plant Physiology and Biochemistry* 104: 45-53. **IF = 2.928<sup>2015</sup>/ IF<sup>5-letni</sup> = 3.434**; punkty MNiSW: 35

Sumaryczny IF prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **12.356** (dla pracy z roku 2016 podano IF za rok 2015). Sumaryczny 5-letni IF prac wynosi **14.404**. Suma punktów według ujednoliconego wykazu czasopism punktowanych MNiSW z dnia 9 grudnia 2016 r. wynosi **170**. Prace i oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie stanowią **załączniki 5 oraz 6** wniosku.

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

#### **Alfabetyczny wykaz zastosowanych skrótów:**

- ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy
- ABA – kwas abscysynowy
- APX – peroksydaza askorbinianowa
- ARI – (average regrowth index) indeks odrastania po infekcji
- CAT – katalaza (EC 1.11.1.6)
- C<sub>i</sub> - wewnątrzkomórkowe stężenie CO<sub>2</sub>
- DPI – dni po inokulacji
- E - transpiracja
- EBR – 24-epibrasinolid
- ET<sub>0</sub> /CS, ET<sub>0</sub> /RC – ilość energii używanej do napędzania łańcucha transportu elektronów przez jedno aktywne centrum reakcji fotosystemu II lub w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia
- Fv/Fm – maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II
- DI<sub>0</sub> /CS, DI<sub>0</sub> /RC – rozproszenie energii z centrum reakcji fotosystemu II w postaci ciepła
- g<sub>s</sub> – przewodność szparkowa
- HPLC – (high performance liquid chromatography) wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HPS – haustorio-podobne struktury

HR – reakcja nadwrażliwości ang. hypersensitivity response  
JA – kwas jasmonowy  
NPQ – wygaszanie niefotochemiczne  
PAL – amioniakoliza fenyloalaniny (EC.4.3.1.5)  
PX – pula peroksydaz (peroksydazy klasy III), (EC.1.11.1.7)  
PR – białka produkowane podczas patogenez (ang. pathogenesis related proteins)  
q<sub>p</sub> – wygaszanie fotochemiczne  
ROS – (ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu  
RT<sub>50</sub> – (regrowth temperature) temperatura powodująca redukcję odrastania roślin po mrożeniu o 50%  
Rubisco – karboksylaza/oksygenaza Rubisco (EC.4.1.1.39)  
RuBP – rybulozo-bis-fosforan  
SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (EC.1.15.1.1)  
SS – syntaza sacharozy (E.C.2.4.1.13)  
SPS – syntaza fosforanu sacharozy (EC.2.4.1.14)  
SA – kwas salicylowy  
TR<sub>0</sub>/CS, TR<sub>0</sub>/RC – pułapkowanie energii świetlnej przez jedno aktywne centrum reakcji fotosystemu II lub w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia  
V<sub>cmax</sub> – maksymalna szybkość karboksylacji Rubisco  
Φ<sub>PSII</sub> – wydajność kwantowa PSII  
TBP-1 – gen kodujący białko wiążące sekwencję TATA (TATA-binding protein)  
UBI – gen kodujący ubikwitynę

## Wprowadzenie i cel badań

Rośliny narażone są zarówno na abiotyczne jak i biotyczne czynniki środowiskowe. Aby przetrwać wypracowały one specjalne mechanizmy adaptacji do aktualnie panujących warunków środowiska oraz mechanizmy odpowiedzi na czynniki stresowe. Zimotrwałość to cecha, która rozumiana jest nie tylko jako zdolność roślin do nabycia odporności na mróz, ale jako odporność na kompleks czynników występujących podczas zimy. Jednym z mechanizmów umożliwiających przetrwanie niekorzystnych warunków podczas zimy jest proces hartowania na mróz, który w warunkach naturalnych przebiega jesienią i wczesną zimą (Lindén 1999). W wyniku tego procesu zachodzącego głównie w temperaturach chłodowych rośnie stopień mrozoodporności roślin będący najistotniejszym elementem zimotrwałości. Czynnikiem zimotrwałości nabierającym nowego znaczenia ze względu na zmiany klimatyczne i globalne ocieplenie są nadmiar wody z topniejącego śniegu i/lub deszczu stwarzający warunki anoksji dla korzeni oraz występowanie chorób grzybowych. Wydaje się, że odporność na te czynniki może mieć podobne podłoże, gdyż ze względu na wysoką wilgotność, podczas lub po zalaniu, prawdopodobieństwo infekcji patogenem grzybowym jest wyższe, a występowanie pokrywy śnieżnej stwarza nie tylko ryzyko zakażenia, ale także ryzyko niedoboru tlenu. W Polsce głównym sprawcą pleśni śniegowej jest *Microdochium nivale* (Fr., Samuels & Hallet). Grzyb ten preferuje wilgotne warunki glebowe a jego sklerocja mogą przetrwać również w przypadku braku pokrywy śnieżnej (Hsiang i wsp. 1999). Grzyby pleśni śniegowej mają szeroki zakres gospodarzy i mogą rozwijać się w przedziale temperatur od poniżej zera do 28°C. Pomimo braku opadów śniegu mogą żyć saprofitycznie w glebie przez wiele lat i wywoływać różne kompleksy chorobowe.

Reakcja rośliny na stres wieloczynnikowy różni się od reakcji na poszczególne czynniki działające osobno. Odpowiedź na stres wieloczynnikowy jest kontrolowana przez

szereg mechanizmów molekularnych powiązanych w złożoną sieć regulacji. Na stres wieloczynnikowy rośliny narażone są podczas zimy, kiedy oddziałuje na nie zarówno niska temperatura jak i inne czynniki stresowe np. nadmiar wody czy patogen. Jedną z kluczowych strategii dla roślin z rodziny *Poaceae*, wspólnych dla wielu czynników stresowych jest akumulacja rezerw węglowodanowych w organach zapasowych tzw. węzłach krzewienia (Gaudet i wsp. 1999). Węglowodany są najważniejszym źródłem energii w walce z wieloma stresorami. Istnieje dodatnia zależność pomiędzy akumulacją węglowodanów a tolerancją na mróz, tolerancją nadmiaru wody w glebie i odpornością na pleśń śniegową (Gaudet i wsp. 1999, Antikainen i Pihakashi 1994, Li i wsp. 2012, Schlüter i wsp. 1996).

U żyta wysoki poziom rozpuszczalnych węglowodanów, wynikający ze zwiększonego wiązania dwutlenku węgla podczas aklimacji do chłodu skorelowany jest z większym wskaźnikiem przeżycia zimujących roślin (Hurry i Hunner 1991, Öquist i wsp. 1993). Gromadzenie węglowodanów w dużej mierze zależy od natężenia fotosyntezy podczas aklimacji do chłodu. Jednakże, synteza węglowodanów zapasowych odbywa się tylko wówczas gdy ilość wytworzonych fotoasymilatów przekracza bieżące potrzeby rośliny (Pollock i Cairns 1991). Dlatego rośliny, które potrafią zwiększyć aktywność fotosyntezy podczas aklimacji do chłodu gromadzą większe ilości rezerw węglowodanów (Hüner i wsp. 1993). Dodatni wpływ na gromadzenie węglowodanów ma także efektywny transport produktów fotosyntezy do tkanek akceptorowych. Zapewnia to nie tylko zwiększony poziom rezerw, ale dodatkowo stymuluje fotosyntezę, gdyż nadmiar heksoz w liściach hamuje transkrypcję licznych genów kodujących białka biorące udział w fotosyntezie (Jang i wsp., 1997, Smeekens i Rook 1997).

Ze względu na udział reaktywnych form tlenu (RFT), zarówno w odpowiedzi na stres abiotyczny jak i biotyczny, utrzymanie homeostazy RFT może wpływać na poziom odporności na szerokie spektrum czynników stresowych. Nadmiar tlenu w warunkach światła i niskiej temperatury powoduje brak równowagi pomiędzy ilością energii zaabsorbowanej w fazie jasnej fotosyntezy a jej wykorzystaniem podczas fazy ciemnej. Zmiany takie wpływają istotnie na względny stan redoks fotosystemu II (PSII), co w konsekwencji prowadzi do generowania RFT. Zdolność rośliny do obrony przed uszkodzeniami powodowanymi przez RFT może być ważną strategią obronną, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z kombinacją czynników stresowych. Chłód, nadmiar wody w glebie wywołujący hipoksję oraz patogeny wywołują ogólnoustrojową reakcję obronną polegającą między innymi na aktywacji enzymów antyoksydacyjnych w celu zneutralizowania RFT. Odpowiedź na stres znajduje swe odzwierciedlenie w akumulacji antyoksydantów nieenzymatycznych oraz aktywności enzymatycznej białek odpowiedzialnych za równowagę redoks, takich jak katalaza (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydazy (PX).

Ważną i do tej pory nie w pełni wyjaśnioną rolę w reakcji obronnej roślin przed patogenami odgrywa kwas abscysynowy (ABA). Według (Ton i wsp. 2009) w pierwszej pre-inwazyjnej fazie obrony ABA pośredniczy w zamykaniu szparek zapobiegając przenikaniu przez nie patogenów atakujących przez otwory naturalne. W drugiej, wczesnej fazie poinwazyjnej - ABA wpływa na odkładanie kalozy natomiast podczas trzeciej fazy - późnej obrony - działanie ABA jest głównie negatywne i związane z antagonistyczną reakcją z hormonami takimi jak kwas salicylowy (SA) i kwas jasmonowy (JA).

Nadrzędnym celem badań prezentowanych jako **osiągnięcie naukowe** było określenie związku pomiędzy mechanizmami uruchamianymi podczas aklimacji do chłodu a odpornością na pleśń śniegową oraz tolerancją zalewania korzeni w chłodzie. W szczególności koncentrowano się na reakcji aparatu fotosyntetycznego oraz dystrybucji węglowodanów a także ich powiązaniem z innymi szlakami metabolicznymi uruchamianymi w reakcji na badane stresy środowiskowe.

Jako obiekt do badań wybrano żyto ozime. W porównaniu do innych zbóż, jest gatunkiem najbardziej zimotrwałym. Posiada zdolność do kiełkowania i wzrostu w niskich temperaturach, ma małe wymagania glebowe i wodne oraz jest odporne na mróz. Gatunek ten jest jednak niedostatecznie odporny na pleśń śniegową i niezbyt dobrze toleruje nadmiar wody w glebie. Badania przeprowadzono na odmianie żyta ozimego Stach oraz 9 liniach wsobnych różniących się odpornością na *Microdochium nivale*, uzyskanych z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Cele szczegółowe:

1. Określenie dynamiki zmian enzymów antyoksydacyjnych w liściach i węzłach krzewienia, potencjalnie związanych z większą odpornością na mróz i *M. nivale* (praca **b.1**).
2. Określenie związku pomiędzy cechami budowy anatomicznej rośliny, determinowanymi przez aklimację do chłodu, a przebiegiem infekcji wywołanej przez *M. nivale* (praca **b.2**).
3. Weryfikacja hipotezy o istnieniu związku pomiędzy efektywnością fotosyntezy oraz dystrybucją fotoasymilatów podczas aklimacji do chłodu a reakcjami obronnymi uruchamianymi w przebiegu patogenezы wywołanej przez *M. nivale* (praca **b.3**).
4. Weryfikacja hipotezy, o potencjalnym korzystnym wpływie *Trichoderma viridae* i *Trichoderma harzianum* na przebieg aklimacji do chłodu oraz na odporność żyta ozimego na *M. nivale* (praca **b.4**).
5. Weryfikacja hipotezy o różnicach w strategii dystrybucji węglowodanów podczas stresu zalewania u linii żyta różniących się odpornością na *M. nivale* (praca **b.5**).

Badania przedstawione w pracach **b.1** (częściowo) oraz **b.2** i **b.3** (w całości) były finansowane z projektu (**II.I.1.**) „Fizjologiczne i biochemiczne wskaźniki odporności linii żyta ozimego na różową pleśń śniegową (*Microdochium nivale*)”, w ramach akcji COST FA0604 ‘Triticeae genomics for the advancement of essential European crops’ (TritiGen).

Wyniki przedstawione w pracach **b.1**, **b.2** i **b.3** dotyczą związku pomiędzy przebiegiem hartowania na mróz a odpornością na pleśń śniegową. Przeprowadzony test mrozoodporności wykazał, że badane linie nie wykazywały dużego zróżnicowania pod względem mrozoodporności, natomiast wyraźnie różniły się poziomem odporności na pleśń śniegową (**b.1**). Zatem obserwowane różnice w przebiegu aklimacji do chłodu decydowały przede wszystkim o odporności na *M. nivale*.

Jednym z celów było ustalenie związku pomiędzy cechami budowy anatomicznej rośliny, determinowanymi przez trzytygodniowy okres aklimacji do chłodu, a przebiegiem

infekcji wywołanej przez *M. nivale*. Obserwacje wzrostu grzyba *M. nivale* w tkance węzłów żyta z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej wykazały, że droga wnikania patogena wygląda podobnie u wszystkich badanych linii, natomiast istotne różnice dotyczyły dynamiki wzrostu grzyba (**b.2**). Strzępki grzybni wnikały przede wszystkim w obszarze tkanek łączących pęd z korzeniem tzw. węzłach krzewienia. W komórkach kory pierwotnej węzłów grzybni rosła intensywnie, strzępki wydłużały się, rozgałęziały i stopniowo przenikały do wiązek naczyniowych metaksylemu. Penetracja do naczyń metaksylemu umożliwiała szybkie rozprzestrzenianie się grzyba wewnątrz rośliny gospodarza, prowadziła do zablokowania transportu wody, a w konsekwencji do wędnięcia i śmierci rośliny. Warunkiem odrastania był więc brak uszkodzeń zawiązków liści a zwłaszcza wiązki przewodzącej.

Podczas analizy mikroskopowej uwidoczniono również pęcherzykowate struktury penetrujące tkankę naczyniową, przypominające haustoria (HPS). Haustoria są wyspecjalizowanymi strukturami odżywiającymi grzyba, rozwijającymi się tylko podczas interakcji rośliny zwłaszcza z patogenem biotroficznym (Rumbolz i wsp., 2000). Stwierdzona po raz pierwszy w pracy **b.2** obecność HPS może sugerować, że *M. nivale* znany dotychczas jako grzyb nekrotroficzny może na *Secale cereale* w pewnych okolicznościach zachowywać się jak hemibiotrof (Mendgen i Hahn 2002) podobnie jak zaobserwowano to wcześniej u rdzy *Uromyces fabae* na *Vicia fabae* lub mączniaka *Blumeria graminis* na *Hordeum vulgare* (Perfect i Green 2001).

Procesowi infekcji wywołanej przez *M. nivale* towarzyszyło nagromadzenie związków fenolowych, które były widoczne, zwykle w okolicy wnikających strzępek grzybni (**b.2**). Linie bardziej tolerancyjne na *M. nivale* charakteryzowały się obecnością większej ilości fenoli w liściach roślin zarówno inokulowanych jak i nieinokulowanych w porównaniu do linii wrażliwych. Zatem akumulację związków fenolowych jako rodzaj niespecyficznego reakcji obronnej indukowała zarówno niska temperatura (czynnik abiotyczny) jak i patogen (czynnik biotyczny). Analiza aktywności  $\beta$ -D-glukozydazy (EC 3.2.1.21) enzymu uwalniającego związane glikozydowo wiązki fenolowe (Lewis i Yamamoto 1990, Seo i wsp. 1995) wykazała, że u linii tolerancyjnych wzrost aktywności  $\beta$ -D-glukozydazy w węzłach następował z jednoczesnym spadkiem aktywności enzymu w liściach (**b.1**). Dokładnie odwrotną sytuację obserwowano u linii wrażliwych, gdzie spadek aktywności w węzłach następował z jednoczesnym wzrostem aktywności w liściach. Wskazywałoby to na odmienną strategię wykorzystywania związków fenolowych w reakcjach obronnych, gdyż roślinne  $\beta$ -D-glukozydazy kontrolują biosyntezę ligniny jako element strategii obrony przeciwko patogenom grzybowym. U linii tolerancyjnych w miarę postępu infekcji wzrost aktywności  $\beta$ -D-glukozydazy następował w strategicznie ważnych organach, czyli węzłach krzewienia, podczas gdy u linii wrażliwych w liściach.

U linii wsobnych o wyższej odporności na patogen w odpowiedzi na inokulację *M. nivale* obserwowano warstwę kalozy ( $\beta$ -1,3-glukan) w przestrzeni pomiędzy ścianą komórkową i błoną komórkową (Schulze-Lefert 2004) (**b.2, b.3**). Polisacharyd ten występuje konstytutywnie w roślinie w małych ilościach, we wtórnej ścianie komórkowej i plazmodesmach (Trillas i wsp., 2000, Dong i wsp., 2008). Jego synteza indukowana jest w odpowiedzi na zranienie, metale ciężkie, i patogeny. Prezentowane wyniki badań wskazują na udział kalozy w reakcji obronnych żyta na pleśń śniegową, gdyż linie, u których wykryto

akumulację kalozy charakteryzowały się większą zdolnością odrastania po inokulacji *M. nivale* w porównaniu do tych, u których warstwy kalozy nie stwierdzono.

Biorąc pod uwagę różnice w przebiegu patogenez, podczas hartowania na mróz analizowano szereg parametrów fizjologicznych i biochemicznych potencjalnie związanych z odpornością na *M. nivale*. Zakładano, że istnieje zależność pomiędzy fotosyntezą i metabolizmem węglowodanów, które są źródłem energii i metabolitów niezbędnych do reakcji obronnych a odpornością na pleśń. Analiza przebiegu fotosyntezy metodą pomiaru wymiany gazowej oraz metodą pomiarów fluorescencji chlorofilu wykazała, że linia tolerancyjna charakteryzowała się wyższym poziomem asymilacji CO<sub>2</sub> w niskiej temperaturze, wyższą intensywnością fotosyntezy netto, oraz wyższą sprawnością transportu elektronów w fotosystemie II (ET<sub>o</sub>/CS, ET<sub>o</sub>/RC) (**b.1**). Z kolei u linii wrażliwej pomimo większego otwarcia aparatów szparkowych, o czym świadczyły wyższe wartości intensywności transpiracji (E), przewodności szparkowej (g<sub>s</sub>) oraz wewnątrzkomórkowego stężenia CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) obserwowano niższą intensywność fotosyntezy netto. Zatem u linii wrażliwej to nie asymilacja CO<sub>2</sub> a ograniczenia w przebiegu fazy ciemnej i procesie syntezy sacharozy były przyczyną niższego poziomu akumulacji węglowodanów. Z kolei utrzymanie fotosyntezy na wyższym poziomie w chłodzie u linii tolerancyjnej można przypisać specyficznej odpowiedzi aklimacyjnej, która umożliwiła wydajną syntezę asymilatów pomimo większego przymknięcia szparek w porównaniu do linii wrażliwej. Wzrost zdolności do fotosyntezy w chłodzie jest skutkiem zwiększenia zdolności do karboksylacji i/lub regeneracji RuBP (Huner i wsp. 1986, Sage 1994). Ponieważ maksymalna szybkość karboksylacji RuBisCo (V<sub>cmax</sub>) nie różniła się u obu linii, założono, że wyższy poziom fotosyntezy netto u linii tolerancyjnej jest wynikiem mechanizmu zabezpieczającego, który zapobiegał gromadzeniu się fosforanów trioz w chloroplastach poprzez zwiększoną syntezę fosforanu sacharozy i sacharozy. Ten mechanizm obronny umożliwił linii tolerancyjnej nie tylko funkcjonowanie w warunkach niskiej temperatury ale także syntezę nadwyżek rozpuszczalnych węglowodanów i ich eksport do węzłów krzewienia. Węglowodany zapasowe stanowiły następnie u linii tolerancyjnej źródło energii do walki z patogenem. Świadczy o tym wysoki popyt na węglowodany w reakcjach obronnych podczas infekcji wyrażony gwałtowniejszym niż u linii wrażliwej spadkiem poziomu cukrów po 5 dniach po inokulacji (DPI) (**b.1**).

Stwierdzony w liściach linii tolerancyjnej wyższy poziom ABA po 1 DPI był najprawdopodobniej odpowiedzialny za zamykanie szparek w fazie pre-inwazyjnej i ograniczenie wnikania patogena tą naturalną drogą (**b.1**). W tym samym czasie poziom ABA w liściach linii wrażliwej był niższy a parametry wymiany gazowej świadczyły o większym otwarciu szparek. Z kolei wzrost poziomu ABA po 5 DPI w liściach i węzłach krzewienia linii tolerancyjnej korespondował z obecnością warstwy kalozy co opóźniło przenikanie strzępek grzybni do sąsiednich komórek i do naczyń (u linii tolerancyjnej pierwsze strzępki grzybni zostały wykryte nie wcześniej niż w 13 DPI). Potwierdza to obecność licznych strzępek w zawiązkach liści po 5 DPI u linii wrażliwej, u której brak wzmocnienia naturalnej bariery - ściany komórkowej - przed krytycznym okresem 5 DPI umożliwił wzrost strzępek grzybni i penetrację wiązek naczyniowych metaksylemu. U linii wrażliwej wzrost zawartości ABA w liściach zanotowano dopiero po 9 DPI kiedy jest już prawdopodobnie zbyt późno, aby zapobiec wnikaniu strzępek grzybni przez przamykanie aparatów szparkowych.



Dane zebrane w pracach **b.2** i **b.3** wskazywały na kluczową rolę węzłów krzewienia w reakcji obronnej na badany patogen. Potwierdzono to także w pracy **b.1**, gdzie porównano zmiany wybranych parametrów w liściach i węzłach krzewienia żyta ozimego. W pracy **b.1** skoncentrowano się na monitorowaniu najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych, aby ustalić jaka strategia jest typowa dla badanych linii żyta i czy ma ona związek z odpornością na *M. nivale*. Dla reakcji rośliny na infekcję patogenu nekrotroficznego charakterystyczne jest szybkie wytwarzanie ROS związane z występowaniem reakcji nadwrażliwości, tzw. hypersensitivity response (HR) i zamieraniem tkanek. W przypadku patogenów biotroficznych w odpowiedzi na wytwarzanie ROS uruchamiana jest reakcja obronna w postaci aktywacji systemu antyoksydacyjnego. W pracy **b.1** podjęto próbę ustalenia, czy i gdzie (w liściach czy węzłach) nastąpi aktywacja systemu antyoksydacyjnego a w szczególności wzrost aktywności enzymów: (SOD EC.1.15.1.1), puli peroksydazy (peroksydazy klasy III EC.1.11.1.7) oraz katalazy (CAT EC.1.11.1.6).

W pierwszym dniu po inokulacji stwierdzono w węzłach krzewienia ujemną korelację pomiędzy parametrem **average regrowth index** (ARI) charakteryzującym zdolność odrastania po inokulacji *M. nivale* a aktywnością SOD ( $r=-0,88$ ), CAT ( $r=-0,73$ ) oraz PX ( $r=-0,72$ ) (**b.1**). Wyniki te wskazują więc, że po jednej dobie od inokulacji linie tolerancyjne charakteryzowały się wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w węzłach krzewienia w porównaniu z liniami wrażliwymi. Korelacji tej nie wykazano w węzłach roślin kontrolnych, a więc obserwowane zmiany aktywności antyoksydacyjnej były wywołane obecnością patogena, a nie działaniem niskiej temperatury. W tym samym terminie w liściach obserwowano korelację pomiędzy aktywnością SOD a wskaźnikiem  $RT_{50}$  odzwierciedlającym mrozoodporność, zarówno u roślin inokulowanych ( $r=-0,88$ ) jak i kontrolnych ( $r=-0,81$ ). Oznacza to, że w liściach aktywacja SOD nastąpiła również pod wpływem chłodu i była pozytywnie związana ze wzrostem mrozoodporności, gdyż najwyższą aktywność SOD obserwowano u linii najbardziej mrozoodpornych.

**Podsumowując wyniki powyższych doświadczeń można stwierdzić, że wzrost zawartości ABA w liściach przyczyniał się do zmniejszenia stopnia rozwarcia szparek. Pomimo ograniczenia rozwarcia szparek u linii tolerancyjnej nastąpił wzrost intensywności fotosyntezy netto na skutek wysokiej sprawności fotosyntetycznego transportu elektronów oraz sprawnego odprowadzania trioz do tkanek akceptorów. Nadwyżki węglowodanów odprowadzane do węzłów krzewienia mogły być wykorzystywane do reakcji obronnych podczas patogenez. Wzrost zawartości ABA w węzłach krzewienia podczas patogenez stymulował syntezę kalozy, tworzącej naturalną barierę ochronną zabezpieczającą przed rozprzestrzenianiem się strzępek grzybni. U linii tolerancyjnych obserwowano aktywację systemu antyoksydacyjnego w węzłach krzewienia pod wpływem patogena, a w liściach pod wpływem zarówno niskiej temperatury jak i patogena. Reakcja taka może wskazywać na hemibiotroficzne zachowanie *M. nivale*, jednakże zagadnienie to wymaga dalszych badań.**

Niektóre saprofityczne grzyby z rodzaju *Trichoderma* korzystnie wpływają na odporność na różne patogeny wywołujące pleśń śniegową, zaś mechanizm ten polega głównie na bezpośredniej interakcji *Trichoderma* z patogenem (McBeath 2002). Brak jest natomiast informacji na temat oddziaływania grzyba saprofitycznego na metabolizm rośliny, a zwłaszcza na przebieg procesu hartowania na mróz. Aby to ustalić wykonano doświadczenie,

w którym aplikowano *Trichoderma* na rośliny przed hartowaniem oraz po hartowaniu. W obu przypadkach po trzech tygodniach hartowania wykonywano inokulację *M. nivale*.

Po zastosowaniu *T. viridae* lub *T. harcianum* przed aklimacją do chłodu u żyta odmiany Stach obserwowano stymulację fazy jasnej i ciemnej fotosyntezy oraz zmniejszenie puli cukrów rozpuszczalnych w liściach i węzłach krzewienia przy jednoczesnym wzroście poziomu węglowodanów w korzeniach (b.4). Największe zmiany dotyczyły poziomu sacharozy i fruktooligosacharydu nystozy. Pomimo stymulacji fotosyntezy synteza fosforanu sacharozy pozostawała na poziomie kontroli, a rośliny gromadziły znacznie mniej cukrów w węzłach krzewienia co, niekorzystnie wpływało na odporność na *M. nivale*. Wzrost intensywności fotosyntezy wynikał najprawdopodobniej z niskiej zawartości węglowodanów w liściach, których nadmiar hamuje aktywność enzymów cyklu Calvina m. in. Rubisco (Jang i wsp., 1997, Smeekens i Rook 1997). Uzyskane wyniki wskazują, że choć w wyniku zwiększonej aktywności fotosyntezy pozyskiwane były większe ilości cukrów to nie były one gromadzone w węzłach, ale eksportowane do korzeni. Aktywność akceptorowa korzeni skolonizowanych przez *Trichoderma* wpływała więc na rozdysponowanie węglowodanów. Proces aklimacji do chłodu został zakłócony, ponieważ rezerwy węglowodanów zamiast być akumulowane w węzłach, były eksportowane do korzeni i konsumowane przez *Trichoderma* co miało konsekwencje dla przebiegu patogenez. Wyniki wskazują, że szczególne znaczenie w omawianym procesie ma sacharoza. Sacharoza jest cukrem transportowym oraz substratem do syntezy fruktanów, których zawartość (w szczególności form wysokopolimeryzowanych) zwiększa się w czasie hartowania na mróz (Winter i Huber, 2000; Livingston i wsp., 2006). W pracy b.4 najniższe stężenie sacharozy stwierdzono po 3 tygodniach patogenez w węzłach roślin o najniższym wskaźniku odporności.

Koinokulacja grzybami *Trichoderma* i *M. nivale* roślin aklimowanych przez trzy tygodnie, w chłodzie drastycznie obniżała poziom glukozy i fruktozy ale już nie sacharozy (b.4). Dodatkowo *T. viridae* powodował dziesięciokrotny wzrost zawartości nystozy w węzłach po trzech tygodniach patogenez co skutkowało istotnie niższym stopniem porażenia przez *M. nivale*. Ten pozytywny efekt podwyższonej odporności na pleśń śniegową po koinokulacji grzybem saprofitycznym i chorobotwórczym mógł być wywołany nie tylko zmianami w metabolizmie węglowodanów, ale również mechanizmem bezpośredniej interakcji z patogenem. *Trichoderma* może bowiem wykazywać agresję skierowaną przeciwko innym fitopatogenom dzięki mechanizmom takim jak mykoparazytyzm polegający na fizycznym kontakcie z patogenem i syntezie enzymów hydrolitycznych, konkurencji o składniki odżywcze oraz syntezie antybiotyków (antybioza) (Wojtkowiak-Gębarowska, 2006).

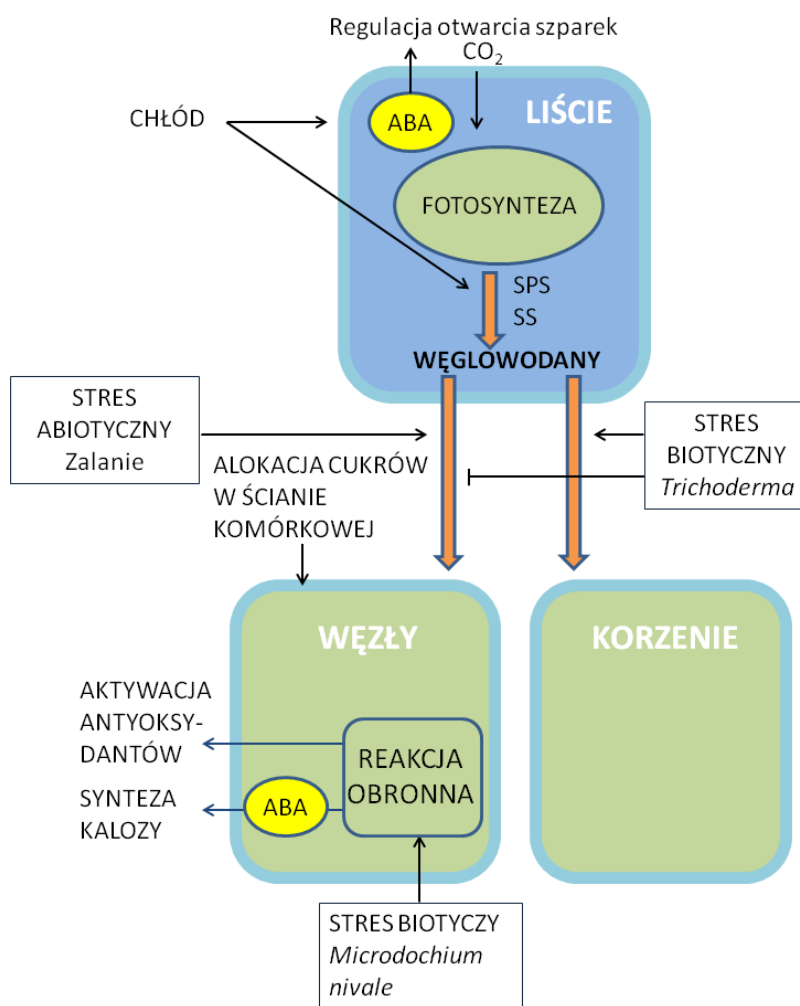
**Podsumowując *Trichoderma* pomimo stymulacji fotosyntezy, negatywnie wpływa na proces aklimacji w chłodzie zwiększając eksport węglowodanów do korzeni na potrzeby saprofita zamiast do organów zapasowych. Na skutek tych zmian w dystrybucji fotoasymilatów rośliny dysponowały również mniejszymi rezerwami do walki z patogenem i ulegały większemu porażeniu. W przypadku aplikacji na rośliny zaaklimowane w chłodzie korzystne zmiany wywoływał jedynie *T. viridae*, który prawdopodobnie wchodził w bezpośrednią reakcję z patogenem oraz stymulował syntezę fruktoligosacharydu nystozy.**

Mając na uwadze fakt, że w trakcie lub po zalaniu korzeni wysoka wilgotność gleby zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia pleśni śniegowej oraz, że długotrwałe zaleganie pokrywy śnieżnej stwarza nie tylko ryzyko infekcji, ale również niedoboru tlenu, przeprowadzono kolejne doświadczenie dotyczące związku pomiędzy tolerancją zalania korzeni w niskiej temperaturze a odpornością na pleśń śniegową. Okresowe zalewanie korzeni spowodowane przez topniejący śnieg i/lub deszcz odgrywa i odgrywać będzie coraz większe znaczenie ze względu na postępujące zmiany klimatyczne związane z globalnym ociepleniem (Rapacz i wsp. 2014).

Wyniki uzyskane w pracy (b.5) wskazują na wyraźne różnice w przebiegu procesu fotosyntezy oraz gospodarce węglowodanami u linii tolerancyjnych i wrażliwych na pleśń śniegową. Większej odporności na pleśń towarzyszyła mniejsza wydajność kwantowa PSII (Fv/Fm) z jednoczesnym wzrostem rozpraszania energii w PSII (DI<sub>o</sub>/CS). Po 10 dniach zalania korzeni w chłodzie poziom węglowodanów rozpuszczalnych w liściach i w węzłach krzewienia wzrósł u linii tolerancyjnych a spadł u wrażliwych. Wzrostowi zawartości węglowodanów u linii tolerancyjnej towarzyszył wzrost wartości parametrów pułapkowania energii (TR<sub>o</sub>/CS) i szybkości transportu elektronów (ET<sub>o</sub>/CS) w chłodzie, co świadczy o większym zapotrzebowaniu na energię w fazie ciemnej fotosyntezy oraz dalszych etapach metabolizmu węglowodanów. Natomiast u genotypu wrażliwego mniejsze zapotrzebowanie na produkty fotosyntezy wynikało ze spadku aktywności SS (E.C. 2.4.1.13) i SPS (EC2.4.1.14), w odróżnieniu od linii tolerancyjnej, gdzie aktywność SS i SPS pozostała na poziomie kontroli. Rola tych dwóch enzymów wydaje się mieć szczególne znaczenie dla dystrybucji węglowodanów podczas stresu zalania korzeni w chłodzie, biorąc pod uwagę wyniki Nolte i Koch (1993) oraz Koch (2004), którzy wykazali związek pomiędzy aktywnością SS i SPS a dostarczaniem metabolitów do oddychania lub syntezy kalozy. Uzyskane w pracy (b.5) wyniki wskazują, że enzymy metabolizmu sacharozy mogą decydować również o zwiększonej syntezie elementów strukturalnych ściany komórkowej. Analiza cukrów uzyskanych w wyniku hydrolizy ściany komórkowej wykazała około dwa razy większą ich zawartość u roślin kontrolnych linii tolerancyjnej zarówno w liściach jak i w węzłach krzewienia w porównaniu do genotypu wrażliwego. Po zalaniu w chłodzie u linii tolerancyjnej na pleśń śniegową ich zawartość była dwukrotnie wyższa niż u genotypu podatnego i to pomimo związanego z zalaniem spadku ich zawartości o ponad 50% co może świadczyć o ich wykorzystaniu w reakcjach obronnych.

Kluczowym mechanizmem wiążącym odporność na pleśń śniegową i stres zalania korzeni w chłodzie jest dystrybucja węglowodanów. Badane linie wykazywały różną zdolność do akumulowania i mobilizowania rezerw. U linii tolerancyjnej większa wydajność fotochemiczna fotosyntezy związana była z niższą zawartością węglowodanów w liściach roślin na skutek intensywnego odprowadzania fotoasymilatów do tkanek akceptorowych a następnie wykorzystania ich do syntezy elementów strukturalnych ściany komórkowej. Mechanizm obserwowany u roślin tolerancyjnych polegał na rozdzieleniu puli asymilatów w większej ilości do węzłów krzewienia niż do liści. Po 10 dniach zalewania u linii tolerancyjnych 60% cukrów znajdowało się w węzłach, podczas gdy u wrażliwych ponad 50% puli cukrów pozostawała w liściach. Zakumulowane rezerwy cukrów w warunkach stresu mogły być następnie łatwo dostępne w reakcjach obronnych między innymi dla beztlenowego metabolizmu podczas zalania oraz do walki z patogenem.

Podsumowując, linie tolerancyjne akumulowały więcej cukrów rozpuszczalnych w węzłach krzewienia niż w liściach na skutek większej wydajności fotochemicznej fotosyntezy stymulowanej przez sprawne odprowadzanie asymilatów dzięki aktywności SS i SPS. W niskiej temperaturze niezależnie od stresu zalania linie tolerancyjne na pleśń śniegową lokowały więcej cukrów w ścianie komórkowej zarówno w liściach jak i węzłach krzewienia.



Ryc. 1. Schemat zależności pomiędzy reakcją na stres abiotyczny i biotyczny a dystrybucją asymilatów i poziomem ABA.

Uzyskane wyniki składające się na osiągnięcie naukowe wpisują się w ogólnoświatową dyskusję w czasopismach naukowych na temat roli cukrów w odporności zbóż ozimych i traw pastewnych na mróz oraz pleśń śniegową. Zagadnienie to nabiera szczególnego znaczenia w aspekcie zmian klimatycznych czyli prognozowanego globalnego ocieplenia oraz wzrostu ilości opadów deszczu podczas zimy. Do tej pory koncentrowano się

głównie na zmianach jakościowych węglowodanów. Wykazano, że rośliny bardziej odporne na pleśń gromadziły więcej fruktanów podczas gdy bardziej odporne na mróz gromadziły więcej cukrów prostych (Gaudet 1999). Z badań opisanych powyżej wynika natomiast, że należy brać pod uwagę także dystrybucję węglowodanów zarówno pomiędzy organami jak i w obrębie komórki. Istotne znaczenie ma także rozdzielanie puli asymilatów w większej ilości do węzłów krzewienia niż do liści oraz lokowanie węglowodanów w ścianie komórkowej.

### **Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań**

- i.** Kluczową rolę dla kształtowania odporności żyta na *M. nivale* odgrywa dystrybucja fotoasymilatów zarówno pomiędzy organami rośliny jak i w obrębie komórek. Dystrybucja ta różni się pomiędzy liniami tolerancyjnymi i wrażliwymi oraz może być modyfikowana przez czynnik biotyczny (*Trichoderma*) i abiotyczny (zalenie).
- ii.** Odporność żyta na pleśń śniegową może być indukowana podczas aklimacji w chłodzie poprzez wpływ na kierunek transportu asymilatów. Korzystnym zjawiskiem jest rozdzielanie puli asymilatów w większej ilości do węzłów krzewienia niż do liści oraz lokowanie węglowodanów w ścianie komórkowej.
- iii.** Indukowane przez wzrost poziomu ABA w chłodzie przymknięcie szparek nie limituje fotosyntezy netto na skutek wysokiej wydajności transportu elektronów oraz sprawnego odprowadzania asymilatów do tkanek akceptorów, natomiast może przyczynić się do ograniczenia wnikania patogena przez otwory naturalne.
- iv.** Interakcja pomiędzy patogenem a rośliną różni się u linii tolerancyjnych i wrażliwych pod względem tempa rozprzestrzeniania się patogena na co ma wpływ przebieg szlaków metabolizmu węglowodanów i fenoli prowadzący do wzmocnienia naturalnych barier poprzez syntezę kalozy i wysycenie ściany komórkowej większą ilością fenoli i węglowodanów.
- v.** W pewnych okolicznościach, takich jak hartowanie żyta w chłodzie, prawdopodobne jest występowanie hemibiotroficznej strategii życiowej u znanego dotąd jako nekrotrofa *M. nivale*.
- vi.** O strategicznej roli węzłów krzewienia świadczy większe nasilenie reakcji obronnych po inokulacji *M. nivale* w węzłach niż w liściach.

### **Literatura**

- Antikainen M., Pihakashi S. 1994. Early developments in RNA, protein and sugar levels during cold stress in winter rye (*Secale cereale*) leaves. *Ann. Bot.* 74:335–341.
- Dong X., Hong Z., Chatterjee J., Kim S., Verma D.P.S. 2008. Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogeninfection. *Planta* 229:87-98.
- Gaudet D.A., Laroche A., Yoshida M. 1999. Low temperature-wheat-fungal interactions: a carbohydrate connection. *Physiol.Plant.*106:437–444.
- Hüner N.P.A., Migus W., Tollenaar M. 1986. Leaf CO<sub>2</sub> exchange rates in winter rye grown at cold hardening and non-hardening temperature, *Canadian Journal of Plant Science* 66:443-452.

- Hsiang T., Matsumoto N., Millett S.M. 1999. Biology and management of Typhula snow molds of turfgrass. *Plant Dis.* 83:788–798.
- Hurry V.M., Huner N.P.A. 1991. Low growth temperature effects and differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol.* 96:491–497.
- Jang J.C., León P., Zhou L., Sheen J. 1997. Hexokinase sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9:5–19.
- Hüner N., Öquist G., Hurry V.M., Krol M., Falk S., Griffith M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth. Res.* 37:19–39.
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanism and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235-246.
- Lewis N.G., Yamamoto E. 1990. Lignin: occurrence biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 41:455-96.
- Lindén L., Palonen P., Seppänen M. (Eds.), 1999. Cold Hardiness Research on Agricultural and Horticultural Crops in Finland. *Agricultural and Food Science in Finland.* 8: 459–477.
- Li, H., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Cao, W., 2013. Carbohydrates accumulation and remobilization in wheat plants as influenced by combined waterlogging and shading stress during grain filling. *J. Agron. Crop Sci.* 199, 38–48.
- Livingston, D.P., Premakumar, R., Tallury, S.P., 2006. Carbohydrate partitioning between upper and lower regions of the crown in oat and rye during cold acclimation and freezing. 200–208.
- McBeath JH. 2002. Snow mold-plant-antagonist interactions: survival of the fittest under the snow. *Plant Health Instr.*, <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1010-01>.
- Nolte K.D., Koch K.E. 1993. Companion-cell specific localisation of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101:899–905.
- Mendgen KW, Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* 7:352e6.
- Öquist G., Hurry VM., Huner NPA. 1993. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol.* 101:245–250.
- Pollock CJ., Cairns AJ. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 77–101.
- Perfect SE, Green JR. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol Plant Pathol* 2:101-108.
- Rumbolz J., Kassemeyer HH., Steinmetz V, Deising HB., Mendgen K., Mathys D, et al. 2000. Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uromyces necator* and adhesion to the host cuticle. *Can J Bot* 78:409-421.
- Rapacz M., Ergon Å., Höglind M., Jørgensen M., Jurczyk B., Østrem L., Rognli O.A., Tronsmo A.M. 2014. Overwintering of herbaceous plants in a changing climate. Still more questions than answers *Plant Science*, 225:34-44.
- Sage R.F. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO<sub>2</sub>: the gas exchange perspective, *Photosynthesis Research* 39:351e368.
- Schlüter U., Albrecht G., Wiedenroth E.M. 1996. Content of water soluble carbohydrates under oxygen deprivation in plants with different flooding tolerance. *Folia Geobot. Phytotaxon.* 31:57–64.
- Schulze-Lefert P. 2004. Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 7: 377-383
- Seo S, Ishizuka K, Ohashi Y. 1995. Induction of salicylic acid -glucosidase in tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant Cell Physiology* 36:447-453.

- Smeekens S., Rook F. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *PlantPhysiol.* 115:7–13.
- Ton J., Flors V., Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance, *Trends in Plant Science*, 14:310-317.
- Trillas M, Cotxarrera L, Casanova E, Cortadellas N. 2000. Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 56:107-116.
- Winter H.S., Huber C. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35:253–289.
- Wojtkowiak-Gębarowska E. 2006. Mechanisms of biological control soil-borne plant pathogen by fungus from genus *Trichoderma*. *Post. Mikrobiol.* 45:261–273.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Oprócz opisanych powyżej eksperymentów przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, podczas swojej pracy badawczej zajmowałam się różnymi zagadnieniami znajdującymi się w obszarze szeroko rozumianej reakcji roślin na niekorzystne abiotyczne i biotyczne czynniki środowiska. Poza dominującym nurtem badań dotyczącym kompleksowej cechy zimotrwałości traw i zbóż ozimych, włączałam się również w inne badania realizowane głównie we współpracy z pracownikami Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie. Najważniejsze podejmowane przeze mnie problemy badawcze to:

- Mechanizmy decydujące o zimotrwałości roślin z rodziny *Poaceae*
- Mechanizmy odporności indukowane pod wpływem zalanía korzeni w cieple i w chłodzie
- Rola związków steroidowych w odporności zbóż na stres cieplny i suszę
- Rola brasinosteroidów w zimotrwałości żyta i życicy trwałej
- Antyoksydanty jako markery stresu u roślin pod działaniem różnych czynników środowiskowych

Podczas studiów magisterskich na kierunku „Rolnictwo”, miałam możliwość poszerzania swojej wiedzy o zagadnienia głównie z dziedziny biologii molekularnej, realizując w ramach indywidualnego toku studiowania liczne przedmioty na kierunku „Biologia” na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. W trakcie studiów zaczęłam także rozwijać swoje zainteresowania badawcze biorąc udział w doświadczeniach prowadzonych w ramach koła naukowego na Wydziale Rolniczym AR. Eksperymenty te dotyczące wpływu metali ciężkich na rośliny rzepaku wykazały, że organem najmniej wrażliwym na obecność ołowiu w pożywce jest korzeń. Korzeń nie tylko akumulował najwięcej tego pierwiastka, ale pełnił też rolę filtru zapobiegającego dalszemu przemieszczaniu ołowiu do bardziej wrażliwych nadziemnych części roślin. Wyniki doświadczeń zostały przedstawione na konferencji oraz opublikowane w materiałach pokonferencyjnych (**II.D.1**).

Zagadnienie dotyczące wpływu tzw. pre-hartowania na mrozoodporność jarych i ozimych form rzepaku (*Brassica napus ssp. oleifera*) będące przedmiotem pracy magisterskiej, wyznaczyło kierunek moich przyszłych badań dotyczących zimotrwałości traw

i zbóż ozimych. Wyniki uzyskane w pracy magisterskiej, której celem było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy jare formy rzepaku mogą hartować się tak jak formy ozime oraz jakie są różnice pomiędzy nimi w przebiegu tego procesu, zostały włączone do publikacji (II.A.1) oraz przedstawione na konferencji międzynarodowej (III.B.2). Badania te wykazały, że rzepak jary nie jest w stanie dobrze przetrwać z powodu ograniczonej zdolności do zapobiegania wydłużaniu pędu w temperaturze kilku stopni powyżej zera.

Na realizację pracy doktorskiej uzyskałam finansowanie w ramach tzw. grantu promotorskiego a jej wyniki zostały opublikowane w 5 artykułach w czasopiśmie z listy JCR. Przeprowadzone badania dotyczyły zwłaszcza roli tzw. pre-hartowania poprzedzającego właściwe hartowanie, w zimotrwałości traw gatunku *Festulolium*. Materiałem badawczym było sześć androgenicznych genotypów *Festulolium* pochodzących z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Zostały one wyselekcjonowane w warunkach polowych, na podstawie różnic w odporności na mróz i pleśń śniegową (*Microdochium nivale*). W badaniach laboratoryjnych ustalono, że pre-hartowanie wpływa korzystnie nie tylko na mrozoodporność, ale również na odporność na pleśń śniegową. Z większą zimotrwałością można wiązać wyższą zawartość ABA w liściach oraz obniżony potencjał osmotyczny, który zależy od akumulowanych w chłodzie cukrów rozpuszczalnych natomiast nie zależy od stężenia proliny (II.A.5). Jako marker wytypowano także nieinwazyjne pomiary parametrów fluorescencji chlorofilu, które korelowały z zawartością węglowodanów rozpuszczalnych. Konkretnie wzrost poziomu węglowodanów w liściach po pre-hartowaniu i hartowaniu w chłodzie u genotypów podatnych był związany z mniejszym spadkiem wygaszania fotochemicznego ( $q_p$ ) i wydajności kwantowej PSII ( $\phi_{PSII}$ ), natomiast u genotypów tolerancyjnych spadek zawartości cukrów był związany z mniejszym spadkiem wygaszania niefotochemicznego (NPQ) a większym spadkiem  $q_p$  i  $\phi_{PSII}$  (II.A.7). W kolejnej pracy wskazano na rolę aktywacji PAL (amoniakolizy fenyloalaniny), ale już nie poziomu rozpuszczalnych fenoli w odporności na mróz i pleśń śniegową oraz zasugerowano potencjalną rolę dla zimotrwałości obniżonego poziomu kwasu salicylowego (II.A.6). Stwierdzono także u roślin tolerancyjnych, podczas patogenezы wywołanej *M.nivale*, hamowanie aktywności CAT prowadzące do zwiększonej akumulacji nadtlenu wodoru oraz obniżenie aktywności metabolicznej wyrażającej się mniejszymi stratami ciepła (II.A.4). Aktywność CAT była hamowana zwłaszcza podczas pre-hartowania, jak również podczas hartowania w chłodzie. Natomiast w miarę obniżania temperatury indukowana była aktywność puli peroksydaz oraz SOD (II.A.2). W ramach badań na zimotrwałością wykazano również, że gatunki traw takie jak kostrzewa łąkowa, kostrzewa trzcinowa, życica wielokwiatowa oraz *Festulolium* różnią się pod względem reakcji na chłód podczas pre-hartowania i hartowania co ma odzwierciedlenie w odporności na pleśń. Najbardziej podatna na patogen życica wielokwiatowa charakteryzowała się między innymi najwyższym wskaźnikiem aktywności metabolicznej, który świadczył o stratach energii w postaci ciepła (II.A.8).

Część wyników uzyskanych w ramach realizacji projektu (II.I.1.) opublikowano w pracy (II.A.10). Wykazano tam, że stopniowy spadek zawartości cukrów rozpuszczalnych w liściach roślin inokulowanych kontrastuje ze znacznie mniejszą dynamiką zmian w węzłach. Charakterystyczny dla roślin odporniejszych, wzór zmian podczas patogenezы polegający na wzroście ABA po 5DPI a następnie spadku po 9DPI, obserwowano w liściach linii należącej



do grupy tolerancyjnych. Pozostałe dwie linie charakteryzowały się znacznym wzrostem ABA po 9DPI czyli w fazie, w której hormon ten negatywnie jest powiązany z odpornością na patogen.

W tematykę zimotrwałości wpisują się także badania opublikowane w pracy **(II.A.20)** w których wykazano, że podczas hartowania za wzrost aktywności Rubisco u życicy trwałej (*Lolium perenne*) odpowiada aktywacja dwóch wariantów splicingowych aktywazy Rubisco. Z kolei podczas pre-hartowania następuje jedynie aktywacja wariantu splicingowego genu kodującego dużą podjednostkę Rubisco.

Badania dotyczące mechanizmów odpornościowych podczas zalania korzeni wodą rozpoczęto od doświadczeń dotyczących wpływu tego stresu na rośliny bobiku (*Vicia faba*) w optymalnej temperaturze wzrostu. Wykazano, że siewki są bardziej wrażliwe na stres zalewania niż rośliny w fazie generatywnej oraz, że ma na to wpływ spadek zawartości chlorofilu oraz obniżenie intensywności fotosyntezy wraz ze spadkiem przewodności szparkowej. Stwierdzono także, że w fazie siewki uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego po ustąpieniu stresu były odwracalne **(II.A.3)**. Niezależnie od przywrócenia normalnego funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego uszkodzenia siewek wywołane zalaniem korzeni prowadziły do istotnej redukcji wzrostu. Mógł się do tego przyczynić fakt, że po przywróceniu warunków tlenowych aktywność enzymów antyoksydacyjnych wracała do poziomu kontroli w odróżnieniu od roślin w fazie generatywnej **(II.A.11)**.

Brałam także udział w doświadczeniach realizowanych w Katedrze Fizjologii Roślin UR, dotyczących stresu zalania korzeni wodą podczas hartowania w temperaturze chłodowej takich gatunków jak *Festuca pratensis* i *Lolium perenne*. Z badań tych opublikowanych w pracach **(II.A.18, II.A.21)** wynika, że zmiany stężenia cukrów w liściach regulują wydajność fotosyntezy poprzez wpływ między innymi na aktywność Rubisco, i że zmiany te są zależne od genotypu i czasu hartowania. Z kolei wyniki opublikowane w pracy **(II.A.23)** wykazały, że zalanie w chłodzie również zwiększa mrozoodporność a o przeżyciu i odroście roślin decyduje głównie wzrost mrozoodporności w węzłach krzewienia.

Byłam także zaangażowana w badania dotyczące roli związków steroidowych w odporności zbóż na stres cieplny i stres suszy. W badaniach tych prowadzonych w Zakładzie Biologii Rozwoju IFR PAN w Krakowie stwierdzono, że protekcyjne działanie 24-epibrasinolidu (EBR) w warunkach stresu cieplnego (42°C) polegało na zwiększeniu wydajności PSII oraz obniżeniu intensywności oddychania oraz aktywności metabolicznej, chociaż najwyższe z zastosowanych stężeń hormonu obniżało plon jęczmienia. Egzogennie podany hormon przemieszczał się w roślinie, gdyż jego aplikacja do apoplastu pierwszego i drugiego liścia skutkowałą wzrostem poziomu 24-epibrasinolidu w siódmym liściu niezależnie od zastosowanego stężenia **(II.A.9)**. Do związków steroidowych należy również progesteron, który jak wykazały nasze badania może być częścią odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. U pszenicy zawartość tego typowego dla metabolizmu ssaków hormonu, zależała od odmiany, fazy wzrostu oraz zmieniała się pod wpływem stresu suszy. Pod wpływem suszy stwierdzono obecność jedynie wolnego progesteronu, którego poziom spadał u odmiany wrażliwej oraz rósł u odmiany odporniejszej, natomiast w warunkach optymalnego uwodnienia stwierdzono także formę związaną **(II.A.12)**. Podane dokorzeniowo inhibitory

progesteronu (mifepristone and trilostane), w czasie stresu suszy obniżały poziom progesteronu oraz wpływały na spadek aktywności Rubisco. Wykazaliśmy również, że progesteron i pochodne pregnanenu stymulują rozwój generatywny pszenicy ozimej podczas gdy brassinosteroidy hamują go (**II.A.16**). W kolejnych pracach przedstawiono charakterystykę mutantów z zaburzoną produkcją brasinosteroidów podczas stresu suszy. Badania opublikowane w (**II.A.19**) wykazały, że optymalnie podlewane rośliny jęczmienia odmiany Delisa, charakteryzowały się wyższym poziomem aktywności Rubisco i akumulowały więcej sacharozy, czemu towarzyszył niższy niż u mutantów poziom glukozy i fruktozy. Z kolei u mutantów niższej aktywności Rubisco (oraz zawartości sacharozy) towarzyszyła zwiększona akumulacja glukozy i fruktozy, co może wskazywać na zależną od brasinosteroidów represję fotosyntezy przez wysoki poziom heksoz w optymalnych warunkach nawadniania. Mutanty produkowały również mniej proliny oraz charakteryzowały się mniejszą akumulacją transkryptów genów *hsp90* (heat shock protein) związanych z odpowiedzią na stres zarówno w warunkach optymalnego uwodnienia jak i w suszy. Z kolei obniżona fotosynteza netto oraz wydajność fotosystemu II została wykazana u mutantów jedynie w warunkach suszy. Zmiany hormonalne dotyczące poziomu ABA oraz cytokinin, które zostały wykryte u mutantów prowadzą do wniosku, że niektóre efekty fizjologiczne, mogą być spowodowane zarówno bezpośrednio poprzez spadek poziomu brasinosteroidów, jak i pośrednio, poprzez zmiany w poziomie innych hormonów. Jak dokładnie zmiany hormonalne powoduje mutacja genu kodującego enzymy biorące udział w biosyntezie i sygnalizacji brasinosteroidów, zostało przedstawione w pracy (**II.A.24**). U mutantów w warunkach optymalnego uwodnienia stwierdzono spadek zawartości kwasu giberelinowego oraz kwasu jasmonowego co wskazuje na stymulujący wpływ brasinosteroidów na syntezę tych hormonów. Z kolei susza spowodowała znaczne zwiększenie akumulacji endogennych brasinosteroidów castasteronu oraz 24-epibrasinolidu oraz stymulowała akumulację tzw. hormonów stresu czyli kwasu jasmonowego, kwasu salicylowego oraz kwasu abscysynowego.

Badania nad rolą związków steroidowych podczas suszy były inspiracją do sformułowania hipotezy badawczej o korzystnym wpływie należącego do brasinosteroidów, 24-epibrasinolidu na zimotrwałość życicy trwałej oraz żyta ozimego. Badania te prowadziłam w ramach projektu finansowanego przez NCN, którego byłam kierownikiem. W badaniach tych wykazałam, że 24-epibrasinolid, podany dolistnie przed aklimacją do chłodu modyfikuje przebieg tego procesu czego konsekwencją jest zwiększenie mrozoodporności życicy trwałej i żyta oraz wzrost odporności żyta na pleśń śniegową. Indukowany przez EBR wzrost tolerancji na mróz był związany ze spadkiem monosacharydów w liściach, który stymulował wydajność fotosyntezy i aktywność Rubisco (**II.A.22**). W eksperymencie z zastosowaniem brasinazolu specyficznego inhibitora biosyntezy brasinosteroidów, wykazałam u życicy trwałej związek pomiędzy indukowaniem przez 24-epibrasinolid ekspresji genów aktywazy Rubisco (*RcaA*), syntazy sacharozy (*SUS*) i genu kodującego enzym szlaku metabolizmu fruktanów (*1-SST*) oraz wzrostem aktywności enzymów Rubisco i SPS a wzrostem poziomu akumulacji węglowodanów w węzłach jako efekt eksportu cukrów rozpuszczalnych z liści (**III.B.37**).

Inne doświadczenie pozwoliło z kolei ustalić, że *TBP-1* i *UBI* są optymalnymi genami referencyjnymi do analiz ekspresji genów metodą Real Time PCR w badaniach dotyczących

roli brasinosteroidów w roślinie (**II.A.14**). Wykazano także w przebiegu hartowania współdziałanie EBR z kwasem jasmonowym i ACC, oraz brak interakcji z kwasem salicylowym. Stwierdziłam też, że efekty wywoływane przez EBR nie są uniwersalne, lecz zależą od genotypu i od temperatury wzrostu (praca w druku w *Journal of Plant Growth Regulation*). Na podstawie wyników uzyskanych w projekcie wskazano na mechanizmy związane z zimotrwałością żyta i życie. Wiedza ta może być wykorzystana w przyszłości w praktyce rolniczej zarówno do bezpośredniego stosowania tego bezpiecznego dla środowiska hormonu roślinnego w uprawach polowych jak i do efektywnej selekcji pożądanych genotypów w procesie tworzenia nowych odmian, zwłaszcza mając na uwadze, że skutek ocieplenia klimatu, mrozoodporność zmniejsza się z powodu braku naturalnej selekcji i może być przyczyną słabszego przezimowania podczas wystąpienia ostrzejszych zim.

W kręgu moich zainteresowań badawczych znajduje się również zagadnienie roli antyoksydantów w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. W doświadczeniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN, dotyczących roli stresu antyoksydacyjnego jako czynnika regulującego efektywność embriogenezy mikrospor pszenżyta (*xTriticosecale* Wittm.) wykazano związek pomiędzy żywotnością mikrospor a wzrostem aktywności SOD. Ważnym warunkiem generowania sygnału inicjującego przeprogramowanie mikrospor była zdolność do utrzymania aktywności enzymów antyoksydacyjnych w niskiej temperaturze i w ciemności, na takim poziomie aby chroniły komórki przed toksycznymi efektami produkcji ROS (**II.A.15**).

W tym samym zespole powstał także pomysł zbadania roli, antyoksydantów zwłaszcza nieenzymatycznych, w procesie androgenyzy żyta. Wstępne wyniki badań wskazywały na szczególną rolę drobnocząsteczkowego antyoksydanta glutationu, w zwiększaniu efektywności androgenyzy. W celu opanowania technik pomiarowych zawartości glutationu utlenionego i zredukowanego oraz enzymów metabolizmu glutationu nawiązałam współpracę z Plant Protection Institute w Budapeszcie gdzie odbyłam wizytę naukową w czerwcu 2014 roku. Pomiar zawartości glutationu i enzymów jego metabolizmu zostały następnie włączone jako zadanie badawcze w projekcie, którego jestem wykonawcą (**II.I.8**) zaś wstępne zostały przedstawione na konferencjach międzynarodowych (**III.B41**, **III.B44**).

Interesującym tematem, który podjęłam w ramach współpracy z Katedrą Ochrony Środowiska, WR-E, UR, była charakterystyka systemu antyoksydacyjnego u siewek pszenicy traktowanych nanosrebrem oraz grzybem *Fusarium culmorum*. Analiza odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego wykazała, że dla komórek bardziej toksyczne było nanosrebro niż *F.culmorum*. Stwierdzono również, że nanosrebro było akumulowane w korzeniach i transportowane do części nadziemnych natomiast patogen ograniczał zarówno jego akumulację jak i translokację (**II.A.17**).

Do związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych należy trans-rezweratrol. We współpracy z IFR PAN oraz Katedrą Farmakognozji, Wydziału Farmacji, Uniwersytetu Jagiellońskiego, wykazano, że związek ten ma wielokierunkowy wpływ na metabolizm pszenicy. Resweratrol stymulował rozwój generatywny, zwiększał efektywność fotosyntezy podczas patogenezы oraz poprzez stymulację metabolizmu fenoli korzystnie wpływał na odporność na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* (DC.) Speer). U odmiany odporniejszej na patogen zwiększał aktywność PAL i  $\beta$ -D-glukozydazy w regionach liści nie

wykazujących objawów infekcji a u odmiany podatnej również w regionach zaatakowanych przez patogen. Ponadto analiza HPLC wykazała większą zawartość tego związku w liściach zainfekowanych (**II.A.13**).

W roku 2016 odbyłam przyznany w ramach konkursu finansowanego z Własnego Funduszu Stypendialnego dla pracowników UR w Krakowie, staż naukowy w Instytucie Genetyki Roślin i Biotechnologii Słowackiej Akademii Nauk w Nitrze. Celem stażu było zapoznanie się nowymi metodami analitycznymi oraz nawiązanie współpracy naukowej. W trakcie stażu brałam udział w doświadczeniach dotyczących indukowanej stresem aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy oraz analizy zmian markerów stresu u roślin transformowanych genem  $\beta$ -1,3-glukanazy potencjalnie zwiększającym odporność na czynniki środowiska. Dzięki kontaktom nawiązanym podczas stażu zamierzam rozszerzyć o analizy białek PR, badania dotyczące związku pomiędzy odpornością na pleśń śniegową a zalewaniem korzeni w chłodzie. Zamierzam ustalić rolę białek PR w odporności na obydwie czynniki stresowe zarówno na poziomie ekspresji genów jak i aktywności enzymów.

Planuję również kontynuować badania dotyczące roli brasinosteroidów zarówno w przebiegu aklimacji do chłodu jak i ich roli w mrozoodporności. W dotychczasowych moich badaniach brasinosteroidy były aplikowane na rośliny egzogennie lub stosowano inhibitor syntezy brasinosteroidów brasinazol. W najbliższej przyszłości aby precyzyjniej określić jakie mechanizmy zależne od brasinosteroidów mogą wpływać na mrozoodporność, zamierzam przeprowadzić eksperymenty na mutantach z zaburzoną syntezą i percepcją brasinosteroidów. Moje plany na najbliższe lata to również kontynuowanie badań jako wykonawca w czterech projektach naukowych: jednym afiliowanym w UR w Krakowie, jednym w UŚ w Katowicach w oraz dwóch w IFR PAN w Krakowie.

### **Podsumowanie bibliometryczne osiągniętego dorobku publikacyjnego**

Mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się z **40** publikacji w układzie pełnych prac naukowych, z czego **37** opublikowano w recenzowanych czasopismach naukowych a **3** w biuletynach i monografiach pokonferencyjnych.

**29** prac naukowych mojego dorobku zostało opublikowanych w czasopismach z bazy JCR, ich łączna miara oddziaływania IF zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **61,155**. Są to czasopisma: *Acta Physiologiae Plantarum* (4 prace), *Environmental and Experimental Botany* (2 prace), *European Journal of Plant Pathology* (1 praca), *Frontiers in Plant Science* (1 praca), *Functional Plant Biology* (1 praca), *Journal of Agronomy and Crop Science* (2 prace), *Journal of Applied Botany and Food Quality* (1 praca), *Journal of Phytopathology* (2 prace), *Journal of Plant Interactions* (1 praca), *Journal of Plant Physiology* (2 prace), *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1 praca), *Physiological and Molecular Plant Pathology* (3 prace), *Plant Breeding* (1 praca), *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (1 praca), *Plant Growth Regulation* (1 praca), *Plant Physiology and Biochemistry* (4 prace) oraz *Steroids* (1 praca).

Zgodnie z załącznikami komunikatu MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 9 grudnia 2016 r. łączna punktacja mojego dorobku naukowego wynosi **1009** pkt. Po wyłączeniu 5 prac wchodzących w skład przedstawianego osiągnięcia

naukowego mój pozostały dorobek naukowy stanowi 36 prac naukowych o łącznym IF 48,799 i punktacji MNiSW 839 pkt.

**Tabela 1.** Dane bibliometryczne osiągniętego dorobku naukowego przed i po doktoracie

Wyszczególnienie	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	ilość	pkt. MNiSW	IF	ilość	pkt. MNiSW	IF	ilość	pkt. MNiSW	IF
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego				5	170	12.356	5	170	12.356
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JCR	1	25	0,296	23	715	48.503	24	735	48,799
Publikacje naukowe w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie JCR	4	52		4	52		8	104	
Publikacje w układzie pełnych prac naukowych w wydawnictwach pokonferencyjnych (monografie, biuletyny)	1			2			3		
<b>Razem</b>	<b>6</b>	<b>77</b>	<b>0.296</b>	<b>34</b>	<b>937</b>	<b>60.859</b>	<b>40</b>	<b>1009</b>	<b>61.155</b>

Przedstawione w Tabeli 1 dane bibliometryczne dokumentują mój rozwój naukowy po doktoracie. Według bazy Web of Science h-indeks prac z mojego dorobku naukowego wynosi obecnie 8. Pozostałe osiągnięcia w zakresie pracy naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej zostały przedstawione w Załączniku 4 do niniejszego wniosku.

Kraków, 8 maj 2017 r.

*Ewa Pożucha*

-----  
Podpis Wnioskodawcy