

# **Autoreferat**

---

dr Anna Bilaska-Kos

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Biochemii i Biotechnologii

Radzików, 05-870 Błonie

Radzików 2023

## 1. Imię i nazwisko

Anna Bilaska-Kos

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**Stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii – z wyróżnieniem.** Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB), Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Radzików, 05-870 Błonie. 18.12.2007.

**Tytuł pracy doktorskiej:** „Fizjologiczne, ultrastrukturalne i molekularne aspekty zahamowania procesów transportowych w liściach kukurydzy w chłodzie”.

**Stopień magistra biologii,** specjalizacja: biologia środowiskowa. Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, kierunek: Biologia. 15.07.2002.

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.11.2016 – obecnie Stanowisko: **Adiunkt w Zakładzie Biochemii i Biotechnologii,** IHAR-PIB, Radzików.

01.11.2013 – 31.10.2016 Stanowisko: **Adiunkt naukowy w Zakładzie Fizjologii Roślin,** Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych w Weryni, Uniwersytet Rzeszowski (staż po uzyskaniu stopnia naukowego doktora finansowany z projektu Narodowego Centrum Nauki).

01.04.2008 – 31.10.2013 Stanowisko: **Adiunkt w Pracowni Stresów Środowiskowych** w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB, Radzików.

01.03.2004 – 31.03.2008 Stanowisko: **Asystent w Pracowni Stresów Środowiskowych** w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR, Radzików.

19.08.2002 – 29.02.2004 Stanowisko: **Inżynier w Pracowni Stresów Środowiskowych** w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR, Radzików.

#### 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia

Analiza mechanizmu reakcji na chłód u dwóch gatunków roślin C<sub>4</sub>: kukurydzy (*Zea mays* L.) i miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x giganteus*).

##### 4.2. Wykaz publikacji wchodzący w skład osiągnięcia naukowego

W skład mojego osiągnięcia naukowego wchodzi cykl prac składający się z 4 oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2016-2022, w czasopismach znajdujących się Journal Citation Reports (JCR):

1. **Bilska-Kos A.\***, Szczepanik J., Sowiński P. 2016. Cold induced changes in the water balance affect immunocytolocalization pattern of one of the aquaporins in the vascular system in the leaves of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology* 205:75-79. IF<sub>2016</sub> =3.121, MNiSW<sub>2016</sub> =35
2. **Bilska-Kos A.\***, Panek P., Szulc-Głaz A., Ochodzki P., Cisło A., Zebrowski J. 2018. Chilling-induced physiological, anatomical and biochemical responses in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology*. 228, 178-188. IF<sub>2018</sub> =2.825, MNiSW<sub>2018</sub> =35
3. **Bilska-Kos A.\***, Mytych J., Suski S., Magoń J., Ochodzki P., Zebrowski J. 2020. Sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose synthase (SUS) and their products in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and *Zea mays* at low temperature. *Planta* 252, 23. IF<sub>2020</sub> =4.116, MNiSW<sub>2020</sub> = 100
4. **Bilska-Kos A.\***, Pietrusińska A., Suski S., Niedziela A., Linkiewicz A.M., Majtkowski W., Żurek G., Zebrowski J. 2022 Cell Wall Properties Determine Genotype-Specific Response to Cold in *Miscanthus × giganteus* Plants. *Cells*, 11, 547. IF<sub>2022</sub> =6.600, punkty MEiN<sub>2022</sub> =140

\* autor korespondencyjny

Podana punktacja MEiN/MNiSW oraz Impact Factor (IF) dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego jest zgodny z rokiem opublikowania. Wartość IF jest określana na podstawie Journal Citation Reports (JCR). W przypadku publikacji z 2016 i 2018 r., w czasopiśmie *Journal of Plant Physiology*, podano wartość punktacji MNiSW

ustalanej na zasadach sprzed 31.07.2018 r. Obecna liczba punktów dla czasopisma Journal of Plant Physiology wynosi: 100 pkt. Kopie prac naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe, wkład wnioskodawcy oraz oświadczenia współautorów są zamieszczone w Załączniku nr 5 *Publikacje wraz z oświadczeniami współautorów*.

#### 4.3. Omówienie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Anomalie temperaturowe, które w ostatnich latach, występują coraz częściej w strefach klimatu umiarkowanego, w tym w Polsce, stanowią jedno z większych zagrożeń dla roślin uprawnych. Spokrewnione ze sobą rośliny ciepłolubne typu C<sub>4</sub> o dużym znaczeniu gospodarczym: kukurydza (*Zea mays* L.) i miskant olbrzymi (*Miscanthus × giganteus*) charakteryzują się relatywnie wysokim potencjałem plonowania, z uwagi na zdolność do wydajnego wiązania CO<sub>2</sub> przy ograniczeniu niekorzystnego procesu fotooddychania. Jak można się spodziewać, scenariusz prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin dający możliwość uzyskania wysokiego plonu, może być realizowany tylko w optymalnych warunkach. Optymalna temperatura dla wzrostu i rozwoju kukurydzy mieści się w zakresie: 21-31°C (Miedema, 1982), dla procesu fotosyntezy: około 30°C (Bennett i in., 1982, Crafts-Brandner i Salvucci, 2002), a dla maksymalnego plonu ziarna wynosi 25°C (Keeling i Greaves, 1990). W warunkach chłodu umiarkowanego (12-15 °C), pierwszymi objawami stresu u kukurydzy jest zahamowanie fotosyntezy, które może być związane z zaburzeniami ultrastruktury i rozwoju chloroplastów lub/i modyfikacjami w zawartości barwników fotosyntetycznych, prowadzących do chlorozy liści (Taylor i Craig, 1971, Miedema, 1982, Fryer i in., 1995, Kutík i in., 2004). Ponadto, jak stwierdzono w naszej grupie badawczej, jednym z mechanizmów determinujących wrażliwość kukurydzy na chłód może być zamykanie kanałów transportowych (plazmodesm) na szlaku fotosyntetycznym, prowadzące do zahamowania transportu międzykomórkowego oraz akumulacji sacharozy i zmian potencjału osmotycznego w komórkach liści tego gatunku (Bilska i Sowiński, 2010, Bilska-Kos i in., 2017). Natomiast, inny gatunek trawy C<sub>4</sub>, pochodzący z klimatu subtropikalnego południowo-wschodniej Azji – miskant olbrzymi (*Miscanthus x giganteus*) jest zdolny do utrzymania wysokiego tempa asymilacji CO<sub>2</sub>, nawet przy temp. liścia około 6°C, czyli znacznie poniżej minimum temperaturowego dla kukurydzy (Farage i in., 2006, Wang i in., 2008b). Miskant olbrzymi charakteryzuje się stosunkowo dużą produkcją biomasy i jednocześnie niewielkimi wymaganiami odnośnie ilości nawozów i herbicydów, co kwalifikuje ten gatunek na listę roślin o wysokim potencjale energetycznym. Ponadto, gatunek ten może

służyć jako surowiec do różnych zastosowań przemysłowych, między innymi w budownictwie, na przykład do produkcji materiałów izolacyjnych czy pokryć dachowych, w ogrodnictwie (donice, podłoże do uprawy roślin) oraz w hodowli zwierząt (ściółka dla koni). Dodatkowo, z uwagi na wysoką efektywność wykorzystania zasobów i tolerancję na różne stresy abiotyczne, miskant olbrzymi może być uprawiany na podłożu niskiej jakości oraz nieużytkach, co umożliwi zagospodarowanie gleb marginalnych. Tolerancja niskiej temperatury pozwala osiągnąć roślinom miskanta olbrzymiego około 60% wyższą produktywność niż ta, która charakteryzuje kukurydzę (Dohleman i Long, 2009), co częściowo może być związane ze stosunkowo wczesnym rozwojem liści aktywnych fotosyntetycznie (Głowacka i in., 2014), a także zachowaniem „równowagi” między wysokim tempem wzrostu a uruchamianiem mechanizmów obronnych przez roślinę w warunkach stresu (Fonteyne i in., 2018). Zjawisko tolerancji na niską temperaturę u miskanta olbrzymiego było badane w kilku pracach i dotyczyło głównie analizy aktywności enzymów fotosyntetycznych i wydajności fotosystemu II (PSII) (Beale i in., 1996, Naidu i in., 2003, Naidu i Long, 2004, Farage i in., 2006, Wang i in., 2008a, Wang i in., 2008b, Głowacka i in., 2014, Głowacka i in., 2015).

Prowadzenie prac badawczych obejmujących różne aspekty reakcji na chłód kukurydzy i miskanta olbrzymiego, tj.: na poziomie fizjologicznym, ultrastrukturalnym oraz molekularnym wydaje się być pożądane, ze względu na większą szansę na identyfikację mechanizmu warunkującego zróżnicowaną reakcję na ten czynnik stresowy u obu gatunków roślin. Dodatkowo, prowadzenie prac porównawczych dla kukurydzy i miskanta olbrzymiego wydaje się być właściwe, ze względu na reprezentowanie przez oba gatunki tego samego szlaku metabolicznego fotosyntezy  $C_4$  (NADP-ME). Natomiast, zastosowanie w prezentowanych pracach, dwóch linii kukurydzy zróżnicowanych pod względem wrażliwości na niską temperaturę, pozwoliło uzyskać dodatkowe informacje na temat mechanizmu odpowiedzi roślin na chłód w obrębie tego samego gatunku.

**Celem badań w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe było poznanie mechanizmu(ów) reakcji na stres chłodu u dwóch spokrewnionych gatunków roślin  $C_4$ : kukurydzy (*Zea mays* L.) i miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus*). W pracach przeprowadzono analizę wybranych cech fizjologicznych, biochemicznych, biomechanicznych, anatomicznych oraz molekularnych w liściach badanych gatunków roślin. W pracach były weryfikowane następujące hipotezy badawcze:**

**Praca 1 (P1):** niska temperatura wpływa na potencjał wodny komórek, czemu mogą towarzyszyć zmiany w lokalizacji (i/lub intensywności znakowania) akwaporyn w komórkach liści kukurydzy.

**Praca 2 (P2):** Zróżnicowana reakcja na chłód kukurydzy i miskanta olbrzymiego jest wynikiem odmiennej aktywności fotosyntetycznej związanej ze zmianami anatomii liści oraz modyfikacjami biochemii ściany komórkowej specyficznymi dla gatunku.

**Praca 3 (P3):** niska temperatura powoduje zmiany w zawartości i/lub lokalizacji głównych enzymów metabolizmu cukrów u roślin: syntazy fosforanu sacharozy (SPS) i syntazy sacharozy (SUS), a także modyfikacje w zawartości ich potencjalnych produktów, tj. sacharozy, celulozy i skrobi w liściach kukurydzy i miskanta olbrzymiego.

**Praca 4 (P4):** zróżnicowana reakcja fizjologiczna na chłód wśród 3 badanych genotypów miskanta olbrzymiego wiąże się ze zmianami właściwości biomechanicznych i biochemicznych ściany komórkowej, a także z modyfikacjami ultrastruktury kanałów transportowych (plazmodesm), łączących komórki na szlaku fotosyntetycznym.

U kukurydzy, długotrwały stres chłodu może powodować wtórny deficyt wodny (Wolfe, 1991, Janowiak i Markowski, 1994). Wynika to z jednej strony z hamowania pobierania wody przez korzenie, a z drugiej strony ze zwiększonej transpiracji liści (Aroca i in., 2003, Melkonian i in., 2004). W regulację potencjału wodnego komórek może być zaangażowana duża grupa akwaporyn, integralnych białek błonowych (*plasma membrane intrinsic proteins, PIPs*), tworzących kanały wodne w błonach komórkowych roślin (Kjellbom i in., 1999, Johansson i in., 2000), charakteryzujących się wysoką aktywnością w przewodzeniu wody w tkankach roślinnych (Maurel, 2007). Zmiany w aktywności akwaporyn, w poziomie ekspresji genów lub immunocytochemicznej lokalizacji tych białek były badane głównie w korzeniach (Aroca i in., 2005, Hachez i in., 2006, Sakurai i in., 2008, Matsumoto i in., 2009).

**W pracy (P1) celem badań była weryfikacja hipotezy, zakładającej, że chłód umiarkowany (12-14 °C) powoduje zmiany potencjału wodnego komórek w liściach kukurydzy, co może być związane ze zmianami w lokalizacji (i/lub intensywności znakowania) akwaporyn - białek błonowych odpowiedzialnych za transport wody w tkankach roślin.**

W tym celu, przeprowadziłam pomiary potencjału wodnego liści z użyciem aparatu HR33T (Vescor, USA) zgodnie z metodyką opisaną przez Rapacz (1998) oraz immunolokalizację 3 form akwaporyn z wykorzystaniem przeciwciał I-rzędowych specyficznych dla PIP1;3, PIP2;3 i PIP2;5 oraz przeciwciał II-rzędowych skoniugowanych z cząsteczkami złota koloidalnego (10 nm). Badania prowadzono z użyciem dwóch dobrze scharakteryzowanych pod kątem wrażliwości na chłód linii wsobnych (Sowiński, 1995, Verheul i in., 1996, Janda i in., 1998): KW 1074 (linia chłodotolerancyjna) i CM 109 (linia chłodowrażliwa). Zastosowano chłód umiarkowany (12-15 °C), gdyż ten rodzaj stresu temperaturowego nie powoduje nieodwracalnych uszkodzeń tkanek, jednak prowadzi do zahamowania wielu procesów fizjologicznych, włączając fotosyntezę i jednocześnie może uruchamiać procesy aklimatyzacyjne (Sowiński, 2000, Bilka i Sowiński, 2010).

W warunkach chłodu umiarkowanego, w liściach obu badanych linii kukurydzy, stwierdziłam obniżenie potencjału wodnego komórek ( $\Psi_w$ ), natomiast wyraźne zmiany w tym parametrze (prawie 2-krotne obniżenie) zaobserwowałam w liściach kukurydzy linii wrażliwej na chłód. Na podstawie optymalizacji procedury dla immunolokalizacji akwaporyn z zastosowaniem metody immunozłotowej, wybrałam rozcieńczenie 1:100 dla przeciwciał I-rzędowych (specyficznych dla PIPs). W przypadku dwóch form przeciwciał, tj. anti-PIP1;3 i anti-PIP2;5, na obrazach mikroskopowych obserwowałam niespecyficzne miejsca wiązania z epitopem, a mianowicie cząsteczki złota były lokalizowane w różnych typach komórek i w prawie wszystkich organellach, w tym, w ścianie komórkowej, plastydach i mitochondriach oraz w retikulum endoplazmatycznym, jednak bez wyraźnego związku z tymi organellami. Jednocześnie, w wariantach stanowiących kontrolę negatywną, w której pominięto inkubację z przeciwciałami I-rzędowymi, nie odnotowałam znakowania. Stąd, do dalszych analiz wykorzystałam formę akwaporyny PIP2;3. Białko to obserwowałam rozmieszczone wzdłuż błony komórkowej, we wszystkich badanych typach komórek obu linii kukurydzy, tj. w parenchymie wiązkowej, w komórkach towarzyszących, a także w cienkościennych i grubościennych rurkach sitowych. W liściach roślin kontrolnych (niechłodzonych) kukurydzy linii tolerancyjnej, forma PIP2;3 była zlokalizowana głównie w błonie komórkowej parenchymy wiązkowej i grubościennych rurkach sitowych. Niska temperatura spowodowała nieznaczny wzrost znakowania złotem koloidalnym w kompleksie komórka towarzysząca/cienkościenna rurka sitowa. Jednocześnie, w liściach linii wrażliwej, w roślinach kontrolnych (niechłodzonych), w błonach komórkowych grubościennych rurkach sitowych obserwowałam liczne ziarna złota koloidalnego. Natomiast w warunkach chłodu, w liściach tej linii kukurydzy

zanotowałam wyraźne zmniejszenie gęstości znakowania w błonach komórkowych tych elementów sitowych.

Grubościenne rurki sitowe powszechnie występują w wiązках przewodzących roślin jednoliściennych, charakteryzuje je gruba warstwa ściany komórkowej oraz brak komórek towarzyszących (Evert i in., 1978, Botha i in., 2005). Zgodnie z hipotezą Botha (2013), grubościenne rurki sitowe wspomagają transport cukrów w roślinie, tj. biorą udział w „odzyskiwaniu” asymilatów z ksylemu oraz utrzymują równowagę w stężeniu cukrów między sąsiednimi wiązками przewodzącymi, zapewniając bardziej wydajny transport długodystansowy w roślinach jednoliściennych.

Na podstawie uzyskanych wyników w pracy (P1) zostały sformułowany wniosek: chłód umiarkowany, czyli temperatury w zakresie 12-14 °C, reguluje potencjał wodny komórek linii kukurydzy wrażliwej na niską temperaturę, poprzez redukcję zawartości jednej z form akwaporyn – PIP2;3 w elementach sitowych wiązki przewodzącej. Ponadto, w pracy wskazano, że grubościenne rurki sitowe mogą pełnić ważną funkcję w buforowaniu stężenia cukrów między różnymi wiązками przewodzącymi a akwaporyna PIP2;3 może być kluczowym elementem w tej regulacji.

**W pracy (P1) mój wkład polegał na: zaprojektowaniu doświadczenia, prowadzeniu wzrostu roślin i pobieraniu materiału do badań, opracowaniu optymalizacji metodyki przygotowania materiału do mikroskopii elektronowej oraz optymalizacji procedury dla immunolokalizacji akwaporyn z zastosowaniem metody immunozłotowej (*Immunogold*), przeprowadzeniu doświadczeń dotyczących analizy potencjału wodnego, wykonaniu immunolokalizacji 3 form akwaporyn, przeprowadzeniu obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz wykonaniu analizy ilościowej ziaren złota koloidalnego w błonach komórkowych wizualizujących miejsca wiązania z epitopem, współudziale w interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu i rewizji manuskryptu, kierowaniu projektem badawczym (II.5.7 Załącznik 4), w ramach, którego powstała publikacja.**

W kolejnych pracach (P2-P4), do badań włączyłam drugi gatunek rośliny C<sub>4</sub>, miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x giganteus*). Jest to gatunek blisko spokrewniony z kukurydzą, posiadający ten sam podtyp fotosyntezy C<sub>4</sub> (NADP-ME). W badaniach porównawczych reakcji na chłód, miskant olbrzymi stanowi swego rodzaju „wzorzec chłodotolerancji” dla kukurydzy, która wśród roślin C<sub>4</sub> jest powszechnie uważana za gatunek wrażliwy na niską temperaturę. Podobne podejście zastosowano w badaniach innych autorów dotyczących



analizy aktywności fotosyntetycznej w liściach obu gatunków roślin  $C_4$  (Naidu i Long, 2004, Wang i in., 2008a). Ze względu na obserwowane w pracy (P1) zmiany potencjału wodnego komórek liści chłodzonych roślin kukurydzy wrażliwej i związane z tym zmiany turgoru można oczekiwać występowania ścisłej biomechanicznej interakcji między wewnętrznym ciśnieniem hydrostatycznym komórki a ścianą komórkową (Braidwood i in., 2014). Stąd, w kolejnych pracach (P2-P4), chciałam zbadać właściwości biochemiczne oraz biomechaniczne ściany komórkowej w warunkach niskiej temperatury oraz zidentyfikować potencjalne współzależności analizowanych cech z podatnością badanych gatunków na stres chłodu. Słuszność przyjętych założeń wydaje się być uzasadniona, ze względu na liczne badania wskazujące na znaczącą rolę ściany komórkowej w adaptacji roślin do warunków niskiej temperatury, głównie w zakresie modyfikacji zawartości polisacharydów, związków fenolowych oraz białek strukturalnych (Zabotin i in., 1998, Kubacka-Zębalska i Kacperska, 1999, Solecka i in., 2008), jak również zmian w ekspresji genów związanych ze ścianą komórkową (Sobkowiak i in., 2014).

**Celem badań w pracy (P2) była weryfikacja hipotezy, która zakładała, że zróżnicowana reakcja na chłód miskanta olbrzymiego i kukurydzy jest wynikiem odmiennej aktywności fotosyntetycznej związanej ze zmianami anatomii liści oraz modyfikacjami właściwości biochemicznych ściany komórkowej.**

W tym celu, wykonano pomiary wymiany gazowej oraz parametrów fluorescencji chlorofilu w ciemności i przy zachowanym oświetleniu aktywnym, analizę budowy anatomicznej liścia z wykorzystaniem obrazów z mikroskopu świetlnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz analizę właściwości biochemicznych ściany komórkowej w zakresie: zawartości krystalicznej celulozy, cukrów prostych, kwasów uronowych,  $\beta$ -glukanu oraz związków fenolowych.

W pracach P2 i P3 badania prowadzono z użyciem 1 genotypu miskanta olbrzymiego oraz dwóch linii wsobnych kukurydzy (typ dent): linii chłodotolerancyjnej (S68911) oraz linii chłodowrażliwej (B73). Obie linie reprezentują pulę *Stiff Stalk Synthetic/Iodent* i są scharakteryzowane pod kątem wrażliwości/tolerancji na chłód w badaniach transkryptomicznych (Revilla i in., 2016, Sobkowiak i in., 2016).

W pracy P2, w liściach linii kukurydzy wrażliwej na chłód, obserwowałam silne obniżenie tempa asymilacji z wartości  $20 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (w roślinach kontrolnych – niechłodzonych) do wartości  $12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (w roślinach chłodzonych przez 28 godz.). W liściach tej linii kukurydzy, chłód powodował także obniżenie innych

parametrów fotosyntetycznych takich jak: rzeczywista wydajność kwantową PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), przewodność liścia dla  $\text{H}_2\text{O}$  ( $g_s$ ), intensywność transpiracji, maksymalna wydajność PSII w ciemności ( $F_v/F_m$ ) i na świetle ( $F'_v/F'_m$ ) oraz tempo transportu elektronów ETR na świetle. Zmianom w parametrach fotosyntetycznych towarzyszyły modyfikacje w anatomii liści linii kukurydzy wrażliwej na chłód, w kierunku zmniejszenia grubości liścia prawdopodobnie spowodowanym „zapadaniem się” komórek mezofilowych. Stres chłodu oraz towarzyszące jemu, wtórny deficyt wodny i plazmoliza komórkowa mogą wpływać na kształt i wielkość komórek, a rozwój komórek może być zahamowany poprzez obniżenie aktywności  $\text{H}^+$ -ATPazy w błonie komórkowej i w rezultacie zmniejszenie rozciągliwości ściany komórkowej (Bogoslavsky i Neumann, 1998).

W przypadku innych parametrów anatomicznych, tj.:  $S_m$  (*the mesophyll surface area associated with intercellular airspaces*) i  $S_b$  (*bundle sheath surface area*), w warunkach niskiej temperatury, obserwowałam obniżenie wartości  $S_m$  w liściach linii kukurydzy wrażliwej na chłód oraz zwiększenie wartości  $S_b$  w liściach miskanta olbrzymiego i linii tolerancyjnej. Obniżona wartość  $S_m$  była skorelowana z niższą wydajnością asymilacji w linii wrażliwej, spowodowanej prawdopodobnie przez mniejszą dostępność gazów  $\text{HCO}_3^-$  dla enzymów fotosyntetycznych (Ma i in., 2017). Z kolei, wzrost parametru  $S_b$  pod wpływem chłodu w liściach miskanta olbrzymiego oraz linii kukurydzy tolerancyjnej może być związany ze zdolnością do utrzymania wysokiego tempa fotosyntezy w warunkach stresu niskiej temperatury. Podobnie, w innych pracach obserwowano wyższą wartość  $S_b$  w liściach młodych siewek kukurydzy w porównaniu ze starszymi roślinami, co korelowało z wydajniejszą fotosyntezą u młodych roślin (Retta i in., 2016).

Ponadto, w liściach roślin kontrolnych (niechłodzonych) miskanta olbrzymiego obserwowałam większą grubość ściany komórkowej mezofilu i pochwy okołowiązkowej w porównaniu z roślinami obydwóch linii kukurydzy. Cecha ta może pomóc w utrzymaniu odpowiednich właściwości mechanicznych liści, które osiągają u miskanta olbrzymiego większe rozmiary niż u kukurydzy. W warunkach niskiej temperatury (3 dni traktowania chłodem) obserwowałam w liściach miskanta olbrzymiego znaczny wzrost grubości ściany komórkowej w komórkach pochwy okołowiązkowej, jak również w obu typach komórek w liściach linii wrażliwej. Zjawisko to może być częściowo wyjaśnione, tym, że w warunkach stresu może występować reorganizacja mikrofibryli celulozowych oraz synteza nowego materiału ściany komórkowej (Cosgrove, 2005).

Analiza komponentów ściany komórkowej wykazała obniżenie zawartości glukuronoarabinoksyłanu (GAX) w liściach obydwóch linii kukurydzy traktowanych niską

temperaturą. GAX jest głównym niecelulozowym polisacharydem pierwotnej (20-40%) i wtórnej (40-50%) ściany komórkowej traw (Scheller i Ulvskov, 2010), przypuszczalnie pełniącym funkcję we wzmacnianiu tkanek roślinnych (Pauly i in., 2013). Stąd obserwowana zmiana może sugerować modyfikacje we właściwościach biomechanicznych ściany komórkowej w chłodzonych roślinach kukurydzy.

W liściach chłodzonych roślin miskanta olbrzymiego obserwowałam wzrost zawartości kwasów uronowych, natomiast w przypadku kukurydzy tendencja była odwrotna, chłód powodował obniżenie zawartości kwasów uronowych w ścianie komórkowej tego gatunku. Jest to interesujący wynik, który może sugerować podobieństwo w mechanizmie odpowiedzi na chłód w liściach miskanta olbrzymiego do reakcji roślin dwuliściennych występującej w procesach aklimatyzacji do chłodu (Solecka i in., 2008).

W pracy (P2), odnotowałam również, że zawartość  $\beta$ -glukanu uległa zwiększeniu pod wpływem chłodu w ścianie komórkowej w liściach miskanta olbrzymiego i kukurydzy linii tolerancyjnej, natomiast w liściach linii wrażliwej obserwowałam znaczne zmniejszenie zawartości tego polisacharydu. Przyjmuje się, że zawartość  $\beta$ -glukanu jest wyższa w ścianach komórkowych komórek będących w fazie wzrostu (Domon i in., 2013), stąd można przypuszczać, że obniżenie zawartości  $\beta$ -glukanu w linii wrażliwej może być związane z zaburzonym wzrostem komórek w niskich temperaturach, spowodowanym silnym zahamowaniem fotosyntezy u tej linii. Natomiast, w liściach miskanta olbrzymiego i kukurydzy linii tolerancyjnej, gdzie chłód nie powodował zahamowania fotosyntezy, można spodziewać się kontynuacji wzrostu i rozwoju komórek w tkance liściowej.

Ponadto, obserwowałam wzrost zawartości związków fenolowych w ścianie komórkowej chłodzonych roślin kukurydzy linii tolerancyjnej, co może odzwierciedlać zdolność tej linii do aktywacji mechanizmów obronnych w niskich temperaturach. Zjawisko to można porównać do zmian metabolizmu związków fenolowych w ścianie komórkowej korzeni kukurydzy zachodzących w warunkach niedoboru wody w celu aklimatyzacji do suchego środowiska (Fan i in., 2006).

Podsumowując, w pracy (P2) wykazaliśmy, że zróżnicowana aktywność fotosyntetyczna w liściach chłodzonych roślin kukurydzy i miskanta olbrzymiego była związana z modyfikacjami właściwości biochemicznych ściany komórkowej, głównie w zakresie zmian w zawartości kwasów uronowych,  $\beta$ -glukanu oraz związków fenolowych. Wyraźne obniżenie tempa asymilacji w liściach chłodzonych roślin linii kukurydzy wrażliwej na niską temperaturę mogło być spowodowane uszkodzeniami

strukturalnymi w warstwie komórek mezofilu, które nie były obserwowane dla kukurydzy linii tolerancyjnej i miskanta olbrzymiego.

**W pracy (P2) mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu wzrostu roślin i pobieraniu materiału do badań, wykonaniu pomiarów wymiany gazowej oraz parametrów fluorescencji chlorofilu w ciemności i na świetle, przygotowaniu materiału do mikroskopii świetlnej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), przeprowadzeniu obserwacji mikroskopowych oraz wykonaniu dokumentacji fotograficznej, wykonaniu pomiarów parametrów anatomicznych, przygotowaniu materiału do oznaczenia cukrów prostych i przeprowadzeniu eksperymentów związanych z analizą kwasów uronowych, współudziale w interpretacji wyników i w przygotowaniu oraz rewizji manuskryptu, kierowaniu projektem badawczym (II.5.5 Załącznik 4) w ramach, którego powstała publikacja.**

W kolejnej pracy (P3) wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego skupiłam się na analizie głównych enzymów metabolizmu cukrów u roślin: syntazy fosforanu sacharozy (SPS), enzymu który dostarcza substraty do produkcji sacharozy oraz syntazy sacharozy, który dostarcza substratów do produkcji skrobi i celulozy. Wpływ niskiej temperatury na aktywność SPS i SUS oraz na zawartość potencjalnych produktów był analizowany w różnych podejściach badawczych, głównie u roślin C<sub>3</sub> (Sage i Kubien, 2007), gdzie najczęściej obserwowano wzrost zawartości sacharozy w tkankach roślin traktowanych niską temperaturą (Savitch i in., 2000). Wyniki otrzymane w pracy (P2) dotyczące zmian w procesie fotosyntezy (i przypuszczalnie w zawartości metabolitów fotosyntetycznych) oraz w poziomie cukrów ściany komórkowej mogły wskazywać na kluczową rolę SPS i SUS w reakcji badanych roślin C<sub>4</sub> na chłód.

**Celem badań w pracy (P3) była weryfikacja hipotezy zakładająca, że niska temperatura powoduje zmiany w zawartości i/lub lokalizacji głównych enzymów metabolizmu cukrów u roślin: syntazy fosforanu sacharozy (SPS) i syntazy sacharozy (SUS), a także modyfikacje zawartości ich potencjalnych produktów, tj. sacharozy, celulozy i skrobi w liściach kukurydzy i miskanta olbrzymiego.**

W pracy (P3) wykazaliśmy wyższą zawartość SPS w liściach chłodzonych roślin kukurydzy linii wrażliwej oraz większe znakowanie dla przeciwciała anti-SPS w cytoplazmie komórkowej komórek mezofilu w liściach tej linii. Jednocześnie, analiza zawartości sacharozy (techniką chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, GC-FID), wykazała wzrost zawartości tego cukru w warunkach chłodu w liściach linii wrażliwej. Podobnie, w innej pracy naszej grupy, obserwowaliśmy wzrost

zawartości sacharozy w liściach linii chłodowrażliwej (CM109) oraz zmiany potencjału osmotycznego (Bilska-Kos i in., 2017). Akumulacja sacharozy może wystąpić na skutek zahamowania transportu produktów fotosyntezy spowodowanym zamykaniem plazmodesm na szlaku fotosyntetycznym (Bilska i Sowiński, 2010). Z drugiej strony część puli sacharozy (zsyntetyzowanej z udziałem SPS) może być wykorzystana do produkcji celulozy i skrobi katalizowanej przez SUS (Im, 2004). To może częściowo tłumaczyć wysoką zawartość SPS w liściach chłodzonych roślin miskanta olbrzymiego przy niezmienionym poziomie sacharozy. Jednocześnie, nie zanotowaliśmy zmian spowodowanych chłodem w zawartości drugiego badanego enzymu, SUS. Obserwowałam jedynie wyraźne zwiększenie znakowania dla przeciwciała specyficznego dla SUS w ścianie komórkowej na styku mezofil – pochwa okołowiązkowa w liściach miskanta olbrzymiego, co może świadczyć o „lokalnej” wyższej aktywności tego enzymu. Za tą hipotezą przemawia zwiększenie grubości ściany komórkowej pochwy okołowiązkowej w liściach miskanta olbrzymiego w warunkach niskiej temperatury obserwowane w pracy (P2).

Przy użyciu spektroskopii w podczerwieni FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*) wykazaliśmy nieznaczne przesunięcie widma w kierunku niższych wartości przy długości fali ok.  $670\text{ cm}^{-1}$ , przypisywane celulozie (Kondo i Sawatari, 1996, Abidi i in., 2014), w liściach chłodzonych roślin kukurydzy linii tolerancyjnej. Ta obserwacja może wskazywać na rozpoczęcie procesu tworzenia się bardziej zwartej (krystalicznej) struktury celulozy w ścianie komórkowej tej linii.

Z kolei zwiększona intensywność znakowania dla SUS w rurkach sitowych w liściach chłodzonych roślin kukurydzy linii wrażliwej może być wynikiem zahamowania załadowania floemu stwierdzonego wcześniej w innej linii wrażliwej na chłód (Bilska i Sowiński, 2010) i tym samym odgrywać znikomą rolę w procesach syntezy składników ściany komórkowej.

Oprócz roli SUS w syntezie celulozy, enzym ten uczestniczy w dostarczaniu substratów do produkcji skrobi. W stresie niskiej temperatury obserwuje się głównie wzrost zawartości skrobi, a mechanizm tej reakcji może być związany z zahamowaniem procesów transportowych, w tym załadowania floemu i transportu długodystansowego (Gamalei i in., 1994, Čiamporová i Trgiňová, 1996, Bilska i Sowiński, 2010). Skrobia gromadzi się głównie w chloroplastach, a w efekcie nadmiernej akumulacji może wpływać na strukturę tych organelli, np. poprzez zmiany w rozmieszczeniu tylakoidów czy w układzie gran lub/i liczbie plastoglobuli (Čiamporová i Trgiňová, 1996, Kutik i in.,

2004). W pracy (P3) obserwowałam wyraźny wzrost całkowitej powierzchni ziaren skrobi w chloroplastach obu typów komórek: mezofilu i pochwy okołowiązkowej w liściach chłodzonych roślin kukurydzy linii wrażliwej, co wiązało się z uszkodzeniami struktury chloroplastów (ziarna skrobi „rozpychały” od wewnątrz chloroplasty). Można zatem przypuszczać, że opisywane powyżej zmiany w strukturze chloroplastów prowadziły do uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego skutkującego zahamowaniem fotosyntezy, co zostało stwierdzone dla tej linii kukurydzy w pracy (P2). Natomiast, w przypadku linii chłodotolerancyjnej obserwowałam niewielki wzrost całkowitej powierzchni ziaren skrobi w chloroplastach komórek mezofilu, który nie miał istotnego wpływu na strukturę tych organelli. Zjawisko to może być przejawem zdolności adaptacyjnych tej linii kukurydzy do warunków stresowych, polegającym na gromadzeniu skrobi jako substancji magazynującej energię w komórkach.

Podsumowując, w pracy (P3) wykazaliśmy wyższą zawartość SPS w liściach chłodzonych roślin miskanta olbrzymiego oraz kukurydzy linii wrażliwej w porównaniu do roślin kontrolnych (niechłodzonych). Zjawisko to może być związane z różnymi ścieżkami adaptacji do niskiej temperatury obu badanych gatunków roślin C<sub>4</sub>. W przypadku kukurydzy linii wrażliwej, wyższy poziom SPS skutkujący wzrostem poziomu sacharozy oraz powierzchni ziaren skrobi w chloroplastach może wskazywać na zaburzenia w ogólnym metabolizmie cukrów, co z kolei może tłumaczyć obniżenie aktywności fotosyntetycznej stwierdzone w liściach tej linii kukurydzy w pracy (P2). Natomiast, w liściach chłodzonych roślin miskanta olbrzymiego wyższa zawartość SPS mogła prowadzić do zwiększonej podaży sacharozy wykorzystywanej przez SUS do syntezy materiału ściany komórkowej. Zmiany te mogą być związane z miejscową przebudową celulozy, za czym przemawia wzrost intensywności znakowania SUS w ścianie komórkowej między mezofilem a komórkami pochwy okołowiązkowej w liściach miskanta olbrzymiego traktowanych niską temperaturą.

**W pracy (P3) mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu wzrostu roślin i pobieraniu materiału do badań, przygotowaniu materiału do mikroskopii elektronowej, wykonaniu immunolokalizacji enzymów (metoda immunozłotowa) z wykorzystaniem przeciwciał I-rzędowych specyficznych dla syntazy fosforanu sacharozy (SPS) i syntazy sacharozy (SUS), przeprowadzeniu obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz wykonaniu dokumentacji fotograficznej, przygotowaniu materiału do analizy FTIR i współdziałanie w przeprowadzaniu eksperymentów FTIR**

**współdziałale w interpretacji wyników i w przygotowaniu oraz rewizji manuskryptu, kierowaniu projektem badawczym (II.5.5 Załącznik 4) w ramach, którego powstała publikacja.**

W celu sprawdzenia czy występuje zróżnicowanie w poziomie tolerancji na chłód u uprawianych w Polsce genotypów miskanta olbrzymiego, w kolejnej pracy (P4) analizowałam reakcję na chłód 3 form miskanta olbrzymiego pochodzących z 3 lokalizacji pod kątem wybranych cech fizjologicznych oraz roli ściany komórkowej i kanałów transportowych (plazmodesm) w tej reakcji. Przyjmuje się, że miskant olbrzymi, naturalny mieszaniec *M. sinensis* i *M. sacchariflorus*, przywieziony z Azji i uprawiany na dużą skalę w Europie, wywodzi się z tej samej puli genetycznej (odmiana „Hornum”) z Danii (Cichorz i in., 2014). Badania molekularne wykazały istnienie kilku genotypów miskanta olbrzymiego w Europie (Greef i in., 1997), niemniej jednak reprezentowały one wysokie podobieństwo genetyczne (Clifton-Brown i in., 2001, Farrell i in., 2006). Stąd, w pracy (P4) można było oczekiwać podobnego wzorca odpowiedzi na chłód wśród badanych genotypów miskanta, chociaż ewentualne różnice w tej reakcji mogą być związane ze zmianami epigenetycznymi lub zdolnością do adaptacji do lokalnych warunków środowiskowych.

**Celem badań w pracy (P4) była weryfikacja hipotezy zakładająca, że zróżnicowana reakcja fizjologiczna na chłód wśród 3 badanych genotypów miskanta olbrzymiego wiąże się ze zmianami właściwości biomechanicznych i biochemicznych ściany komórkowej, a także z modyfikacjami ultrastruktury kanałów transportowych (plazmodesm), łączących komórki na szlaku fotosyntetycznym.**

W badaniach zastosowałam chłód umiarkowany z temp. niższymi niż w poprzednich pracach (P1-P3), tj. w zakresie: 10 – 12°C. Kłaczka miskanta olbrzymiego pochodziły z plantacji zlokalizowanych w trzech rejonach Polski: M1 – Bydgoszcz (53°17'N, 18°04'E), M2 – Radzików, (52°21'N, 20°64' E) oraz M3 – Majdan Sieniawski (50°29'N, 22°72'E). Wybrane lokalizacje różniły się wartościami minimalnych i maksymalnych temperatur (średnie z danego miesiąca).

W pierwszym etapie badań, z wykorzystaniem markerów ISSR wykazaliśmy wysokie podobieństwo genetyczne dla wszystkich trzech form miskanta olbrzymiego (M1, M2 i M3). W liściach roślin 3 formy miskanta olbrzymiego (M3) obserwowałam obniżenie tempa asymilacji CO<sub>2</sub>, z wartości ok. 20 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (rośliny kontrolne) do ok. 16 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (rośliny chłodzone przez 3 i 5 dni) oraz rzeczywistej wydajności

kwantowej PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) i maksymalnej wydajności PSII w ciemności ( $F_v/F_m$ ) – dla roślin chłodzonych przez 5 dni. Takich zmian nie zaobserwowano w pracy (P2), gdzie użyto ten sam genotyp (M3) dla badań porównawczych reakcji na chłód roślin miskanta olbrzymiego i kukurydzy, prawdopodobnie z powodu zastosowania wyższej temperatury, w zakresie: 12-14 °C. Utrzymanie wysokiej aktywności fotosyntetycznej w warunkach chłodu, obserwowane dla genotypów: M1 i M2, może być wynikiem mechanizmów adaptacyjnych nabytych w tych genotypach podczas wzrostu w warunkach polowych, w tych dwóch lokalizacjach w stosunkowo niskich temperaturach, w których mogą być zaangażowane geny związane z odpowiedzią na chłód kontrolowane przez powtarzające się wzorce metylacji DNA. Możliwość dziedziczenia wzorca metylacji może częściowo wyjaśniać mechanizmy adaptacji do niskich temperatur (Zhu i in., 2007, Orłowska i in., 2016), a relatywnie szybka reakcja na chłód na poziomie epigenetycznym została wykryta dla wielu gatunków roślin, w tym kukurydzy (Shan i in., 2013, Park i in., 2018, Guo i in., 2019). Mechanizmy te można wiązać z wysoką aktywnością kluczowych enzymów odpowiedzialnych za wiązanie CO<sub>2</sub>, tj. dikinazy pirogronianowo-ortofosforanowej (PPDK) oraz Rubisco (Naidu i in., 2003, Wang i in., 2008a, Wang i in., 2008b) i/lub unikaniem fotouszkodzeń poprzez aktywację alternatywnych szlaków neutralizacji nadmiaru zaabsorbowanej energii wzbudzenia (Farage i in., 2006).

W liściach roślin genotypu M3, chłód powodował modyfikacje ultrastruktury kanałów transportowych, plazmodesm – na obrazach pochodzących z mikroskopu elektronowego obserwowałam wyraźne zwężenie rękawa cytoplazmatycznego w centralnej części plazmodesmy, pomiędzy komórkami mezofilu i pochwy okołowiązkowej. Analiza ilościowa powierzchni plazmodesm potwierdziła obserwacje mikroskopowe – średnia powierzchnia plazmodesm na tym styku komórkowym była mniejsza w porównaniu z wartością otrzymaną dla tego parametru w liściach roślin kontrolnych (niechłodzonych) genotypu M3. W roślinach C<sub>4</sub> plazmodesmy mają szczególne znaczenie, ponieważ ich przepuszczalność warunkuje sprawny transport asymilatów pomiędzy różnymi typami komórek aktywnych fotosyntetycznie występujących w liściach tej grupy roślin (anatomia typu Kranz). Jak wykazano wcześniej, transfer węgla pomiędzy cyklami C<sub>4</sub> i C<sub>3</sub> jest spowolniony w niskich temperaturach (Long, 1983), a zmiany kinetyki transportu produktów fotosyntezy mogą skutkować nadmierną akumulacją sacharozy i/lub skrobi (Sowiński i in., 1999), prowadząc do ogólnych zaburzeń gospodarki cukrowej, co zostało stwierdzone w pracy (P3). Ultrastrukturalne modyfikacje plazmodesm, podobne do obserwowanych w genotypie M3, stwierdzono we wcześniejszych badaniach naszej grupy,



w liściach linii kukurydzy wrażliwej na chłód, w innym typie plazmodesmy między pochwą okołowiązkową a komórkami parenchymy wiązkowej (Bilska i Sowiński, 2010). W pracy tej odnotowano również silne zahamowanie fotosyntezy w tej linii kukurydzy i wskazano białko – kalretikulinę, jako czynnik regulujący przepuszczalność plazmodesmy ze względu na rolę tego białka w buforowaniu wapnia w komórkach roślinnych (Baluška i in., 1999). W pracy (P4) można zatem przypuszczać, że zwężenie plazmodesm w liściach roślin genotypu M3 i tym samym zmiany w przepuszczalności kanałów transportowych może być odpowiedzialne za zahamowanie tempa asymilacji CO<sub>2</sub> w tym genotypie miskanta olbrzymiego.

Z analizy właściwości biomechanicznych liści badanych genotypów miskanta olbrzymiego wynika, że genotyp M3 posiadał większą sztywność ściany komórkowej w warunkach niskiej temperatury. Biorąc pod uwagę fakt, że badania z wykorzystaniem FTIR nie dostarczyły dowodów na istotną modyfikację składu chemicznego ściany komórkowej w liściach chłodzonych roślin genotypu M3, a analizy mikroskopowe grubości ściany komórkowej przeprowadzone w pracy (P2) potwierdziły zwiększenie wartości dla tego parametru anatomicznego w genotypie M3 – można przypuszczać, że za wzrost sztywności liści jest przede wszystkim odpowiedzialna zwiększona ilość materiału ścianowego w liściach tego genotypu. Takie „wzmocnienie” liści może wpływać na asymilację CO<sub>2</sub> i przewodnictwo gazów w warstwie komórek mezofilu, a tym samym na szybkość wymiany gazowej między liściem a środowiskiem (Terashima i in., 2011). Dodatkowo, zmiana właściwości ściany komórkowej w kierunku większej sztywności może bezpośrednio wpływać na ultrastrukturę plazmodesm i przypuszczalnie „ograniczać” powierzchnię kanału transportowego. Opisane uwarunkowania mogą wyjaśniać zahamowanie fotosyntezy wraz z towarzyszącymi zmianami w ultrastrukturze plazmodesm obserwowane w liściach chłodzonych roślin genotypu M3.

Podsumowując, w pracy (P4) wykazaliśmy, że pomimo wysokiego podobieństwa genetycznego obserwowanego dla 3 badanych genotypów miskanta olbrzymiego, występuje zróżnicowanie w poziomie tolerancji na chłód tych genotypów. Obserwacja ta, mogła być związana ze zdolnością do aklimatyzacji do niskich temperatur nabytą w trakcie wzrostu w warunkach polowych w 3 lokalizacjach z różnymi warunkami temperaturowymi (różne wartości temperatury minimalnej). Obserwowane zmiany w ultrastrukturze kanałów transportowych, polegające na zwężeniu rękawa cytoplazmatycznego plazmodesm na styku: mezofil/pochwa okołowiązkowa mogły być przyczyną obniżenia aktywności fotosyntetycznej w liściach chłodzonych roślin genotypu M3. Dodatkowo, zmiany

właściwości biomechanicznych ściany komórkowej (w kierunku zwiększenia plastyczności) specyficzne dla genotypów M1 i M2, które zachowały wysoką aktywność fotosyntetyczną w warunkach niskiej temperatury, mogą być ważnym elementem w procesach aklimatyzacji do chłodu miskanta olbrzymiego.

**W pracy (P4) mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu wzrostu roślin i pobieraniu materiału do badań, wykonaniu pomiarów wymiany gazowej oraz parametrów fluorescencji chlorofilu w ciemności i na świetle, przygotowaniu materiału do mikroskopii elektronowej, przeprowadzeniu obserwacji mikroskopowych z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz wykonaniu dokumentacji fotograficznej, wykonaniu analizy ultrastruktury plazmodesm, przygotowaniu materiału do analizy FTIR oraz do testów biomechanicznych, współdziałanie w przeprowadzaniu eksperymentów z wykorzystaniem FTIR i aparatu typu INSTRON (testy biomechaniczne), współdziałanie w interpretacji wyników i w przygotowaniu oraz rewizji manuskryptu, kierowaniu projektem badawczym (II.5.5 Załącznik 4) w ramach, którego powstała publikacja.**

### **Podsumowanie**

Cztery publikacje (P1-P4) wchodzące w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym obejmują wyniki badań reakcji na stres chłodu u dwóch spokrewnionych gatunków roślin C<sub>4</sub>: kukurydzy (*Zea mays* L.) i miskanta olbrzymiego (*Miscanthus* × *giganteus*) pod względem wybranych cech fizjologicznych, biochemicznych, biomechanicznych oraz ultrastrukturalnych. Za szczególne osiągnięcia naukowe w cyklu prac (P1-P4) uważam:

- wykazanie, że chłód umiarkowany w zakresie temp.: 12-14 °C wpływa na balans wodny komórek linii kukurydzy wrażliwej na niską temperaturę (poprzez wyraźne obniżenie potencjału wodnego w komórkach tej linii), czemu towarzyszą zmiany w zawartości białek transportujących wodę – akwaporyn,
- przypisanie grubościennym rurkom sitowym potencjalnej roli w buforowaniu stężenia cukrów między różnymi wiązkami przewodzącymi i akwaporynie PIP2;3, jako kluczowego elementu w tej regulacji,
- wykazanie, że zróżnicowana aktywność fotosyntetyczna w warunkach niskiej temperatury u kukurydzy i miskanta olbrzymiego jest związana z reorganizacją

budowy anatomicznej oraz z modyfikacjami właściwości biochemicznych ściany komórkowej,

- zaproponowanie, że zmiany w metabolizmie cukrów w liściach kukurydzy i miskanta olbrzymiego w chłodzie są prawdopodobnie związane z różnymi ścieżkami adaptacji do warunków stresu i determinują poziom wrażliwości/tolerancji obu gatunków roślin na niską temperaturę,
- wykazanie zróżnicowania w poziomie tolerancji na chłód badanych genotypów miskanta olbrzymiego,
- wykazanie zmian we właściwościach biomechanicznych liści jednego genotypu miskanta olbrzymiego (M3), które mogą mieć wpływ na przewodnictwo gazów w komórkach mezofilu i tym samym sprawność wymiany gazowej pomiędzy liściem a środowiskiem,
- zaproponowanie mechanizmu reakcji na chłód w liściach jednego genotypu miskanta olbrzymiego, w którym zmiany w ultrastrukturze plazmodesm (zwężenie kanałów) mogą skutkować zahamowaniem transportu metabolitów fotosyntetycznych oraz obniżeniem tempa fotosyntezy.

Rezultaty badań przedstawione w pracach (P1-P4) mają znaczenie poznawcze i praktyczne. Z jednej strony, przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów tolerancji/wrażliwości na chłód badanych gatunków roślin  $C_4$ . Z drugiej strony, wiedza ta może być przydatna do tworzenia nowych odmian kukurydzy charakteryzujących się lepszą tolerancją na niską temperaturę oraz dla rolników przy selekcji materiału nasadzeniowego do zakładania plantacji miskanta olbrzymiego.

### Literatura

1. Abidi N, Cabrales L, Haigler CH. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym.* 100 (2014), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.074>.
2. Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.* 137 (2005), 341-53. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051045>.
3. Aroca R, Vernieri P, Irigoyen JJ, Sánchez D, Manuel, Tognoni F, Pardossi A. Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science.* 165 (2003), 671-79. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00257-7).
4. Baluška F, Šamaj J, Napier R, Volkmann D. Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J.* 19 (1999), 481-88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00530.x>

5. Bennett K, Mcpherson H, Warrington I. Effect of pretreatment temperature on response of photosynthesis rate in maize to current temperature. *Funct Plant Biol.* 9 (1982), 773-81. <https://doi.org/10.1071/PP9820773>.
6. Bilaska-Kos A, Solecka D, Dziewulska A, Ochodzki P, Jończyk M, Bilski H, i in. Low temperature caused modifications in the arrangement of cell wall pectins due to changes of osmotic potential of cells of maize leaves (*Zea mays* L.). *Protoplasma.* 254 (2017), 713-24. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0982-y>.
7. Bilaska A, Sowiński P. Closure of plasmodesmata in maize (*Zea mays*) at low temperature: a new mechanism for inhibition of photosynthesis. *Ann Bot.* 106 (2010), 675-86. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq169>.
8. Bogoslavsky L, Neumann PM. Rapid regulation by acid pH of cell wall adjustment and leaf growth in maize plants responding to reversal of water stress. *Plant Physiol.* 118 (1998), 701-09. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.701>.
9. Botha CEJ, Cross RHM, Liu L. Comparative structure of specialised monocotyledonous leaf blade plasmodesmata. In: Oparka KJ (ed). *Plasmodesmata*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, (2005), 73-89.
10. Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytol.* 201 (2014), 388-402. <https://doi.org/10.1111/nph.12473>.
11. Čiamporová M, Trgiňová I. Ultrastructure of chloroplasts in leaves and of plastids in root tips of two maize lines differing in chilling tolerance. *Biologia.* 51 (1996), 441-47.
12. Cichorz S, Goška M, Litwiniec A. *Miscanthus*: Genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers. *Mol Biotechnol.* 56 (2014), 911-24. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9770-0>.
13. Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Andersson B, Basch G, Christian DG, Kjeldsen JB, i in. Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. *Agron J.* 93 (2001), 1013-19. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351013x>.
14. Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6 (2005), 850-61. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>.
15. Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME. Sensitivity of photosynthesis in a C<sub>4</sub> plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol.* 129 (2002), 1773-80. <https://doi.org/10.1104/pp.002170>.
16. Dohleman FG, Long SP. More productive than maize in the midwest: how does *Miscanthus* do it? *Plant Physiol.* 150 (2009), 2104-15. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139162>.
17. Domon JM, Baldwin L, Acket S, Caudeville E, Arnoult S, Zub H, i in. Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry.* 85 (2013), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.09.001>.
18. Evert RF, Eschrich W, Heyser W. Leaf structure in relation to solute transport and phloem loading in *Zea mays* L. *Planta.* 138 (1978), 279-94. [10.1007/BF00386823](https://doi.org/10.1007/BF00386823).
19. Fan L, Linker R, Gepstein S, Tanimoto E, Yamamoto R, Neumann PM. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol.* 140 (2006), 603-12. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073130>.
20. Farage PK, Blowers D, Long SP, Baker NR. Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of two chilling-tolerant C<sub>4</sub> species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus × giganteus*. *Plant Cell Environ.* 29 (2006), 720-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01460.x>.
21. Farrell AD, Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Jones MB. Genotypic variation in cold tolerance influences the yield of *Miscanthus*. *Ann Appl Biol.* 149 (2006), 337-45. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00099.x>.
22. Fonteyne S, Muylle H, Lootens P, Kerchev P, Van den Ende W, Staelens A, i in. Physiological basis of chilling tolerance and early-season growth in miscanthus. *Ann Bot.* 121 (2018), 281-95. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx159>.
23. Fryer MJ, Oxborough K, Martin B, Ort DR, Baker NR. Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiology.* 108 (1995), 761-67. <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.761>.

24. Gamalei YV, van Bel AJE, Pakhomova MV, Sjutkina AV. Effects of temperature on the conformation of the endoplasmic reticulum and on starch accumulation in leaves with the symplasmic minor-vein configuration. *Planta*. 194 (1994), 443-53. <https://doi.org/10.1007/BF00714455>.
25. Głowacka K, Adhikari S, Peng J, Gifford J, Juvik JA, Long SP, i in. Variation in chilling tolerance for photosynthesis and leaf extension growth among genotypes related to the C<sub>4</sub> grass *Miscanthus* × *giganteus*. *J Exp Bot*. 65 (2014), 5267-78. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru287>.
26. Greef JM, Deuter M, Jung C, Schondelmaier J. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genet Resour Crop Evol*. 44 (1997), 185-95. <https://doi.org/10.1023/A:1008693214629>.
27. Guo H, Wu T, Li S, He Q, Yang Z, Zhang W, i in. The Methylation Patterns and Transcriptional Responses to Chilling Stress at the Seedling Stage in Rice. *Int J Mol Sci*. 20 (2019), 5089. <https://doi.org/10.3390/ijms20205089>.
28. Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol*. 62 (2006), 305-23. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9022-1>.
29. Holdaway-Clarke TL, Walker NA, Hepler PK, Overall RL. Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta*. 210 (2000), 329-35. <https://doi.org/10.1007/PL00008141>.
30. Im KH. Expression of sucrose-phosphate synthase (SPS) in non-photosynthetic tissues of maize. *Mol Cells*. 17 (2004), 404-9.
31. Janda T, Szalai G, Ducruet JM, Páldi E. Changes in photosynthesis in inbred maize lines with different degrees of chilling tolerance grown at optimum and suboptimum temperatures. *Photosynthetica*. 35 (1998), 205-12. <https://doi.org/10.1023/A:1006954605631>.
32. Janowiak F, Markowski A. Changes in leaf water relations and injuries in maize seedlings induced by different chilling conditions. *J Agron Crop Sci*. 172 (1994), 19-28. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1994.tb00155.x>.
33. Jian L-c, Li J-h, Chen W-P, Li PH, Ahlstrand GG. Cytochemical Localization of Calcium and Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity in Plant Cells under Chilling Stress: a Comparative Study between the Chilling-Sensitive Maize and the Chilling-Insensitive Winter Wheat. *Plant Cell Physiol*. 40 (1999), 1061-71. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029488>.
34. Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta*. 1465 (2000), 324-42. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00147-4).
35. Keeling P, Greaves JA. Effects of temperaure stresses on corn – opportunities for breeding and technology. *Proceedings of the 45th Annual Corn and Sorghum Research Conference*: 29-42(1990).
36. Kjellbom P, Larsson C, Johansson I, Karlsson M, Johanson U. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci*. 4 (1999), 308-14. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01438-7](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01438-7).
37. Kondo T, Sawatari C. A Fourier transform infra-red spectroscopic analysis of the character of hydrogen bonds in amorphous cellulose. *Polymer*. 37 (1996), 393-99. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)82908-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)82908-9).
38. Kubacka-Zębalska M, Kacperska A. Low temperature-induced modifications of cell wall content and polysaccharide composition in leaves of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.). *Plant Sci*. 148 (1999), 59-67. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00122-3).
39. Kutík J, Hola D, Kočová M, Rothová O, Haisel D, Wilhelmová N, i in. Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F1 hybrids grown under moderate chilling stress. *Photosynthetica*. 42 (2004), 447-55. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000046165.15048.a4>.
40. Ma J-Y, Sun W, Koteyeva NK, Voznesenskaya E, Stutz SS, Gandin A, i in. Influence of light and nitrogen on the photosynthetic efficiency in the C<sub>4</sub> plant *Miscanthus* × *giganteus*. *Photosynth Res*. 131 (2017), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0281-7>.

41. Matsumoto T, Lian HL, Su WA, Tanaka D, Liu C, Iwasaki I, i in. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol.* 50 (2009), 216-29. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn190>.
42. Maurel C. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581 (2007), 2227-36. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.021>.
43. Melkonian J, Yu L-X, Setter TL. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *J Exp Bot.* 55 (2004), 1751-60. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh215>.
44. Miedema P. The effects of low temperature on *Zea mays*. *Adv Agron.* 35 (1982), 93-128. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60322-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60322-3).
45. Naidu S, Long S. Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus*: an in vivo analysis. *Planta.* 220 (2004), 145-55. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1322-6>.
46. Naidu SL, Moose SP, AL-Shoaibi AK, Raines CA, Long SP. Cold tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* 132 (2003), 1688-97. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021790>.
47. Orłowska R, Machczyńska J, Oleszczuk S, Zimny J, Bednarek PT. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Res (Thessalon).* 23 (2016), 19. <https://doi.org/10.1186/s40709-016-0056-5>.
48. Park J, Lim CJ, Shen M, Park HJ, Cha J-Y, Iniesto E, i in. Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 115 (2018), E5400-E09. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721241115>.
49. Pastori G, Foyer CH. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129 (2002), 460-68. <https://doi.org/10.1104/pp.011021>.
50. Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, i in. Hemicellulose biosynthesis. *Planta.* 238 (2013), 627-42. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>.
51. Rapacz M. Physiological effects of winter rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) prehardening to frost. II. Growth, energy partitioning and water status during cold acclimation. *J Agron Crop Sci.* 181 (1998), 81-87. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1998.tb00402.x>.
52. Retta M, Yin X, van der Putten PEL, Cantre D, Berghuijs HNC, Ho QT, i in. Impact of anatomical traits of maize (*Zea mays* L.) leaf as affected by nitrogen supply and leaf age on bundle sheath conductance. *Plant Sci.* 252 (2016), 205-14. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.013>.
53. Revilla P, Rodríguez VM, Ordás A, Rincént R, Charcosset A, Giauffret C, i in. Association mapping for cold tolerance in two large maize inbred panels. *BMC Plant Biol.* 16 (2016), 127. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0816-2>.
54. Roberts AG, Oparka KJ. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ.* 26 (2003), 103-24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00950.x>.
55. Sage RF, Kubien DS. The temperature response of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 30 (2007), 1086-106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x>.
56. Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M. Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell Physiol.* 49 (2008), 30-9. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm162>.
57. Savitch LV, Harney T, Huner NPA. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol Plant.* 108 (2000), 270-78. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108003270.x>.
58. Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 61 (2010), 263-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>.
59. Shan X, Wang X, Yang G, Wu Y, Su S, Li S, i in. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *J Plant Biol.* 56 (2013), 32-38. <https://doi.org/10.1007/s12374-012-0251-3>.

60. Sobkowiak A, Jończyk M, Adamczyk J, Szczepanik J, Solecka D, Kuciara I, i in. Molecular foundations of chilling-tolerance of modern maize. *BMC Genomics*. 17 (2016), 125. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2453-4>.
61. Sobkowiak A, Jończyk M, Jarochovska E, Biecek P, Trzcinska-Danielewicz J, Leipner J, i in. Genome-wide transcriptomic analysis of response to low temperature reveals candidate genes determining divergent cold-sensitivity of maize inbred lines. *Plant Mol Biol*. 85 (2014), 317-31. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0187-8>
62. Solecka D, Żebrowski J, Kacperska A. Are pectins involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants? *Ann Bot*. 101 (2008), 521-30. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm329>.
63. Sowiński P. Transport of assimilates from leaves to roots in cold-treated maize seedlings. Kinetics and assimilate distribution. *Acta Physiol Plant*. 17 (1995), 341-48.
64. Sowiński P. Wrażliwość kukurydzy na chłód. Część 1. Wzrost, rozwój, fotosynteza. . *Biuletyn IHAR-PIB*. 214 (2000), 3-16.
65. Sowiński P, Dalbiak A, Tadeusiak J, Ochodzki P. Relations between carbohydrate accumulation in leaves, sucrose phosphate synthase activity and photoassimilate transport in chilling treated maize seedlings. *Acta Physiol Plant*. 21 (1999), 375-81. <https://doi.org/10.1007/s11738-999-0009-9>.
66. Taylor AO, Craig AS. Plants under Climatic Stress II. Low Temperature, High Light Effects on Chloroplast Ultrastructure. *Plant Physiol*. 47 (1971), 719-25. <https://doi.org/10.1104/pp.47.5.719>.
67. Terashima I, Hanba YT, Tholen D, Niinemets Ü. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. *Plant Physiol*. 155 (2011), 108-16. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165472>.
68. Verheul MJ, Picatto C, Stamp P. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) seedlings under chilling conditions in the field. *Eur J Agron*. 5 (1996), 31-43. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(96\)02007-2](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(96)02007-2).
69. Wang D, Naidu SL, Portis AR, Moose SP, Long SP. Can the cold tolerance of  $C_4$  photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus* relative to *Zea mays* be explained by differences in activities and thermal properties of Rubisco? *J Exp Bot*. 59 (2008a), 1779-87. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern074>.
70. Wang D, Portis AR, Moose SP, Long SP. Cool  $C_4$  photosynthesis: pyruvate Pi dikinase expression and activity corresponds to the exceptional cold tolerance of carbon assimilation in *Miscanthus* × *giganteus*. *Plant Physiol*. 148 (2008b), 557-67. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120709>.
71. Wolfe DW. Low temperature effects on early vegetative growth, leaf gas exchange and water potential of chilling-sensitive and chilling-tolerant crop species. *Ann Bot*. 67 (1991), 205-12.
72. Zabolotn AI, Barisheva TS, Zabolotn OA, Larskaya IA, Lozovaya VV, Beldman G, i in. Alterations in cell walls of winter wheat roots during low temperature acclimation. *J Plant Physiol*. 152 (1998), 473-79. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80266-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80266-6).
73. Zambryski P, Crawford K. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16 (2000), 393-421. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.393>.
74. Zhu J, Dong C-H, Zhu J-K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*. 10 (2007), 290-95. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.010>.

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W latach 2000-2002, prowadziłam badania w ramach swojej pracy magisterskiej pt. „*Flora desmidii s. l. zachodniej części torfowiska Żydowskie Bagno*” pod kierunkiem naukowym dr Grażyny Tomaszewicz, w Zakładzie Botaniki Środowiskowej, Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski. Celem pracy magisterskiej było analiza zależności pomiędzy warunkami środowiska, a występowaniem i składem gatunkowym badanej grupy glonów. W czasie studiów magisterskich, interesowałam się również innymi zagadnieniami, z pogranicza biologii i matematyki, które dotyczyły m.in. biomechaniki ruchu zwierząt oraz modelowania tempa przyrostu populacji. Efektem tych zainteresowań są 2 artykuły popularnonaukowe z moim współautorstwem: Bilaska Anna, Sadowski Witold. „*Na czworakach*”. Delta. 07.2000 oraz Bilaska Anna, Sadowski Witold. „*Matematycy liczą barany*”. Wiedza i Życie. 05.2003.

W sierpniu 2002 r. rozpoczęłam pracę w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, w Pracowni Stresów Środowiskowych Zakładu Biochemii i Fizjologii Roślin, w grupie badawczej prof. dr. hab. Pawła Sowińskiego realizującej badania nad problemem chłodowrażliwości u kukurydzy. Badania grupy prof. dr. hab. Pawła Sowińskiego dotyczyły w szczególności: analizy transportu międzykomórkowego oraz załadowania floemu z zastosowaniem izotopu węgla C<sub>14</sub>, analizy wymiany gazowej i parametrów fluorescencji chlorofilu oraz analizy zmian ultrastrukturalnych spowodowanych działaniem chłodu w liściach kukurydzy z wykorzystaniem transmisyjnego (TEM) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). W celu nauki metod przygotowania materiału do mikroskopii elektronowej, odbyłam szkolenie pod kierunkiem dr Anny Rudzińskiej-Langwald w Katedrze Botaniki, SGGW w Warszawie. Od 2003 r. rozpoczęłam obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem mikroskopów elektronowych

w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. W tych badaniach skupiłam się głównie na analizie gęstości, rozmieszczenia oraz ultrastruktury plazmodesm, kanałów cytoplazmatycznych o średnicy około 50 nm i długości 100 nm przechodzących w poprzek ściany komórkowej umożliwiających transport między żywymi komórkami w tkance roślinnej (Zambryski i Crawford, 2000, Roberts i Oparka, 2003), jak również roli plazmodesm w transporcie metabolitów fotosyntetycznych w liściach kukurydzy w warunkach niskiej temperatury. Dodatkowo, we współpracy z dr Anną Rudzińską-Langwald oraz z zastosowaniem energo-dystrybucyjnej mikroanalizy rentgenowskiej i skaningowo-transmisyjnego mikroskopu elektronowego (w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie), przeprowadziłam



cytolokalizację wolnych jonów wapnia  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  w komórkach liści badanych linii kukurydzy. Punktem wyjścia tych badań, były dane z literatury potwierdzające udział cytoplazmatycznych jonów wapnia, jako wtórnego przekaźnika informacji o stresie, w reakcji roślin na niską temperaturę (Jian i in., 1999, Holdaway-Clarke i in., 2000). Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdziłam jonów wapnia uwalniających się do cytoplazmy komórkowej pod wpływem chłodu umiarkowanego (12-14 °C) – cytoplazmatyczne jony wapnia zlokalizowałam w liściach roślin w dodatkowym wariancie, w którym zastosowano tzw. „chłód ostry” (5 °C). Wyniki powyższych badań były przedstawione na 6 konferencjach międzynarodowych oraz 1 krajowej (II.7.2-8, Załącznik 4).

W ramach grantu promotorskiego finansowanego przez MNiSW realizowanego w latach 2005 – 2007 (II.5.1, Załącznik 4) pod kierunkiem promotora pracy doktorskiej: prof. dr. hab. Pawła Sowińskiego, prowadziłam analizę porównawczą ekspresji genów kodujących białka związane z załadowaniem floemu w liściach kukurydzy w chłodzie. W badaniach zastosowałam mikromacierze cDNA zaprojektowane i wykonane przez *Maize Oligonucleotide Array Project* (Arizona, <http://www.maizearray.org>). Badania były realizowane we współpracy z dr Joanną Trzcińską-Danielewicz i z prof. dr. hab. Janem Fronkiem z Zakładu Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz z dr. hab. Markiem Skonecznym z Zakładu Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Z oceny globalnych zmian w profilu ekspresji genów wynikało, że badana linia kukurydzy (CM 109), pomimo że jest linią wrażliwą na niską temperaturę, wykazuje w chłodzie zdolność do uruchamiania mechanizmów obronnych oraz aklimatyzacji. Interesującą obserwacją w tej analizie była nadreprezentacja „*defence response*” w podkategorii GO (system klasyfikacji genów *Gene Ontology*) i indukcja genów związanych z obroną przed patogenami. Na podstawie tych wyników postawiliśmy hipotezę, że chłód indukuje krzyżową reakcję na stres, polegającą na indukcji przez jeden rodzaj stresu genów specyficznych dla innego rodzaju. W mechanizmie reakcji krzyżowej, uruchamiany jest wspólny szlak transdukcji sygnału o stresie, np. poprzez „nadprodukcję” aktywnych form tlenu w apoplazmie z udziałem nadtlenu wodoru, jako wtórnego przekaźnika informacji (Pastori i Foyer, 2002).

Tematykę związaną z analizą ekspresji genów u kukurydzy w chłodzie, we współpracy z Zakładem Ekofizjologii Molekularnej Roślin oraz Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UW, kontynuowałam jako wykonawca w dwóch projektach finansowanych z MNiSW, kierownik: prof. dr hab. Paweł Sowiński (II.9.2

i II.9.3, Załącznik 4), a następnie w ramach projektu własnego, realizowanego w latach 2010 – 2013 (II.5.7, Załącznik 4), w którym przeprowadziłam lokalizację transkryptów (z zastosowaniem techniki hybrydyzacji *in situ* i transmisyjnego mikroskopu elektronowego) oraz analizę ekspresji genów (z zastosowaniem qRT-PCR) związanych z transportem międzykomórkowym i załadowaniem floemu w liściach kukurydzy w chłodzie. Dodatkowo, we współpracy z dr Danutą Solecką oraz dr. Maciejem Jończykiem (Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, Wydział Biologii, UW) podjęłam badania dotyczące analizy aktywności metylosteraz pektynowych oraz poziomu metylacji pektyn w liściach kukurydzy pod wpływem chłodu. Efektem powyższych badań były 3 wspólne publikacje (II.4.2 i II.4.5-6, Załącznik 4) oraz 5 doniesień konferencyjnych (II.7.13-17, Załącznik 4).

W roku 2012 otrzymałam grant Iuventus Plus finansowany z MNiSW (II.5.6, Załącznik 4), w którym do analizy ultrastruktury plazmodesm zastosowałam technikę tomografii elektronowej oraz transmisyjny mikroskop elektronowy (JEM 1400, JEOL, Co., Japonia) wyposażony w uchwyt typu: „*high tilt holder*” (zakres pracy:  $\pm 60^\circ$ ) i kamerę CCD Morada (SiS-Olympus, Niemcy). Sprzęt był udostępniony na zasadzie współpracy naukowej w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie. Uzyskane trójwymiarowe obrazy plazmodesm (według naszej wiedzy była to pierwsza wizualizacja plazmodesm w trzech wymiarach) pozwoliły na szczegółową analizę zmian ultrastrukturalnych zachodzących pod wpływem niskiej temperatury u kukurydzy. Badania były prowadzone we współpracy z prof. dr. hab. Pawłem Sowińskim i dr. Jarosławem Szczepanikiem (Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin, Wydział Biologii, UW) oraz z mgr. Szymonem Suskim (Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie). Efektem powyższych badań były 2 publikacje (II.2.1 i II.4.4, Załącznik 4) oraz 1 doniesienie konferencyjne (II.7.12, Załącznik 4).

W trakcie stażu podoktorskiego realizowanego w latach 2013- 2016 na Uniwersytecie Rzeszowskim (II.5.5, Załącznik 4), oprócz badań zaplanowanych w projekcie, które dotyczyły mechanizmów adaptacji do warunków niskiej temperatury kukurydzy i miskanta olbrzymiego, podjęłam współpracę z dr. Leszkiem Satorą (obecnie: Zakład Hydrobiologii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie), w zakresie analizy anatomicznej i ultrastrukturalnej aparatu skrzelowego dyskowców (*Symphysodon aequifasciatus*) zainfekowanych przez pasożyty skrzeli. Jako pierwsi szczegółowo opisaliśmy mechanizm obronny występujący u ryb, polegający na zabudowie komórkami

delikatnych blaszek skrzelowych, struktur odpowiadających za wymianę gazową i jonoregulację. W ramach współpracy udało nam się również odkryć zjawisko określane jako "przebudowa nabłonka" (*epithelial remodeling*) u ryb wykorzystujących przewód pokarmowy jako dodatkowy narząd oddechowy w warunkach hipoksji. Obserwowana w trakcie "przebudowy" proliferacja komórek nabłonka płaskiego w warunkach niedotlenienia stanowi niezwykle cenny, naturalny model badawczy i zarazem przysłowiowy „klucz” do wyjaśnienia procesów nowotworowych. W badaniach zastosowałam techniki immunocytochemiczne oraz transmisyjną mikroskopię elektronową. Ponadto, w ramach tej współpracy podjęto unikalne badania grzybów wielkoowocnikowych, których wyniki będą stanowić cenny wkład w dziedzinę toksykologii. Efektem powyższych badań było 5 wspólnych publikacji naukowych (II.4.8-12, Załącznik 4).

Ponadto, w trakcie pobytu na Uniwersytecie Rzeszowskim, nawiązałam współpracę z dr Natalią Shemedyuk z Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej i Biotechnologii we Lwowie. W ramach współpracy uczestniczyłam w badaniach ekstraktów pochodzących z liści perełkowca japońskiego (*Sophora japonica*), a na potrzeby wspólnej publikacji (II.4.7, Załącznik 4) wykonałam oznaczenie  $\beta$ -glukanu w ekstraktach z liści tego gatunku rośliny.

W czerwcu 2018 roku nawiązałam współpracę z prof. Xinchao Wang z Instytutu: Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS, Hangzhou, Chiny). Wspólnie przygotowaliśmy wniosek o finansowanie, w którym zaplanowaliśmy badania reakcji na chłód w młodych liściach herbaty chińskiej (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) z zastosowaniem, m. in. zaawansowanych technik molekularnych (techniki „multiomiczne”) – po stronie chińskiej oraz elektroforezy 2 D i spektrometrii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS) – po stronie polskiej. Wniosek został złożony w konkursie SHENG1 (Narodowe Centrum Nauki) – jednak nie uzyskał finansowania. Trzy lata później, nawiązałam współpracę z prof. Miao-Yun Xu i prof. Yurong Xie z Instytutu: Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS, Pekin, Chiny). Przygotowaliśmy wspólny wniosek projektowy dotyczący charakterystyki transkrypcyjnych i post-transkrypcyjnych regulatorów zaangażowanych w odpowiedź kukurydzy na stres chłodu, który został złożony w kolejnym konkursie polsko-chińskim (NCN, SHENG2). Niestety projekt nie uzyskał finansowania. Na bazie powyższej współpracy, w sierpniu 2022 r. IHAR-PIB został zaproszony jako kluczowy partner do wzięcia udziału we wspólnym projekcie:

„From Genome to Phenome: Deciphering Crop Genetic Resources” (G2P), a następnie został podpisany list intencyjny dla współpracy polsko-chińskiej, pomiędzy CASS i IHAR-PIB. W marcu 2023 r. został złożony do recenzji, do czasopisma *New Phytologist* pierwszy manuskrypt z moim współautorstwem z grupą badawczą prof. Yurong Xie. Praca dotyczy czynników molekularnych regulujących rozgałęzienie wiczu u kukurydzy (status publikacji na dzień 07.06.2023 r.: po 1 recenzji, wymaga poprawek).

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

W trakcie zatrudnienia na Uniwersytecie Rzeszowskim, w latach 2013-2016 w ramach stażu po uzyskaniu stopnia doktora (projekt FUGA2, nr DEC 2013/08/S/NZ9/00870, finansowany z Narodowego Centrum Nauki, II.5.5 Załącznik 4) byłam organizatorem cyklicznych seminariów naukowych, odbywających się z udziałem studentów i doktorantów oraz pracowników naukowych Zakładu Fizjologii Roślin Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych w Weryni. Ponadto, w okresie realizacji stażu oraz po jego zakończeniu zgodnie z planem współpracy z Uniwersytetem Rzeszowskim, sprawowałam opiekę nad pracami dyplomowymi (finansowanymi z projektu FUGA2, II.5.5 Załącznik 4), przekazując wiedzę w zakresie technik mikroskopowych i molekularnych. Byłam opiekunem następujących prac dyplomowych:

- 1) Opiekun naukowy pracy magisterskiej: „*Analiza ekspresji metyloesterazy pektynowej (PME) oraz lokalizacja pektyn w ścianie komórkowej liści na różnych etapach rozwoju roślin miskanta olbrzymiego (Miscanthus × giganteus)*”. Piotr Panek, Uniwersytet Rzeszowski, 2015.
- 2) Promotor pracy inżynierskiej: „*Zmiany w zawartości  $\beta$ -glukanu w ścianie komórkowej liści kukurydzy (*Zea mays L.*) i miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus*) zachodzące pod wpływem chłodu*”. Aneta Cisło, Uniwersytet Rzeszowski, 2018.
- 3) Promotor pracy inżynierskiej: „*Zmiany w aktywności fotosyntetycznej i parametrach fluorescencji chlorofilu w liściach miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus*)*”. Wojciech Fronc, Uniwersytet Rzeszowski, 2018.

- 4) Promotor pracy inżynierskiej: „*Wpływ niskiej temperatury na zmiany w zawartości pektyn w ścianie komórkowej liści miskanta olbrzymiego (Miscanthus × giganteus)*”. Sylwia Kłoda, Uniwersytet Rzeszowski, 2018.
- 5) Promotor pracy inżynierskiej: „*Zmiany w zawartości związków fenolowych w ścianie komórkowej liści roślin miskanta olbrzymiego (Miscanthus × giganteus) traktowanych niską temperaturą*”. Patrycja Szpak, Uniwersytet Rzeszowski, 2018.

W okresie 01.07-30.09.2018 roku byłam opiekunem studentów, odbywających w IHAR-PIB praktyki letnie. Brałam również udział w Komitecie Organizacyjnym: III Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin. Wydział Biologii UW, Warszawa, 26-30.08.2007 oraz konferencji: “*Improvement of tolerance to environmental stress and quality in cereals*” CICSA, IHAR Radzików, 25-27.03.2004.

## **7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej**

### **1) Szkolenia, kursy, warsztaty:**

- Warsztaty z zakresu obsługi systemu mikroskopowego APX 100 oraz AI. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Olympus/Evident Europe GmbH Sp. z o. o. Oddział w Polsce. Warszawa. 30.04.2023 r.
- Szkolenie: „Adaptacja do zmian klimatu oraz możliwości wykorzystania potencjału OZE”. IHAR-PIB Radzików, 07.05.2019 r.
- Warsztaty: „Mikroskopia fluorescencyjna – aplikacje, obrazowanie, analiza, wyniki”. Olympus Polska, IHAR-PIB Radzików. 24.10.2018 r.
- Szkolenie: „Wprowadzenie do analizy statystycznej w środowisku R”. IHAR-PIB Radzików. 15-16.02.2018.
- Kurs: Immunodetekcja białek, Blirt SA, Dział DNA Gdańsk. 02-05.07.2014
- Warsztaty: Gene expression and data analysis. Life Technologies, Kraków. 11.03.2014.
- Szkolenie w zakresie obsługi wibratomu firmy Leica (model VT1200S). Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. 16-18.10.2013.

- Szkolenie w zakresie obsługi kriotomu firmy Leica (model CM 1100). Zakład Biologii Rozwoju Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski. 28.09-02.10.2009.
- Warsztaty: „Techniki immunocytochemiczne i hybrydyzacji in situ na poziomie mikroskopu elektronowego”. Uniwersytet M. Kopernika Toruń. 02-04.02.2009.
- Warsztaty: Mikromacierze i metody ich analizy. „MBS” Serwis dla biologii molekularnej. Warszawa. 02-04.02.2009.
- Warsztaty: Genomika i Bioinformatyka. „MBS” Serwis dla biologii molekularnej. Warszawa. 11-14.10.2006.
- Szkolenie: „Przetwarzanie danych w środowisku SAS Enterprise Guide” SAS Institute, Warszawa. 06-07.04.2006.
- Szkolenie: „Raportowanie w środowisku SAS Enterprise Guide”. SAS Institute, Warszawa. 04.04.2006.
- Szkolenie: „Praca w środowisku SAS Enterprise Guide”. SAS Institute, Warszawa. 03.04.2006.
- Warsztaty: “Recent Advances in Confocal Microscopy and Their Applications”. Instytut Farmakologii. PAN. Kraków. 25-28.04.2005.

## 2) Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda I stopnia Dyrektora IHAR-PIB, za wybitne osiągnięcia naukowe. 12.2019.
- Nagroda Dyrektora IHAR-PIB, za wybitne osiągnięcia naukowe. 12.2018.
- Nagroda Dyrektora IHAR-PIB, za wykonanie publikacji wydrukowanej w 2010 roku w renomowanym międzynarodowym czasopiśmie naukowym. 12.2011.
- **Nagroda Oxford University Press** za najlepszą pracę opublikowaną w czasopiśmie: *Annals of Botany* w pierwszym półroczu 2010 r. (Vol. 106). 06.2011.
- Zaproszenie do panelu XVIII Forum Dyskusyjnego Jednostek Badawczo-Rozwojowych z udziałem m. in.: prof. Marii Orłowskiej, sekretarz stanu w MNiSW (2008-2012). Temat dyskusji: „*Reforma nauki w Polsce - Instytuty Badawcze miejscem twórczej pracy*”. 05.2009.
- **Nagroda Prezesa Rady Ministrów** za rozprawę doktorską: *Fizjologiczne, ultrastrukturalne i molekularne aspekty zahamowania procesów transportowych w liściach kukurydzy w chłodzie*”. Promotor pracy: prof. dr hab. Paweł Sowiński. 09.2008.

- Nagroda Dyrektora IHAR, za aktywność, zaangażowanie i wyróżniające wyniki w pracy naukowej w roku 2007. 12.2007.
- Wyróżnienie pracy w Sesji Młodych Naukowców: „*The mechanism of plasmodesmata closure in maize leaves at low temperature. Signaling at moderate chilling*” na III Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin. 26-30.08.2007 r. Wydział Biologii UW. 08.2007.

### 3) Zestawienie liczbowe osiągnięć naukowych

Typ osiągnięcia	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem	Liczba cytowań (bez autocytowań)*
Publikacje w czasopiśmie posiadających IF	1	13	<b>14</b>	244
Rozdział w monografii	0	1	<b>1</b>	5
Publikacje w czasopiśmie bez IF	0	2	<b>2</b>	-
Publikacje popularnonaukowe	2	0	<b>2</b>	-
Doniesienia konferencyjne	8	9	<b>17</b>	-
Kierownik projektu MEiN/MNiSW/MRiRW	0	2 + 1**	<b>3</b>	-
Kierownik projektu NCN	0	2	<b>2</b>	-
Wykonawca projektu: MEiN/MNiSW/MRiRW/NCN	1	3	<b>4</b>	-

\* na podstawie bazy Scopus, na dzień 07.06.2023 r.

\*\*jako redaktor wniosku i osoba do bezpośredniego kontaktu

.....  
(podpis wnioskodawcy)