

Dr Krystyna Rybka

Diagnostyka przesiewowa stanu fizjologicznego roślin oparta na znormalizowanych wartościach
i parametrach fluorescencji chlorofilu *a*

Autoreferat



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Radzików, 18 stycznia 2019

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	4
b) Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej	4
c) Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej...	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	19
6. Podziękowania	23
7. Informacja dotycząca finansowania badań zgłoszonych jako Osiągnięcie Habilitacyjne ..	23

1. Dane personalneImię i nazwisko: **Krystyna Rybka**

Miejsce pracy: Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowy Instytut Badawczy,
IHAR-PIB w Radzikowie
05-870 Błonie

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

- 1984 magister chemii, specjalność chemia nieorganiczna
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii,
praca, dyplomowa pt.: „Elektroredukcja tris(acetylo-acetono-)kobaltu III
na elektrodzie rtęciowej”
promotor: prof. dr hab. Marek Kalinowski
- 1993 doktor nauk rolniczych, dyscyplina agronomia, specjalność biochemia
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, rozprawa doktorska pt.: „Zależność
między właściwościami nieskrobiowych polisacharydów a strawnością białka
ziarna linii wsobnych żyta”
promotor: prof. dr hab. Konstancja Raczyńska-Bojanowska
Wyróżnienie Rady Naukowej IHAR

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2001-obecnie adiunkt w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB
- 1998-2001 staż po-doktorski w Uniwersytecie Kalifornijskim w Riverside, USA
- 1996-1998 adiunkt w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB
- 1994-1996 staż po-doktorski w National Institute of Agrobiological Resources-Tsukuba,
Japonia
- 1993-1994 adiunkt w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB
- 1984-1993 asystent w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Diagnostyka przesiewowa stanu fizjologicznego roślin oparta na znormalizowanych wartościach i parametrach fluorescencji chlorofilu *a*

b) Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej, $\sum \text{pkt}_{\text{MNI SzW}} = 165$; $\sum \text{IF} = 11.969$

Publikacje przeglądowe

H1 Rybka K* (2009) TILLING i FOX-hunting: nowe metody analizy funkcjonalnej genów. Postępy Biologii Komórki 36:539-554; Praca nagrodzona jako najlepszy artykuł Czasopisma w 2009. <http://ptbk.mol.uj.edu.pl/download/nagrody/update2014/2009-artykul.pdf> [pkt_{MNI SzW} = 15; IF = 0.1; udział - 100%]

H2 Rybka K*, Nita Z (2015) Physiological requirements for wheat ideotypes in response to drought threat. Acta Physiologiae Plantarum e37:1-13 <http://link.springer.com/article/10.1007/s11738-015-1844-5> [pkt_{MNI SzW2015} = 25; IF₂₀₁₅ = 1.86; udział - 90%]

Publikacje eksperymentalne

H3 Żurek G, Rybka K*(co-first author), Pogrzeba M, Krzyżak J, Prokopiuk K (2014) Chlorophyll *a* Fluorescence in Evaluation of the Effect of Heavy Metal Soil Contamination on Perennial Grasses. PLoS ONE 9: e91475 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091475> [pkt_{MNI SzW2015} = 35; IF₂₀₁₄ = 3.324; udział - 45%]

H4 Prokopiuk K, Żurek G, Rybka K* (2019) Turf Covering for Sport Season Elongation Cause No Stress for Grass Species as Detected by Chl *a* Fluorescence. Urban Forestry & Urban Greening, UFUG_2018_308_R2, oczekuje na finalną decyzję Redaktora [pkt_{MNI SzW2015} = 40; IF₂₀₁₄ = 3.521; udział - 45%]

H5 Nykiel M, Lisik P, Dębski J, Florea BI, Rybka K* (2019) Chl *a* Fluorescence and Proteomics Reveal Protection of Photosynthetic Apparatus in Tolerant but not in Susceptible to Dehydration Wheat Cultivar. Biologia Plantarum 63:287-297. https://bp.ueb.cas.cz/artkey/bpl-201901-0033_chl-a-fluorescence-and-proteomics-reveal-protection-of-the-photosynthetic-apparatus-to-dehydration-in-tolerant.php on line first: 13.12.2018 [pkt_{MNI SzW2015} = 25; IF₂₀₁₆ = 1.424; udział - 45%]

H6 Rybka K*, Janaszek-Mańkowska M, Siedlarz P, Mańkowski D (2019) Machine learning in determination of water saturation deficit in wheat leaves on basis of Chl *a* fluorescence parameters. Photosynthetica 57(1): xx-xx <https://ps.ueb.cas.cz/corproof.php?tartkey=phs-000000-2133> on line first: 07.12.2018 [pkt_{MNI SzW2015} = 25; IF_{2017/2018} = 1.740; udział - 45%]

* Jestem autorem korespondencyjnym wszystkich i pierwszym w 4 publikacjach wchodzących w skład Osiągnięcia

c) Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

I. Wprowadzenie

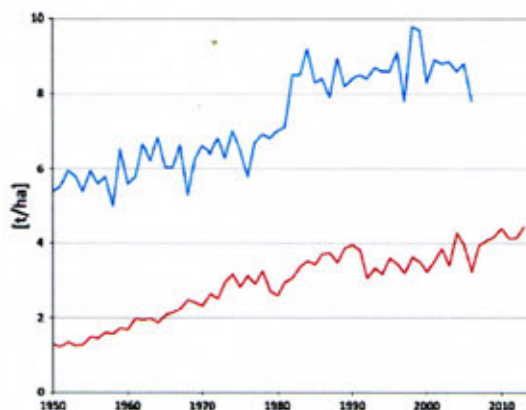
Wielkość plonu roślin rolniczych, jako finalna pochodna wielu parametrów, wśród których ważną cechą jest odporność na stropy środowiskowe (biotyczne i abiotyczne), stanowi od lat o sukcesie rynkowym odmian. Dzięki współpracy ze spółką hodowlaną HR-Strzelce Grupa IHAR, zaczęłam interesować się użytkowym aspektem badań naukowych i podjęłam prace zorientowane na ocenę fizjologicznej odpowiedzi roślin na stropy abiotyczne. Napisałam kilka prac przeglądowych a jako dorobek habilitacyjny przytaczam dwie (**H1** i **H2**). Pierwsza (**H1**, 2009 r.) dotyczy masowych i wysokoprzepustowych metod analizy funkcjonalnej genów: TILING (ang. *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) oraz FOX-hunting (ang. *Full-length cDNA Over-expressing gene hunting system*). Omawiam w niej rozwój zastosowań technik biologii molekularnej w badaniach i modyfikacjach genomów roślinnych na drogach: „od cechy do genu” (ang.: *Top-down/ Forward*) oraz „od mutacji do genu” (ang.: *Bottom-up/ Reverse*). W obydwu podejściach ocena fenotypu jest kluczowa dla powodzenia prowadzonych badań (**H1**, Tab. 1) na równi z metodami gromadzenia i przetwarzania danych. Pisząc tę publikację zwróciłam uwagę na fenotypowanie i na przetwarzanie masowo zbieranych danych jako na tzw. wąskie gardło nowoczesnej hodowli (**H1** oraz Rybka, 2017). Ponieważ artykuł został wyróżniony jako najlepsza publikacja w roku 2009 w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki” (z Listy A w tamtym czasie, kierowanym przez prof. dr hab. M. Olszewską z Uniwersytetu Łódzkiego, członka rzeczywistego PAN) uważam, że praca jest godna odnotowania jako osiągnięcie.

W drugiej publikacji przeglądowej (**H2**, 2015 r.) omawiam problem suszy w naszej strefie klimatycznej oraz wymagań fenotypowych, jakie będą musiały spełniać dobrze plonujące genotypy w warunkach okresowych niedoborów wody prognozowanych do roku 2050. W publikacji **H2** skupiam uwagę na fizjologicznych, molekularnych i biochemicznych uwarunkowaniach tolerancji na suszę, jako podstawę przyjmując publikacje eksperymentalne 3 zespołów: Vadez’a z ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Indie), Bluma z ARO (Agricultural Research Organization, Volcani Center, Izrael) oraz Zagdańskiej z IHAR (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin) a od 2001- SGGW (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego) a także publikacje z Rothamsted Research (Wielka Brytania), dotyczące statystycznego przewidywania plonu (model Sirius) w sprzężeniu z modelem klimatycznym HadCM3 (Wolf i in. 1996; Jamieson i in. 1998; Brooks i in. 2001; Porter i Semenov 2005; Asseng i in. 2013; Semenov i Stratonovitch 2013; Semenov i in. 2014). Z modelu Sirius wynika, że genotypy o rozwiniętym systemie korzeniowym będą zdolne do dobrego plonowania w warunkach okresowych niedoborów wody w naszym kraju. Publikacje zespołu Vadez’a zorientowane są na problemy efektywności pobierania wody przez korzenie (Vadez i in. 2008; Bhatnagar-Mathur i in. 2008; Kholova i in. 2010a; Kholová i in. 2010b; Belko i in. 2013; Craufurd i in. 2013; Vadez i in. 2013a; Vadez i in. 2013b; Kholová i in. 2014; Vadez i in. 2014). Z kolei prace Bluma dotyczą efektywności wykorzystania wody przez rośliny (Blum 2009; Blum 2011). Publikacje zespołu Zagdańskiej koncentrują się na mechanizmach biochemicznych warunkujących tolerancję na suszę (Grudkowska i Zagdańska 2004; Grudkowska i Zagdańska 2010; Gietler i in. 2017). Ta tematyka jest mi znana również bezpośrednio z wieloletniej wspólnej pracy w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin IHAR-PIB i prowadzonych tam Seminariów Zakładowych. Omówienie w jednej publikacji przeglądowej (**H2**) aspektów teoretycznych,

ANALIZA FUNKCJONALNA	
Klasyczna (ang. <i>Top-down</i>)	Molekularna (ang. <i>Bottom-up</i>)
Białko Fenotyp	Białko fenotyp
↓ Mapowanie QTL/asocjatywne Gen/Geny	↑ Wytwarzanie i analiza białek Gen/Geny
↓ Transformacja Wybranymi klonami DNA Mutanty	↑ Identyfikacja genów Mutanty
↓ Identyfikacja fenotypów Test komplementacji	↑ Identyfikacja fenotypów Mutageniza

praktycznych oraz modelowania danych było ważnym etapem w moim rozumieniu zadań naukowca w pracy na rzecz nowoczesnej hodowli.

Niedobory wody w tkankach roślinnych są indukowane nie tylko przez susze glebowe lecz również przez inne stresy abiotyczne, takie jak: zaburzenia równowagi jonowej w glebie (najczęściej zasolenie bądź obecność jonów metali ciężkich) oraz nieoptymalne, zarówno zbyt niskie jak i zbyt wysokie, temperatury (Kacperska 2004; Grudkowska i Zagdanska 2010; Rucińska-Sobkowiak 2016). Dane literaturowe wskazują, iż słaby bądź stopniowo narastający stres zmienia stopień hydratacji polimerów komórkowych, indukuje oddziaływania ściany komórkowej z błoną komórkową, powodując aktywację kinaz LRK (*ang.: Receptor-Like Kinase*), kanałów jonowych oraz zmiany równowagi redox a następnie aktywację hormonów (głównie ABA) i szlaków biochemicznych, co w konsekwencji może prowadzić do aklimatyzacji, czyli dostosowania metabolizmu komórkowego i tempa wzrostu roślin do nieoptymalnych warunków środowiskowych. Negatywne bodźce środowiskowe, które pojawiają się gwałtownie i w dużym natężeniu, powodują depolaryzację błon komórkowych i indukują sygnalizację fosfolipidową. Może to prowadzić do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, *ang.: reactive oxygen species*), nagromadzenia H_2O_2 , peroksydacji lipidów, modyfikacji białek i zwiększonej syntezy hormonów, takich jak kwas jasmonowy i etylen. Gwałtowne i silne, bądź słabsze i długotrwałe działające negatywne bodźce środowiskowe indukują te same szlaki sygnałowe, prowadząc do nieodwracalnych modyfikacji i finalnie do śmierci komórkowej (Levitt 1985; Kacperska 2004; Dobra i in. 2010; Aroca i in. 2012; Gietler i in. 2016a; Gietler i in. 2016b; Bilaska-Kos i in. 2016; Rucińska-Sobkowiak 2016; Sobkowiak i in. 2016; Gietler i in. 2017). Nie da się przeciwdziałać groźbie znacznego spadku a nawet utraty plonów na drodze hodowlanej w przypadku wystąpienia ekstremalnych zdarzeń klimatycznych. Jednakże, ponieważ sposób reakcji roślin na bodźce środowiskowe jest uwarunkowany genetycznie, selekcja genotypów tolerancyjnych na stresy abiotyczne podnosi zdolność do prawidłowego (*de facto* niezbyt zaburzonego) rozwoju roślin i w konsekwencji do w miarę stabilnego plonowania nowych odmian w niesprzyjających warunkach pogodowych, co uwidacznia się jako trend ciągłego wzrostu plonów, na przykładzie plonowania pszenicy w Wielkiej Brytanii i w Polsce (**H2** oraz (Rybka i Oleksiak 2016) (*vide*: wykres, niebieska linia plony pszenicy - GB, czerwona - Polska).

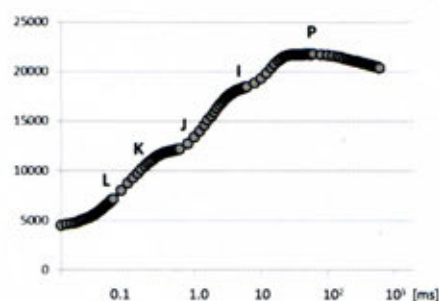


W polskich programach hodowlanych, selekcja w kierunku podnoszenia tolerancji na stresy abiotyczne jest prowadzona pośrednio, przez ocenę wierności plonowania w rejonach i latach uprawy. Widać wyraźny postęp hodowlany np. w podnoszeniu odporności na suszę (**H2** oraz Rybka i Oleksiak 2016). W hodowli zbóż uwzględniane są cechy fenotypowe, takie jak: późniejsze kłoszenie, gdyż rośliny mają więcej czasu na wytworzenie większej ilości zawiązków kłosa; szybkie wypełnianie ziarna, co jest szczególnie ważne w okresie suszy; szybkie przemieszczanie asymilatów z liści do ziarna; krótsze i sztywne źdźbło (można wtedy zwiększyć obsadę roślin na m^2 bez obawy wylegania); większa masa 1000 ziaren a także wysoka ich gęstość w stanie zsypanym; odporność na porastanie i tolerancja na choroby. W związku z tym, szczegółowo rejestrowane są następujące cechy morfologiczne: wysokość roślin, długość kłosa, położenie i powierzchnia liści flagowych oraz cechy fenologiczne: termin rozpoczęcia wegetacji po okresie spoczynku zimowego, terminy kłoszenia i dojrzewania ziarna (**H2**). Nie ma, w powszechnym użyciu, bezpośredniej metody skringowej, którą można by wykorzystać do oceny tolerancyjności roślin na stresy abiotyczne. Dlatego jako osiągnięcie habilitacyjne przedstawiam koncepcję interpretacji znormalizowanych danych surowych oraz parametrów fluorescencji chlorofilu *a* (Chl *a*) w sposób, który

został doceniony przez profesora Strassera, recenzenta **H3**, jednego z ojców metody (Tsimilli-Michael i Strasser 2013, publikacja retrospektywna). Przytaczam zdanie z recenzji R2 (całość dostępna na stronie Czasopisma: PONE-D-13-49265R1): „...Conceptual simplifications are often a big help to understand the main trends as long as more detailed descriptions are possible and remain on the track versus the trough...”. W programach hodowlanych wymagane są metody niskonakładowe, od strony technicznej łatwe do wykonania oraz o wysokiej przepustowości. Pomiar fluorescencji Chl *a*, przy odpowiedniej organizacji pracy, spełnia te warunki (Rapacz i in. 2015; Sulkiewicz i Ciereszko 2016).

Koncepcja interpretacji danych fluorescencji Chl *a* dla potrzeb przesiewowej diagnostyki stanu fizjologicznego roślin jest osadzona na 2 prawidłowościach: 1/ odwodnienie tkanek i dynamika rehydratacji są widocznymi symptomami reakcji na wiele negatywnych abiotycznych bodźców środowiskowych (Kacperska 2004) powodując zmiany konformacji polimerów komórkowych; 2/ fluorescencja Chl *a* odzwierciedla zaburzenia w procesach fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w tkankach zielonych, których kluczowym zwrótnikiem jest mitochondrialny układ redoks: askorbinian-glutation (Foyer i Noctor 2011; Lázaro i in. 2013). Koncepcję przedstawiam na przykładach: 1/ traw gazonowych uprawianych na glebach skażonych jonami metali ciężkich (**H3**); 2/ traw okrywanych agrowłókniną (stres termiczny) w celu przedłużenia okresu wegetacji (**H4**); 3/ siewek pszenicy jarej poddanych stresowi odwodnienia (susza) (**H5**). W pracach tych opieram się na znormalizowanych wartościach danych surowych oraz parametrów fluorescencji Chl *a*. Wykorzystuję fakt, że w światowych zasobach literatury są dokładnie opisane teoretyczne podstawy fluorescencji Chl *a* oraz zaburzenia fotosyntezy pod wpływem bodźców środowiskowych jak również zmiany krzywych fluorescencji pod wpływem tych bodźców i ich przełożenie na zdarzenia biochemiczne zachodzące na poziomie komórkowym (Garstka 2007; Janik i in. 2010; Stirbet i Govindjee 2012; Tóth i in. 2013; Tsimilli-Michael i Strasser 2013; Lázaro i in. 2013; Stirbet i in. 2014; Paunov i in. 2018). W osiągnięciu habilitacyjnym przedstawiam również możliwość wykorzystania parametrów fluorescencji Chl *a* do modelowania stopnia odwodnienia liści (WSD, ang.: *Water Saturation Deficit*) (**H6**). Model opracowano dla siewek pszenicy uprawianych w warunkach kontrolowanych.

Fluorescencja Chl *a* jest zjawiskiem naturalnym, charakterystycznym dla wszystkich organizmów fotosyntetyzujących. Polega ona na reemisji nadmiaru fotonów, które nie weszły ani w fazę jasną fotosyntezy ani ich energia nie została rozproszona jako egzotermiczna reakcja cyklu ksantofilowego. Pomimo, iż w zjawisku fluorescencji zachodzi zwykle reemisja nie więcej niż 1-8% pochłoniętego światła, możemy z niej wnioskować o stanie fizjologicznym badanej tkanki. Fakt reemisji nadmiaru fotonów przez Chl *a* został zaobserwowany w roku 1834 a współczesne badania powiązane z wnioskowaniem dotyczącym asymilacji CO₂ oraz przemian energetycznych w komórkach, rozpoczęte przez Wartburga i Kautskiego, datują się na początek XX wieku (Kalaji i in. 2012). Jednakże dopiero rozwój elektroniki i wynalezienie półprzewodników diodowych generujących światło (LED, ang.: *Light Emitting Diode*) umożliwił szersze wykorzystanie zjawiska fluorescencji w badaniach fizjologicznych (Tsimilli-Michael i Strasser 2013; Kalaji i in. 2012; Stirbet i Govindjee 2012; Stirbet i in. 2014). Pomiary fluorescencji Chl *a*, indukowanej wiązką o określonej energii i długości fali światła widzialnego, mogą być wykonywane zarówno na zaciemnianych uprzednio jak i na niezaciemnianych liściach. Dane, rejestrowane z malejącą w czasie częstotliwością próbkowania, przedstawione na logarytmicznej osi czasu wyznaczają krzywą indukcyjną fluorescencji (krzywa Kautskiego). Krzywa obejmuje szybki wzrost fluorescencji od momentu indukcji zjawiska przez wiązkę świetlną (O) do osiągnięcia po czasie 1 [s] wartości maksymalnej (P), po którym następuje spadek do poziomu stacjonarnego T; przy pomiarach trwających 3 [s] widoczny jedynie w



początkowym fragmencie. Na krzywej znajdują się łatwo dostrzegalne punkty przegięcia, pojawiające się w stałych przedziałach czasowych, oznaczone literami J, I oraz P. Litery te stały się nazwą testu JIP (inaczej: OJIP), czyli analizy fluorescencji Chl *a* opartej o parametry fluorescencji wyliczane na podstawie danych surowych ze sprecyzowanych w czasie punktów (Tsimilli-Michael i Strasser 2013). Pozwalają na opis zmian struktury i funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego, głównie fotosystemu II (PSII). Punkty przegięcia L i K są zazwyczaj niewidoczne na wykresach danych surowych. Test JIP został opracowany w oparciu o równania fizyczne przepływów energii wykorzystane do opisu przepływu energii w błonach tylakoidalnych pomiędzy kompleksami barwników fotosyntetycznych PSII. Mimo, że został on opracowany pod koniec lat '70, jednakże w powszechnym użyciu, w naukach stosowanych, jest od czasu rozpowszechnienia przyrządów opartych na diodach półprzewodnikowych oraz komputerów (Tsimilli-Michael i Strasser, 2013). Listę parametrów oraz opis ich znaczenia fizycznego zamieszczam w materiałach i metodach. Zamieszczona lista obejmuje jedynie parametry wyliczane przez oprogramowanie fluorymetru PocketPea, którego używałam w badaniach. Oprócz porównywania wartości poszczególnych parametrów, wśród których F_v/F_0 i F_v/F_M są szeroko znane i stosowane, skupiam uwagę na interpretacji krzywych wykreślanych w logarytmicznej skali czasu z podwójnie znormalizowanych wartości fluorescencji (Oukarroum i in. 2009; Paunov i in. 2018) szczególnie z przedziału czasowego od 0.05 do 2 ms obejmującego czas w którym zachodzi pierwszy etap stabilnej separacji ładunków w łańcuchu transportu elektronów (ETC, ang.: *Electron Transfer Chain*) (Oukarroum i in. 2009).

Pod wpływem bodźców środowiskowych następuje zmiana kształtu krzywej fluorescencji. Podwyższona wartość w punkcie początkowym (F_0) wskazuje na spadek skuteczności pułapkowania energii przez PSII, natomiast spadek wartości fluorescencji maksymalnej (F_p) zależy od złożonych czynników: struktury liścia determinującej absorpcję światła aktywnego, re-absorpcji już wyemitowanej fluorescencji, zawartości chlorofilu a także stężenia cząsteczek wygaszających fluorescencję. Wartość minimalna fluorescencji odpowiada stanowi utlenienia chinonu Q_A , natomiast maksymalna – stanowi redukcji. Ta część krzywej ilustruje dynamikę indukowanego przez światło przepływu elektronów przez łańcuch przenoszenia elektronów (ETC, ang.: *Electron Transfer Chain*) w chloroplastach: z fenotypiny przez plastochinon, cytochrom b6f, plastocyjaninę do receptorów PSI. Uszkodzenia ETC oraz obniżenie zdolności przechwytywania elektronów przez PSI spowalniają przepływ elektronów. Następuje wydłużenie czasu osiągnięcia wartości maksymalnej i obniżenie wielkości fluorescencji maksymalnej; kolokwialnie można to opisać jako „spłaszczenie” rejestrowanej krzywej. Analiza i interpretacja zmian fluorescencji chlorofilu jest podstawą do wnioskowania o stanie fizjologicznym roślin.

II. Cel

Przedstawienie koncepcji uniwersalnego przesiewowego systemu fenotypowania w oparciu o fluorescencję Chl *a*, w celu wyodrębniania roślin tolerancyjnych na środowiskowe bodźce abiotyczne indukujące odwodnienie tkanek (mierzone wzrostem WSD, ang.: *Water Saturation Deficit*) i wyrażane w [%], jako jedną z pierwszych reakcji fizjologicznych.

Stresy abiotyczne indukujące dehydratacje tkanek to:

- niekorzystny bilans wodny (H5)
- nieoptymalne temperatury (H4)
- zaburzenia równowagi jonowej w glebie (H3)

Jako osiągnięcie habilitacyjne przytaczam badania nad wpływem jonów metali ciężkich (H3) oraz zmian temperatury na trawy wieloletnie (H4) a także badania na siewkach pszenicy poddanych suszy (H5 i H6) w których ocenę stanu fizjologicznego badanych roślin prowadzono w oparciu o pomiar fluorescencji Chl *a*.

III. Materiały

Materiał do badań stanowiły liście odmian roślin z rodziny *Poaceae*, traw wieloletnich oraz pszenicy jarej. Trawy wieloletnie były uprawiane w warunkach polowych (**H3**, **H4**). Doświadczenie **H3**, nad możliwością wykorzystania traw wieloletnich w fitoremediacji, przeprowadzono na Śląsku, na stanowisku w pobliżu zamkniętej kopalni rud kadmu, ołowiu i cynku (50.4°N/018.9°E) i na oddalonym o 25 km na północ stanowisku referencyjnym (50.6°N/018.88°E). Badano odmiany: Wiwena z gatunku rajgras wyniosły (*Arrhenatherum elatius* L.); Broma, stokłosa obiedkowatej (*Bromus carinatus* Hooker et Arn); Bamar, perzu wydłużonego (*Elytrigia elongata* Nevski); Brudzyńska, stokłosa bezostnej (*Bromus inermis* Leyss) oraz Rahela, kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb). Doświadczenie **H4** prowadzono na poletkach trawnikowych w IHAR-PIB w Radzikowie (52.21°N/20.64°E). Prowadzono je w celu zbadania czy okrywanie murawy wpływa na długość sezonu użytkowania trawiastych boisk sportowych (Prokopiuk 2016, rozprawa doktorska). Pomiar fluorescencji były prowadzonymi dodatkowo badaniami w celu eksploracji koncepcji o uniwersalności oceny stanu fizjologicznego roślin na podstawie fluorescencji Chl *a*. W doświadczeniu tym badano gatunki: życica trwała (*Lolium perenne* L.), wiechlina łąkowa (*Poa pratensis* L.) oraz kostrzewa czerwona (*Festuca rubra* L.). Obydwa doświadczenia prowadzono na dorosłych roślinach, w przeciągu dwu (**H3**) i 3 lat wegetacji (**H4**). W doświadczeniu **H3**, w przeciwieństwie do doświadczenia **H4**, nie prowadzono nawożenia ani zabiegów pielęgnacyjnych. Doświadczenie **H5** i **H6** prowadzono na siewkach pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.), odmiany Ethos i Zebra, a także na zaawansowanych liniach hodowlanych pochodzących z HR-Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR. Rośliny badano w fazie 10-dniowych siewek, które uprawiano w rulonach, w hydroponice na pożywce Hogland'a wzbogacanej wg. Knopp'a, w warunkach fitotronowych (**H5** i **H6**) lub w mikroplatach w szklarni (**H6**).

IV. Metody

Główną metodę badawczą stanowił pomiar fluorescencji Chl *a* wykonywany na doosiowej stronie środkowej części liści zaciemnianej przez 30 min. przed pomiarem, przy użyciu przenośnego fluorymetru PocketPea (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). Fluorescencja była indukowana przez nasyczone, czerwone światło aktywnicze o strumieniu 3500 [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a następnie rejestrowana w trybie nieciągłym, przez 3 [s], obejmujące więcej niż wzrastającą część krzywej fluorescencji, w interwałach rosnących od 10 [μs] przez pierwsze 300 [μs] trwania pomiaru do 100 [ms] dla czasów dłuższych niż 0.3 [s]. Łącznie, w każdym pomiarze, przyrząd rejestrował 124 wartości, które były analizowane jako: 1/ krzywe ΔW_{OJ} (**H3-H5**); 2/ parametry fluorescencji Chl *a* wyliczane przez dedykowane oprogramowanie PocketPea (**H3-H6**); 3/ w graficznej formie tzw. HeatMap ilustrującej grupowanie znormalizowanych parametrów fluorescencji Chl *a* (**H4**, **H5**) a także 4/ po przeliczeniu przez nadzorowaną sieć neuronową, jako WSD (ang.: *Water Saturation Deficit*) odzwierciedlający stopień dehydratacji liści (**H6**).

Parametry wyszczególniane oraz obliczane przez oprogramowanie PocketPea:

$F_0 \approx F_{50}$ [ms] – wartość fluorescencji minimalna mierzona po 50 [μs];

F_1, F_2, F_3, F_4, F_5 – wartość fluorescencji w punktach czasowych: 0.05, 0.1, 0.3, 2.0 oraz 30 [ms] po rozpoczęciu oświetlania światłem aktywniczym, odpowiadająca fluorescencji w punkcie początkowym pomiaru, po czasie 100 [μs] oraz w punktach przegięcia K, J, I na wzrastającej części krzywej OJIP fluorescencji

$F_M = F_P$ maksymalna wartość fluorescencji

t_{FM} czas [ms] do osiągnięcia maksymalnej fluorescencji

Area powierzchnia pomiędzy wzrastającą częścią krzywej fluorescencji przejściowej OJIP a osią odciętych

F_V wartość maksymalna fluorescencji zmiennej obliczana jako $F_V = F_M - F_0$

F_v/F_M	wartość odzwierciedlająca siłę reakcji świetlnych
RC_{ABS}	wartość odzwierciedlająca liczbę centrów aktywnych absorbujących światło w pojedynczym zdarzeniu
$(1-V_J)/V_J$	wartość będąca miarą efektywnego transportu elektronów w ETC w kierunku PSI, poza chinon Q_A
PI_{ABS}	(ang.: <i>Performance Index</i>) wartość interpretowana jako wskaźnik wydajności przetwarzania zaabsorbowanych fotonów

Krzywe ΔW_{OJ} , podwójnie znormalizowane krzywe zmiennych w czasie różnic pomiędzy wartościami fluorescencji mierzonymi dla roślin uprawianych w warunkach kontrolnych oraz w warunkach indukujących w liściach reakcję na stres abiotyczny, obliczane w Excelu wg. zadanego wzorów, jako makra w języku VisualBasic;

$$\Delta W_{OJ} = \left[\frac{F(t)-F(0)}{F(J)-F(0)} \right] stres - \left[\frac{F(t)-F(0)}{F(J)-F(0)} \right] kontrola$$

Metody badawcze uzupełniające to: jakościowa ocena wizualna traw wieloletnich (**H3**, **H4**); pomiary biometryczne traw (**H3**); analiza wagowa w ocenie ilości masy zielonej (**H3**, **H4**) oraz WSD liści w [%] (**H5**, **H6**); spektrofotometria płomieniowa w ocenie zawartości jonów metali ciężkich w glebie i w liściach (**H3**); elektroforeza dwukierunkowa białek oraz (po trawieniu trypsyną) identyfikacja białek różnicujących w systemie MS-MS (**H5**).

Do analizy statystycznej wyników, przeprowadzonej przy użyciu oprogramowania Statistica, wykorzystano: analizę wariancji, modelowanie statystyczne danych z użyciem sieci neuronowych nienadzorowanych i nadzorowanych. Sieci nienadzorowane zastosowano do analiz: skupień z oceną odległości Manhattan (**H4**) i Euklidesową (**H5**) oraz głównych składowych (PCA, ang.: *Principal Component Analysis*) (**H3**). Sieci nadzorowane wykorzystano w modelowaniu WSD w oparciu o parametry fluorescencji Chl *a* (**H6**).

V. Omówienie wyników

Prace nad diagnostyką przesiewową stanu fizjologicznego roślin w warunkach stresów abiotycznych w oparciu o znormalizowane wartości i parametry fluorescencji Chl *a* rozpoczęłam od badań przydatności traw wieloletnich do rekultywacji gleb skażonych jonami metali ciężkich (HM) (**H3**: *Chlorophyll a Fluorescence in Evaluation of the Effect of Heavy Metal Soil Contamination on Perennial Grasses*)

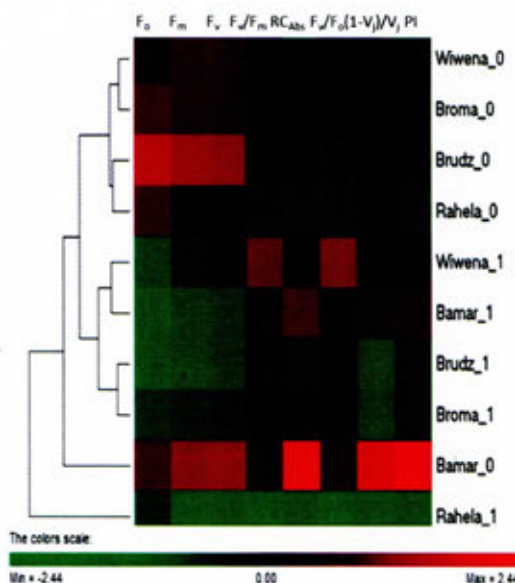
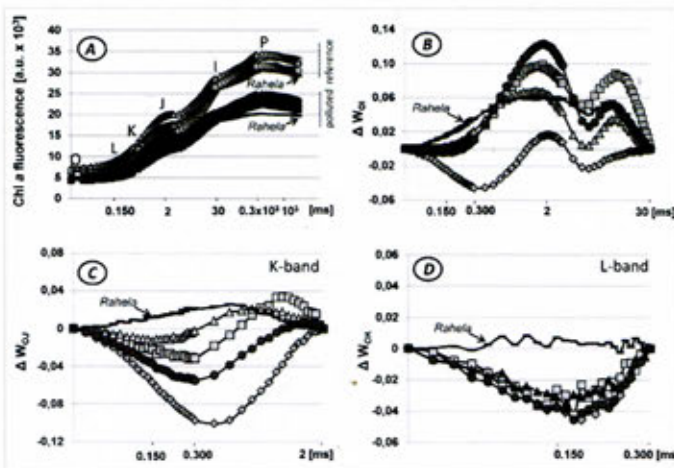
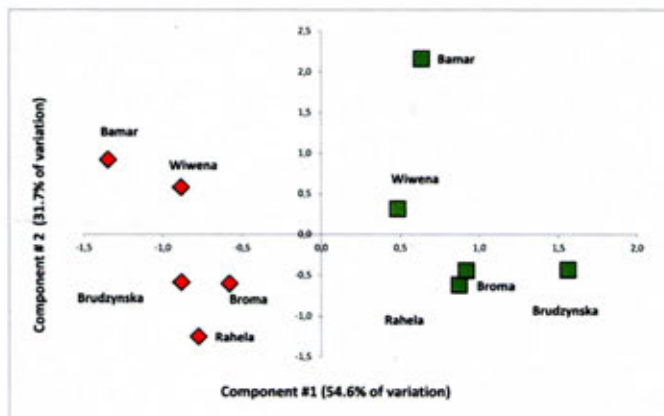
Doświadczenie zostało przeprowadzone w ramach podzadania w Programie Wieloletnim 2008-2013 (# PW3-3-00-0-03), w którym, m. in., oceniano przydatność traw dla celów fitoremediacyjnych. Poszukiwano odmian, które z jednej strony charakteryzowałyby się zdolnością do bioakumulacji jonów metali ciężkich w tkankach nadziemnych a z drugiej utrzymywałyby dobrą kondycję pomimo zanieczyszczeń gleby. Równoległe przeprowadzenie analiz: płomieniowej oraz fluorescencji Chl *a* pozwoliło na stworzenie systemu do przesiewowej oceny przydatności odmian do uprawy w skażonych środowiskach.

W liściach roślin poddanych działaniu jonów HM zaburzenia w procesie fotosyntezy powstają pod wpływem pojedynczych bądź skumulowanych zjawisk: 1/ bezpośredniego oddziaływania jonów HM z grupami tiolowymi, histydyłowymi i karboksylowymi białek; 2/ gromadzenia nadmiaru ROS powodujących uszkodzenia oksydacyjne polimerów komórkowych; 3/ substytucji kationów w centrach aktywnych białek oraz chlorofilu. Jony pierwiastków: Hg, Cu, Cd, Ni lub Zn mogą być podstawnikami centralnego jonu Mn^{2+} w białku PsbO stabilizującym PSII, tworząc kompleksy chlorofil-metal, a przez to obniżając wydajność kwantową PSII (Paunov i in., 2018). W badaniach terenowych zaburzenia fluorescencji Chl *a* są wynikiem synergistycznego oddziaływania HM i warunków pogodowych, a w

selekcji roślin przydatnych do celów fitoremediacyjnych poszukiwane są te w lepszej kondycji fizjologicznej i jednocześnie z wyższą koncentracją jonów HM w częściach nadziemnych.

Analiza PCA parametrów fluorescencji Chl *a* wykazała grupowanie badanych obiektów ze względu na ekspozycję na jony HM, bez specjalnego wyróżniania jednego z nich. Dwa komponenty tłumaczyły 86% zmienności; w skład pierwszego weszły wartości: F_M , F_V oraz F_1-F_5 natomiast drugiego parametry: RC_{ABS} , $(1-V_j)/V_j$ oraz PI. Na podstawie analizy profilu podwójnie znormalizowanych krzywych różnicowych (*vide*: wykres), wyodrębniono odmianę Rahela, która charakteryzowała się największą ilością zaabsorbowanych jonów ²metali ciężkich w liściach. Punkt przegięcia K na krzywej ΔW_{OJ} wyliczonej dla Raheli był nieznacznie dodatni w przeciwieństwie do ujemnych wartości na krzywych wyliczonych dla pozostałych odmian. Punkt ten ilustruje tempo reakcji fotolizy wody i ilość elektronów transportowanych wzdłuż ETC; jego wartość dodatnia

oznacza spowolnienie przepływu elektronów z centrów reakcyjnych chlorofilu (RC) w PSII w wyniku niższej aktywności OEC (*ang*: Oxygen Evolving Complex) w PSII i powolniejszej fotolizy wody. Ujemne wartości punktów przegięcia na krzywej ΔW_{OJ} , a więc i nieco szybszy przepływ elektronów w ETC roślin ze skażonego środowiska w porównaniu z referencyjnymi mogą wskazywać na udział askorbinianu jako donora elektronów (Lázaro i in. 2013; Srivastava i in. 1997; Tóth i in. 2007). Normalizacja w punktach O i K (krzywa ΔW_{OK}) umożliwia wizualizację punktu przegięcia L. Jego ujemna wartość wskazuje na większe grupowanie anten w PSII roślin z terenu skażonego w porównaniu z kontrolą (Janik i in. 2010; Gururani i in. 2012; Tóth i in. 2013), co jest faktem dla wszystkich odmian, oprócz odm. Rahela. Podobieństwa kształtu wszystkich znormalizowanych krzywych dla wszystkich odmian oprócz odm. Rahela mogą sugerować inną fizjologiczną reakcję na stres u tej odmiany. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano, że wszystkie badane odmiany oprócz odm. Rahela. pobrały z ziemi tylko taką ilość HM, która nie była dla nich zbyt toksyczna. U odmian tych, pod wpływem jonów HM, zaobserwowano przyspieszenie procesu fotosyntezy a więc i całego metabolizmu, co jest typową reakcją fizjologiczną roślin słabo tolerancyjnych bądź wrażliwych na stres. Tolerancyjne rośliny zazwyczaj uruchamiają dodatkowe mechanizmy obronne i przebudowują swój metabolizm w celu aklimatyzacji do zmienionych

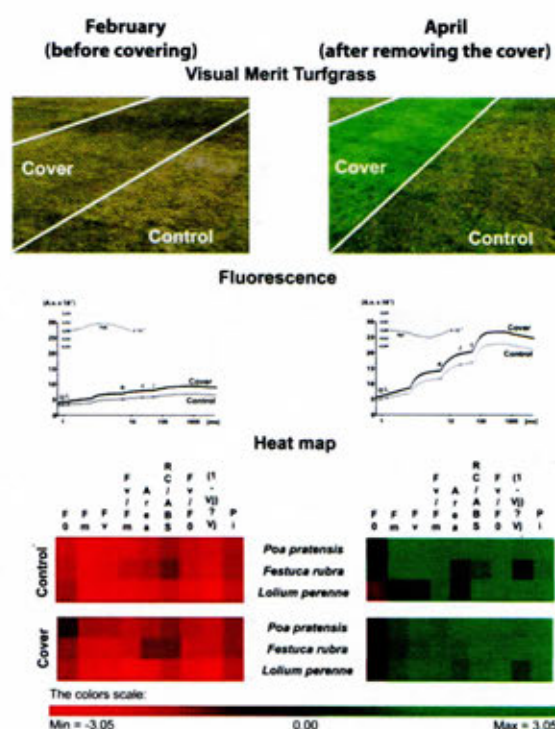


KR

warunków (Zagdańska 1995; Foyer i in. 2012). Wbrew oczekiwaniom, u odmiany Rahela nie zaobserwowano grupowania anten w PSII, pomimo iż skumulowała największą ilość HM w biomacie. Kostrzewa trzcinowa odm. Rahela w rzeczywistości radziła sobie lepiej ze stresem HM niż pozostałe odmiany, jej anteny chlorofilowe nie uległy agregacji. Dla potrzeb prezentacji osiągnięcia habilitacyjnego wykonałam analizę skupień połączoną z tzw. heatmap, która również pozwoliła na wyróżnienie odmiany Rahela. Na zamieszczonym diagramie cyfra „0” przy nazwie odmiany oznacza referencyjne stanowisko uprawy roślin, natomiast „1” stanowisko skażone. Kod koloru na „heatmap” wskazuje, że znormalizowane wartości parametrów fluorescencji Chl *a* w przypadku odmiany Rahela, uprawianej na glebie skażonej, przyjmują ujemne wartości, tzn., że wielkość każdego z nich jest niższa, niż średnia. Niskie wartości tych parametrów, są związane ze słabszą kondycją fizjologiczną rośliny. Fluorescencja liści odmiany Bamar uprawianej w warunkach referencyjnych charakteryzuje się najwyższymi wartościami względnymi parametrów, co wskazuje na jej najlepszą, w badanym zbiorze odmian, kondycję. Publikację H3 podsumowano wnioskami: 1/ fluorescencja Chl *a* jest dobrym narzędziem w badaniach fitoremediacyjnych; 2/ zanieczyszczenie gleby jonami ołowiu, kadmu i cynku wpłynęło na zmianę niektórych parametrów fluorescencji Chl *a* oraz na zmniejszenie plonu biomasy gatunków stokłosa bezostna oraz stokłosa spłaszczonego, odpowiednio odmiany Brudzyńska i Broma; 3/ kostrzewa trzcinowa, odm. Rahela, może alokować relatywnie dużą ilość jonów HM z gleby do części nadziemnej, bez istotnego zmniejszenia plonu biomasy i przy nieznacznym spadku wydajności fotosyntezy. Jest to cecha, której oczekuje się w przypadku roślin przeznaczonych do fitoremediacji.

Następnie takie samo podejście metodyczne wykorzystałam w badaniach reakcji traw gazonowych na przykrywanie darni (H4: *Turf Covering for Sport Season Elongation Cause No Stress for Grass Species as Detected by Chl a Fluorescence*).

Doświadczenie zostało zrealizowane równoległe do badań, prowadzonych przez dr Kamila Prokopiuka IHAR-PIB w ramach pracy doktorskiej pt.: „Wpływ wydłużenia wegetacji traw na jakość murawy boisk piłkarskich” (Prokopiuk, 2016; promotor dr hab. Grzegorz Żurek, prof. IHAR-PIB). Wyniki pomiarów fluorescencji Chl *a* nie stanowiły części rozprawy doktorskiej. Celem tych pomiarów było zgromadzenie dodatkowych danych wskazujących, że przykrywanie boisk nie indukuje stresu fizjologicznego w liściach badanych gatunków traw, w porównaniu z nieprzykrywaną darnią. Taki argument bywa podnoszony przez przeciwników tej prostej i taniej metody wydłużania okresu użytkowania boisk, w krajach o chłodniejszym klimacie, poza naturalny czas wegetacji roślin, zgodnie z terminami rozgrywek wyznaczanymi przez UEFA, od połowy lutego do połowy grudnia. Analiza krzywych fluorescencji wskazała, iż wszystkie badane odmiany znajdowały się w połowie lutego, przed przykryciem poletek doświadczalnych, w stanie spoczynku zimowego, krzywe fluorescencji charakteryzowały się niską wartością fluorescencji maksymalnej (F_p). W kwietniu, miesiącu optymalnych warunków dla wzrostu traw w klimacie umiarkowanym, wartość F_p była wysoka, co jest charakterystyczne dla roślin w dobrej kondycji fizjologicznej. Liście roślin kontrolnych charakteryzowały się podobną krzywą fluorescencji, niezależnie od gatunku, natomiast fluorescencja liści z przykrywanych darni wskazała na korzyści



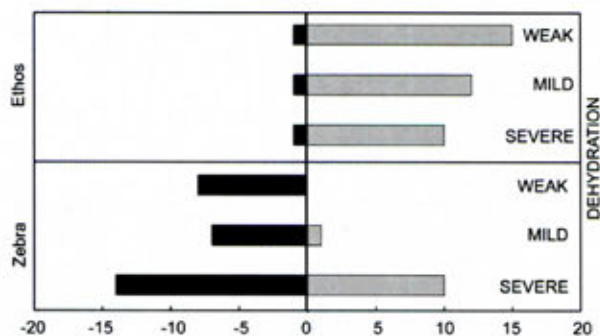
chlorofilu wykazała, że większość istotnych statystycznie różnic powstała pod wpływem 15% WSD w liściach odmiany tolerancyjnej, natomiast u odmiany wrażliwej różnice te narastały stopniowo.

Modyfikacje proteomu miały wzór nieco inny, niż zmiany parametrów fluorescencji. Pod wpływem słabego odwodnienia w liściach odmiany tolerancyjnej pojawiła się największa ilość białek różnicujących. Były to w przeszło 90% białka o zwiększonej ekspresji (*ang.: upregulated*). W liściach odmiany wrażliwej przy 50%WSD na żelach pojawiło się najwięcej białek różnicujących, zarówno o zwiększonej jak i zmniejszonej (*ang.: downregulated*) ekspresji. Zatrzymam się jedynie nad fragmentem wyników, który oceniam jako potencjalnie ważny z punktu widzenia selekcji nowych odmian o podniesionej tolerancji na suszę. W proteomie odmiany tolerancyjnej znaleziono jedynie 3 białka o zmniejszonej ekspresji: białko chloroplastowe wiążące LHC a/b w PSII (15% WSD) oraz małą podjednostkę Rubisco jedynie przy średnim i silnym stopniu odwodnienia tkanek (30 i 50% WSD). Również w liściach odmiany wrażliwej zanotowano degradację Rubisco, zarówno dużych jak i małych podjednostek, przy wszystkich stopniach odwodnienia, co jest charakterystyczną odpowiedzią na negatywne bodźce środowiskowe. Uważa się, że procesowi temu towarzyszy zmniejszanie wydajności fotosyntezy, o czym można wnioskować również na podstawie przebiegu krzywych fluorescencji jak i z dodatnich punktów przegięcia na wykresach ΔW_{OJ} (Pinheiro i Chaves 2011). W liściach odmiany wrażliwej procesy te są widoczne już w początkowej fazie odwodnienia (Miazek i in. 2017). Na podstawie analizy proteomicznej stwierdzono zwiększoną ekspresję aktywazy Rubisco oraz anhidrazy węglanowej w początkowym stadium odwodnienia liści u odmiany tolerancyjnej i degradację tych enzymów w liściach odmiany wrażliwej. Wzrost ekspresji aktywazy Rubisco i anhidrazy węglanowej przy jednoczesnej degradacji kompleksów LHC w PSII u odmiany tolerancyjnej może wskazywać na ochronę aparatu fotosyntetycznego przed nadmiarem fotonów. Natomiast zwiększona ekspresja LHC w PSI może wskazywać na intensyfikację fosforylacji cyklicznej i wytwarzanie ATP bez wytwarzania NADPH w celu stabilizacji komórkowej równowagi oksydacyjno-redukcyjnej (Yadav i in., 2017). W liściach odmiany tolerancyjnej, przy niewielkim odwodnieniu zachodzą procesy wskazujące na zachowanie niezaburzonej wydajności fotosyntezy (Perdomo i in. 2017). Analiza całego zestawu danych doprowadziła do konkluzji, że modyfikacja proteomu i ochrona aparatu fotosyntetycznego jest reakcją na pierwsze stadia odwodnienia liści u odmiany tolerancyjnej. Zasadzono, że selekcja roślin o stabilnej i wydajnej fotosyntezie w warunkach stresu środowiskowego jest podejściem w kierunku otrzymywania nowych, dobrze plonujących odmian.

Postanowiłam również sprawdzić, czy w oparciu o parametry fluorescencji Chl *a* można modelować stopień odwodnienia tkanek (WSD – *Water Saturation Deficit*) (**H6: Machine learning in determination of water saturation deficit in wheat leaves on basis of Chl *a* fluorescence parameters**).

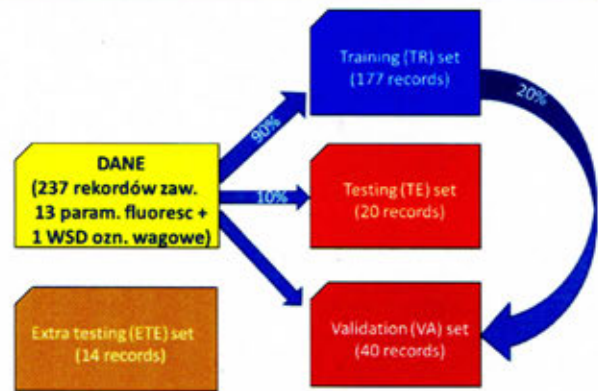
Doświadczenia wykonano w ramach grantów NCN-NN304267540 oraz NCBiR-PBS3/B8/19/2015 na siewkach i uprawianych w multiplatach roślinach pszenicy jarej różniących się tolerancją na odwodnienie, uprawianych w warunkach kontrolowanych. Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy można zbudować model pośredniej oceny WSD w oparciu o parametry fluorescencji Chl *a* gdyż, jak wyjaśniono we Wstępie, zmiany WSD są prostą cechą fenotypową odzwierciedlającą indukcję reakcji obronnych pod wpływem negatywnych bodźców środowiskowych (Kacperska 2004). Uważam, iż monitorowanie dynamiki zmian tego parametru będzie korzystne dla programów hodowli zbóż.

Modelowanie przeprowadzono na 237 rekordach danych obejmujących WSD oznaczane wagowo oraz 13 parametrów fluorescencji, wyznaczone przez oprogramowanie fluorymetru PocketPeA.

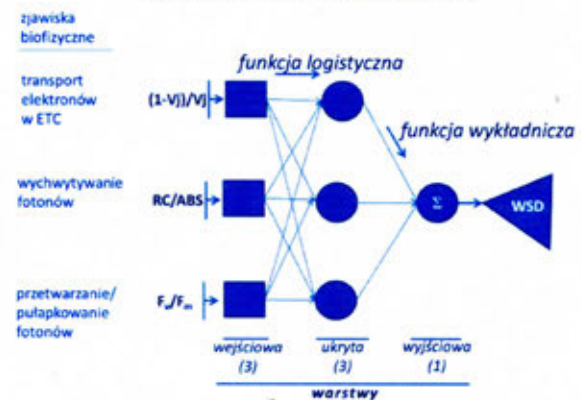


Dziewięćdziesiąt procent danych weszło do modelowania jako zbiór treningowy „TR” (w tym 20% to zbiór walidacyjny „VA”) a 10 % jako zbiór testujący „TE”. Do modelowania wprowadzono również zbiór 14 rekordów danych jako zewnętrzny zbiór testujący „ETE”. Poszukiwanie modelu prowadzono przez optymalizację wag. Każda kombinacja zmiennych wejściowych z zestawem 4 funkcji testowych (tożsamościowej, logistycznej, wykładniczej i tangensa hiperbolicznego) została przeliczona przez 2000 sztucznych sieci neuronowych typu MLP, dając sumarycznie 62 000 modeli przetestowanych przez oprogramowanie statystyczne. Za kryterium wyboru najlepszej sieci przyjęto: minimalny błąd globalny, maksymalną korelację ze zbiorem danych testujących oraz najprostszą strukturę sieci, co dało 155 modeli.

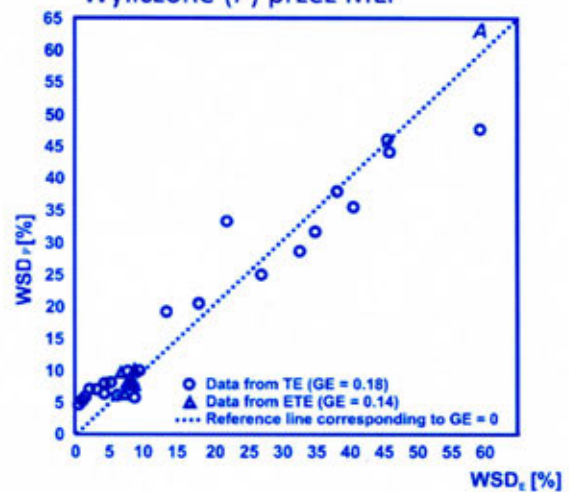
Najlepszy model, wyznaczający WSD z błędem globalnym $GE \leq 0.18$ i współczynnikiem korelacji $r \geq 0.98$ był zbudowany w oparciu o 3 zmienne wejściowe, 3 ukryte neurony i 12 wag. Godnym uwagi jest fakt, że najlepszy model neuronowy został wygenerowany w oparciu o 3 parametry fluorescencji Chl *a* opisujące aktywność funkcjonalną na trzech głównych etapach transformacji energii w PSII: 1/ wychwytywania fotonów światła (parametr RCABS odzwierciedla względną ilość centrów aktywnych w PSII absorbujących światło w pojedynczym zdarzeniu); 2/ pułpkowania energii (parametr F_v/F_m odnosi się do maksymalnej wydajności reakcji świetlnej i wydajności pułpkowania energii przez centra reakcji PSII; jest wartością odzwierciedlającą siłę reakcji świetlnych); 3/ transportu elektronów w ETC (parametr $((1 - V_j)/V_j)$ odzwierciedla potencjalną skuteczność wtórnego transferu elektronów prowadzącą do stabilizacji ładunków pierwotnie rozdzielonych w centrum reakcji PSII) (Strasser i in. 1995; Strasser i in. 2004; Goltsev i in. 2016; Paunov i in. 2018; Stirbet i in. 2018). Zasadniczo dehydratacja tkanek roślinnych prowadzi do zmian w hydratacji i polaryzacji makromolekuł komórkowych, co z kolei wpływa na modyfikacje konformacyjne polimerów obniżając ich funkcjonalność (Rumak i in. 2012; Malferrari i in. 2013; Ball 2017). Analiza wrażliwości sieci dostarczyła informacji o hierarchii danych wejściowych w ramach najlepszego modelu. Dla prawidłowego przewidywania WSD siewek pszenicy uprawianych w warunkach eksperymentalnych parametr $((1 - V_j)/V_j)$ był nośnikiem najważniejszych informacji o zmienności WSD, ok. dwukrotnie ważniejszym niż RC_{ABS} i sześciokrotnie niż F_v/F_m. Wykluczenie parametru $((1 - V_j)/V_j)$ z modelu osłabiało zdolność predykcji WSD przeszło ośmiokrotnie. Badania te są kontynuowane w celu zebrania danych uwzględniających jak największą zmienność WSD



Struktura najlepszej MLP (3-3-1)



Dane eksperymentalne (E) vs. Wyliczone (P) przez MLP



równoległe z parametrami fluorescencji Chl *a* aby móc zidentyfikować wszystkich czynniki modyfikujące fluorescencję Chl *a* i w rezultacie zaburzące prawidłowe przewidywanie WSD. W 2018 r. rozpoczęliśmy modelowanie WSD na podstawie pomiarów polowych. Model został wygenerowany przez dr inż. M. Janaszek-Mańkowską (SGGW) przy użyciu oprogramowania Statistica.

Wnioski Osiągnięcia Habilitacyjnego

Nowoczesne metody analizy funkcjonalnej genów oraz mapowania w oparciu o markery molekularne uzyskiwane technikami generującymi duże ilości danych wymagają nowych wysokoprzepustowych metod fenotypowania materiałów hodowlanych oraz metod przetwarzania danych typu „big data” (H1)

Uczenie maszynowe nienadzorowane (analiza PCA, analiza skupień) i nadzorowane (sieci neuronowe) jest podejściem umożliwiającym przetwarzanie dużych zbiorów danych. Można je wykorzystać do wnioskowania w oparciu o wartości oraz parametry fluorescencji Chl *a* (H2-6)

Krzywe ΔW_{OJ} wykreślane na podstawie danych fazy szybkiej fluorescencji Chl *a* (OJIP) pozwalają na różnicowanie materiałów roślinnych tolerancyjnych i wrażliwych na stresy abiotyczne

„Heat maps” zbudowane w oparciu o hierarchiczne grupowanie parametrów Chl *a* są narzędziem do wizualnego wykrywania różnic między badanymi materiałami roślinnymi w odpowiedzi na stres abiotyczny

Sieć neuronowa MLP umożliwia modelowanie statystyczne WSD w oparciu o parametry fluorescencji Chl *a*, co pozwala na oszacowanie stopnia odwodnienia liści. Obecny model jest funkcjonalny dla siewek pszenicy uprawianych w warunkach kontrolowanych

Modyfikacja proteomu i ochrona aparatu fotosyntetycznego jest reakcją na pierwsze stadia odwodnienia liści siewek pszenicy, odmiany tolerancyjnej. Selekcja roślin o stabilnej i wydajnej fotosyntezie w warunkach stresu środowiskowego jest sugerowanym podejściem selekcyjnym

Zaproponowane metody fenotypowania mogą być wykorzystane do przesiewowej oceny materiałów hodowlanych (pojedynczy pomiar fluorescencji trwa < 10 sec).

VI. Literatura

- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* 63:43-57.
- Asseng S, Ewert F, Rosenzweig C, Jones JW, Hatfield JL i in. 2013. Uncertainty in simulating wheat yields under climate change. *Nature Clim. Change* 3:827-832.
- Ball P. 2017. Water is an active matrix of life for cell and molecular biology. *PNAS* 114:13327-13335.
- Belko N, Zaman-Allah M, Diop NN, Cisse N, Zombre G, Ehlers JD, Vadez V. 201. Restriction of transpiration rate under high vapour pressure deficit and non-limiting water conditions is important for terminal drought tolerance in cowpea. *Plant Biol* 15:304-316.
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* 27:411 - 424.
- Bilska-Kos A, Szczepanik J, Sowinski 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.). *J Plant Physiol* 205:75-79.
- Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crop Res* 112:119-123.
- Blum A. 2011. Drought resistance – is it really a complex trait? *Funct Plant Biol* 38:753-757.
- Brooks RJ, Semenov MA, Jamieson PD. 2001. Simplifying sirius: Sensitivity analysis and development of a meta-model for wheat yield prediction. *Eur J Agr* 14:43-60.
- Craufurd PQ, Vadez V, Jagadish SVK, Prasad PVV, Zaman-Allah M. 2013. Crop science experiments designed to inform crop modeling. *Agr Forest Meteorology* 170:8-18.
- Dobra J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prasil IT, Haisel D, Gaudinova A, Havlova M., Gubis J, Vankova R. 2010. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline contents. *J Plant Physiol* 167:1360-1370.
- Foyer CH, Noctor G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol* 155:2-18.
- Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J. 2012. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 63:1637-1661.
- Garstka M. 2007. Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy. *Postępy Biologii Komórki* 34:445-476.
- Gietler M, Nykiel M, Zagdańska BM. 2016a. Changes in the reduction state of ascorbate and glutathione, protein oxidation and hydrolysis leading to the development of dehydration intolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings. *Plant Growth Reg* 79:287-297.
- Gietler M, Nykiel M, Orzechowski S, Fettke J, Zagdańska B. 2016b. Proteomic analysis of S-nitrosylated and S-glutathionylated proteins in wheat seedlings with different dehydration tolerances. *Plant Physiol Biochem* 108:507-518.
- Gietler M, Nykiel M, Orzechowski S, Fettke J, Zagdańska B. 2017. Protein carbonylation linked to wheat seedling tolerance to water deficiency. *Envir Exp Bot*. 137C: 84-95.
- Goltsev VN, Kalaji HM, Paunov M, Bąba W, Horacek T, Mojski J, Kociel H, Allakhverdiev SI. 2016. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ J Plant Physiol* 63:869-893.
- Grudkowska M, Zagdańska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol* 51:609-624. http://www.actabp.pl/pdf/3_2004/609.pdf.
- Grudkowska M., Zagdanska B. (2010) Acclimation to frost alters proteolytic response of wheat seedlings to drought. *J Plant Physiol* 167:1321-1327.
- Gururani MA, Upadhyaya CP, Strasser RJ, Woong YJ, Park SW. 2012. Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Physiol Biochem* 58:182-194.
- Jamieson PD, Semenov M., Brooking I., Fracois G. 1998. Sirius: a mechanistic model of wheat response to environmental variation. *Eur J Agron* 8:161-179.
- Janik E, Maksymiec W, Mazur R, Garstka M, Gruszecki WI. 2010. Structural and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmium-or copper-treated *Secale cereale*. *Plant Cell Physiol* 51:1330-1340.
- Kacperska A. 2004. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol Plant* 122:159-168.
- Kalaji HM, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Strasser RJ, Govindjee. 2012. Experimental *in vivo* measurements of light emission in plants: A perspective dedicated to David Walker. *Photosynth Res* 114:69-96.
- Kholova J, Sairam R, Meena R. 2010. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. *Acta Physiol Plant* 32:477-486.
- Kholová J, Hash CT, Kocová M, Vadez V. 2010. Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought? *Envir Exp Bot* 71:99-106.
- Kholová J, Murugesan T, Kaliamoorthy S, Malayee S, Baddam R, Hammer GL, McLean G, Deshpande S, Hash CT, Craufurd PQ, Vadez V. 2014. Modelling the effect of plant water use traits on yield and stay-green expression in sorghum. *Funct Plant Biol* 41:1019-1034.
- Lázaro JJ, Jiménez A, Camejo D, Iglesias-Baena I, Martí MC, Lázaro-Payo A, Barranco-Medina S, Sevilla F. 2013. Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Front Plant Sci* 4:460.
- Levitt J. 1985. Relationship of dehydration rate to drought avoidance, dehydration tolerance and dehydration avoidance of cabbage leaves, and to their acclimation during drought-induced water stress. *Plant Cell Envir* 8:287-296.
- Malferrari M, Mezzetti A, Francia F, Venturoli G. 2013. Effects of dehydration on light-induced conformational changes in bacterial photosynthetic reaction centers probed by optical and differential FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827:328-339.
- Miazek A, Nykiel M, Rybka K. 2017. Drought tolerance depends on the age of the spring wheat seedlings and differentiates patterns of proteinases. *Rus J Plant Physiol* 64:333-340.

- Oukarroum A, Schansker G, Strasser RJ. 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiol Plant* 137:188-189.
- Paunov M, Koleva L, Vassilev A, Vangronsveld J, Goltsev V. 2018. Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *Int J Mol Sci* 19:787.
- Perdomo JA, Capo-Bauca S, Carmo-Silva E, Galmes J. 2017. Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Front Plant Sci* 8:490.
- Pinheiro C, Chaves MM. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot* 62:869-882.
- Porter JR, Semenov MA. 2005. Crop responses to climatic variation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2021-2035.
- Prokopiuk K. 2016. The effect of growing season extension on the quality of football pitches sward (in Polish). Ph. D. Thesis, Plant Breeding and Acclimatization Institute-PIB, Radzikow, Poland, pp. 161 (in Polish).
- Rapacz M, Sasal M, Kalaji HM, Kościelniak J. 2015. Is the OJIP Test a Reliable Indicator of Winter Hardiness and Freezing Tolerance of Common Wheat and Triticale under Variable Winter Environments? *PLoS ONE* 10:e0134820.
- Rucińska-Sobkowiak R. 2016. Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiol Plant* 38:257.
- Rumak I, Mazur R, Gieczewska K, Koziol-Lipińska J, Kierdaszuk B, Michalski WP, Shiell BJ, Venema JH, Vredenberg WJ, Mostowska A, Garstka M. 2012. Correlation between spatial (3D) structure of pea and bean thylakoid membranes and arrangement of chlorophyll-protein complexes. *BMC Plant Biology* 12:72.
- Rybka K. 2017. Fenotypowanie roślin. Konferencja EPPN 2020 w Tartu/ Estonia. *Biul IHAR* 282:161-174.
- Rybka K, Oleksiak T. 2016. Czasowe niedobory wody a postęp biologiczny w hodowli zbóż. *W: Dembek W i in. (Ed.), Innowacyjne metody gospodarowania zasobami wodnymi w rolnictwie, CDR, Brwinów: 261-271.*
- Semenov MA, Stratonovitch P. 2013. Designing high-yielding wheat ideotypes for a changing climate. *Food Energy Security* 2:185-196.
- Semenov MA, Stratonovitch P, Alghabari ., Gooding MJ. 2014. Adapting wheat in Europe for climate change. *Journal of Cereal Science* 59:245-256.
- Sobkowiak A, Jończyk M, Adameczyk J, Szczepanik J, Solecka D, Kuciara I, Hetmańczyk K, Trzcinska-Danielewicz J, Grzybowski M, Skoneczny M, Fronk J, Sowiński P. 2016. Molecular foundations of chilling-tolerance of modern maize. *BMC Genomics* 17:125.
- Srivastava A, Guissé B, Greppin H, Strasser RJ. 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320:95-106.
- Stirbet A, Govindjee. 2012. Chlorophyll *a* fluorescence induction: A personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynthesis Res* 113:15-61.
- Stirbet A, Lazar D., Kromdijk J., Govindjee. 2018. Chlorophyll *a* fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica* 56:86-104.
- Stirbet A, Rizinchenko GY, Rubin AB, Govindjee. 2014. Modeling chlorophyll *a* fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry-Moscow* 79:291-323.
- Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee. 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61:32-42.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. *W: Papageorgiou G. and Govindjee (Ed.), Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Springer Science+Business Media B.V. pp. 321-362.*
- Sulkiewicz M., Ciereszko I. 2016. Fluorescencja chlorofilu *a*- historia odkrycia i zastosowanie w badaniach roślin. *Kosmos* 65:103-115.
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G. 2013. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol Plant* 148:161-175.
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767:295-305.
- Tsimilli-Michael M, Strasser RJ. 2013. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. *Photosynthesis Res* 117:289-320.
- Vadez V, Kholova J, Zaman-Allah M, Belko N. 2013a. Water: the most important 'molecular' component of water stress tolerance research. *Funct Plant Biol* 40:1310-1322.
- Vadez V, Kholová ., Yadav R, Hash C. 2013b. Small temporal differences in water uptake among varieties of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) are critical for grain yield under terminal drought. *Plant Soil* 371:447-462
- Vadez V, Kholova J, Medina S, Kakkera A, Anderberg H. 2014. Transpiration efficiency: new insights into an old story. *J Exp Bot* 65:6141-6153
- Vadez V, Rao S, Kholova J, Krishnamurthy L, Kashiwagi J, Ratnakumar P, Sharma K, Bhatnagar-Mathur P, Basu P. 2008. Root research for drought tolerance in legumes: *Quo vadis?* *J Food Legumes* 21:77-85.
- Wolf J, Evans L, Semenov M, Eckersten H, Iglesias A. 1996. Comparison of wheat simulation models under climate change. I. Model calibration and sensitivity analyses. *Climate Res* 7:253-279.
- Yadav KNS, Semchonok DA, Nosek L, Kouřil R, Fucile G, Boekema EJ, Eichacker LA. 2017. Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b6f, light-harvesting complex II and NDH. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858:12-20.
- Zagdańska B. 1995. Energy metabolism in plants under water deficits. *Acta Biochim Polon* 42:281-289.

Krystyna Rybka¹⁸
KR

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Grant NCBiR PBS3/B8/19/2015 pt.: „Opracowanie oraz wdrożenie metody skrócenia cykli hodowlanych przez optymalizację warunków świetlnych w procesie hodowli zbóż”, od 2015.06.01 do 2018.05.31

dotychczas opublikowane prace: [Załącznik 3 Suplementy #4, #6, #7]

Grant został zrealizowany przez Konsorcjum IHAR-PIB & HR-Strzelce

Szczegółowe wyniki są w przygotowaniu do publikacji. Będą wchodziły w zakres rozpraw doktorskich dwóch osób. W związku z tym przedstawiam jedynie wyszczególnienie wyników:

- Wybrano 2 typy modułów oświetleniowych charakteryzujących się widmem optymalnym dla potrzeb uprawy zbóż w szklarni oraz niskim wskaźnikiem poboru prądu
- Wytypowano światło monochromatyczne wpływające na skrócenie czasu jarowizacji pszenicy ozimej
- Wytypowano światło odpowiednie dla podniesienia wydajności uzyskiwania regenerantów DH (na przykładzie jęczmienia)
- Wytypowano światło odpowiednie dla wzrostu roślin (widmo złożone) oraz suszenia (widmo monochromatyczne) i kiełkowania (widmo monochromatyczne) niedojrzałych ziarniaków (na przykładzie pszenicy) w celu podniesienia indeksu kiełkowania. Nie udało się uzyskać wyników lepszych niż kondycjonowanie ziarna w chłodzie
- Analiza proteomiczna wykazała, że optymalne lampy LED nie indukują reakcji odpowiedzi na stres w liściach pszenicy

Porastanie przedzirnne pszenżyta (PHS, ang.: *PreHarvest Sprouting*)

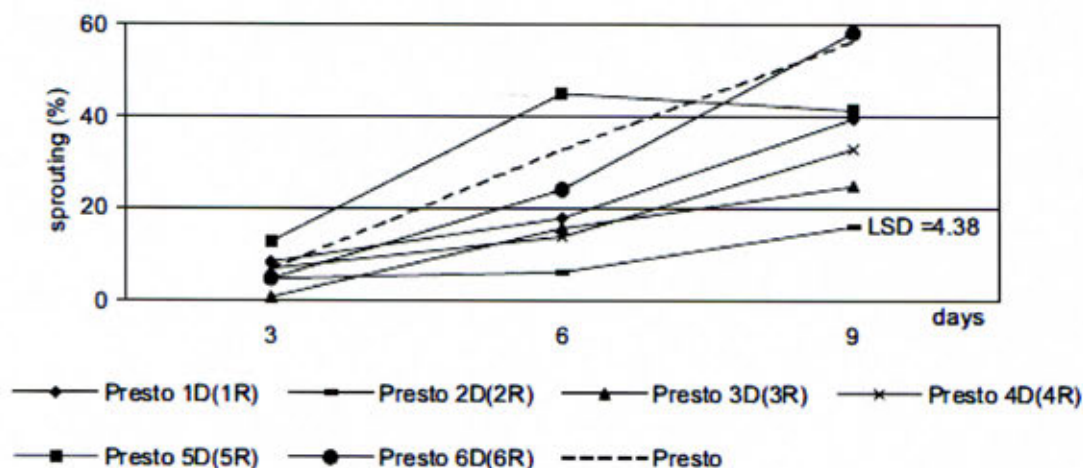
publikacje [Załącznik 3 Suplementy #16, #50, #51]

Poszukiwanie cech warunkujących tolerancję na PHS odmian, materiałów mieszańcowych i linii podwojonych haploidów (DH) pszenżyta prowadzono metodami fizjologicznymi i molekularnymi. Ocenę odporności na PHS prowadzono stając indeks kiełkowania ziarniaków

$GI [\%] = \sum_{n=1}^{n=9} [(l. \text{ siełk. ziarn.} / n_{\text{dzień}}) * (100/30)]$. Wyznaczono wskaźnik korelacji ($R = -0,81$) pomiędzy indeksem kiełkowania (GI) ziarniaków o wilgotności $\leq 37\%$, a porastaniem ziarna w kłosach w 7 dniu testu indukowanego porastania. Indeks kiełkowania oznaczono dla 169 odmian oraz linii DH. Odmiany Algozo, Atletico i Leonito charakteryzowały się niskim indeksem kiełkowania ziarniaków, a więc potencjalnie wyższą odpornością na porastanie, natomiast odmiany Grenado, Moderato i Pigmej charakteryzowały się wysokim indeksem kiełkowania ziarniaków, czyli podatnością na porastanie. Wśród badanych materiałów 32 linie określono jako tolerancyjne, natomiast 60 linii określono jako zdecydowanie wrażliwe, w porównaniu z odmianami pszenżyta.

Badania molekularne odporności na porastanie prowadzono w oparciu o mapę genetyczną pszenżyta. QTL odporności na porastanie, wyrażane jako indeks kiełkowania ziarniaków (GI), zmapowano na podstawie trzyletnich badań. Znalezione 11 loci GI dodatnio sprzężonych z porastaniem, na chromosomach: 1A (dwa loci), 3B, 4A, 5A (dwa loci), 5B, 6A, 6B, 7R (dwa loci) oraz 5 loci ujemnie sprzężonych z porastaniem, na chromosomach: 2A (dwa loci), 4R, 5A i 7B. Sekwencje różnicowe, uzyskane techniką cDNA-AFLP przyporządkowano in silico grupom chromosomowym pszenicy na podstawie danych z baz NCBI oraz GrainGenes. Na chromosomie 1A zlokalizowano klon 14-47-4; na 2A - klon 30-71-1, który dodatkowo zlokalizowano na chromosomach 4A, 3B i 5A; na chromosomie 3B - klon 1-2-2; na 6A i 6B - klon 9-18-4; na 7A - klony 24-59-1 oraz 23-58-1; na 7B - klony 13-43-1, 31-75-1 i 23-58-1. W ramach projektu zostały wykonane 2 prace magisterskie przez studentki z SGGW, pt.: „Modyfikacja procesów kiełkowania ziarniaków pszenżyta przez cukry” oraz „Modyfikacja procesów kiełkowania ziarniaków pszenżyta przez kwas abscyzynowy”. Badając linie substytucyjne Presto,

zidentyfikowano chromosomy R w genomie pszenżyta obniżające odporność na porastanie; dane opublikowano w Journal of Applied Genetics.



Trzyletnie staże po-doktorskie

- Japonia- staż po-doktorski w National Institute of Agrobiological Resources-Tsukuba, klonowanie pozycyjne genów odporności ryżu Pi-ta2 oraz Pib publikacje [Zał. 3 Supl #17- #19]
- USA- staż po-doktorski w Uniwersytecie Kalifornijskim w Riverside, USA mapowanie genetyczne i fizyczne translokacji w genomie pszenicy publikacje [Zał. 3 Supl #11, #12, #14, #15]

Planując staż po-doktorski poszukiwałam laboratorium zajmującego się badaniem polimerów ściany komórkowej ziarniaków. Uzyskałam stypendium rządu japońskiego a mój opiekun naukowy, dr Shinji Kawasaki, pół roku przed moim wyjazdem z Polski, zaproponował bym włączyła się w realizację tematu: "Klonowanie pozycyjne genów odporności na zarazę ryżową". To było wielkie wyzwanie- zmiana warsztatu pracy laboratoryjnej. Przed wyjazdem do Japonii odbyłam kwartalny staż w laboratorium prof. Andrzeja Jerzmanowskiego (UW) w zakresie podstawowych technik biologii molekularnej. Pracując w Japonii ugruntowałam znajomość metod biologii molekularnej: począwszy od podstawowych, takich jak ekstrakcja i czyszczenie DNA i RNA, następnie wszelkich technik niezbędnych do markerowania a także do konstrukcji i przeglądania bibliotek genomowych i bibliotek cDNA, konstrukcji map genetycznych i fizycznych (trawienie, identyfikacja i izolacja fragmentów DNA, przygotowywanie wektorów, ligacje, transformacje bakterii, elektroforezy, sekwencjonowanie, blotowanie, techniki PCR, hybrydyzacje).

Jako zespół pracowaliśmy najpierw nad znalezieniem markerów molekularnych (technikami RFLP i RAPiD-PCR) genów odporności na zarazę ryżu zlokalizowanych na drugim i dwunastym chromosomie, wykorzystując linie bliskoizogeniczne podgatunku *japonica*, w których fragmenty chromosomów były podstawione homeologicznymi fragmentami podgatunku *indica*. Oznaczaliśmy dystanse fizyczne pomiędzy markerami prowadząc hybrydyzacje sond do DNA genomowego rozdzielanego w pulsującym polu elektrycznym (elektroforeza CHEF), następnie konstruowaliśmy biblioteki w wektorze Cosmid o średniej wielkości insertu ok. 40 kbp, poszukując odpowiednich klonów przez hybrydyzację z sondami RFLP. Zakończyłam staż w Japonii, gdy zostały zidentyfikowane klony z rejonu wyznaczonego przez markery flankujące. Wyniki naszych badań opisaliśmy w czterech artykułach opublikowanych w indeksowanych pismach; cząstkowe rezultaty prezentowaliśmy w ramach licznych konferencji naukowych na terenie Japonii oraz w trzech konferencjach międzynarodowych. Pracując w Japonii

szkoliłam również personel, głównie w technikach PCR. Dziś zdumiewa mnie fakt, że wywiązałam się z tego obowiązku, pomimo ogromnej bariery językowej i kulturowej.

Rezultatem mojej pracy w Japonii, który mnie najbardziej zainteresował, było stwierdzenie, że proporcje dystansów na mapach genetycznych i fizycznych zmieniają się w zależności od położenia mapowanego fragmentu względem centromeru. W rejonach dystalnych 1cM mapy genetycznej ryżu przekładał się na ok. 100 kbp kontigu BAC, w rejonach proxymalnych dystans rósł ponad dziesięciokrotnie. Było to nowatorskie spostrzeżenie w połowie lat dziewięćdziesiątych. Tezę tę potwierdziłam w latach późniejszych konstruując mapy genetyczne pszenicy heksaploidalnej.

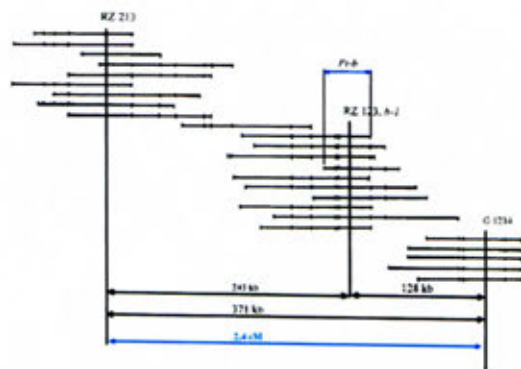
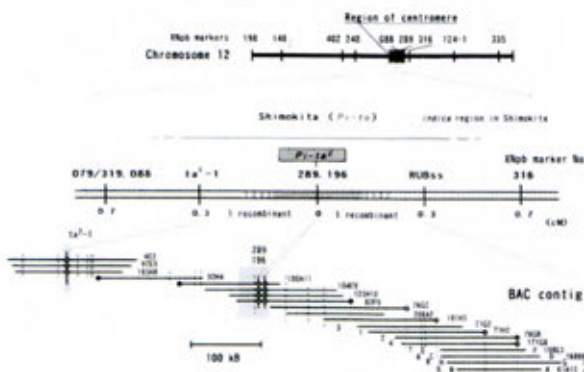
Wyjeżdżając na staż do Japonii pozostawiłam technika realizującego doświadczenia w ramach badań nad biochemicznymi podstawami odporności pszenżyta na patogen *Stagonospora nodorum*- który to temat pojęłam wspólnie z prof. E. Arseniukiem. Współpracę podsumowaliśmy doniesieniem konferencyjnym i artykułem opublikowanym w *Acta Physiologiae Plantarum*.

Moje zainteresowanie pozorną zmianą długości chromosomów w zależności od odległości względem centromeru - wyrażone jako pytanie do wykładającego gościnnie w IHAR, prof. Adama Łukaszewskiego, polskiego cytogenetyka pracującego na stanowisku profesora w University of California spowodowało, że Profesor zaprosił mnie do współpracy w jego laboratorium, z czego z chęcią skorzystałam. Pracując w University of California wykorzystałam swoją wiedzę z zakresu biologii molekularnej do konstrukcji mapy genetycznej chromosomów 1B i 2B w oparciu o linie substytucyjne pszenicy. Poszerzyłam swój warsztat samodzielnie opanowując techniki hybrydyzacji *in situ* oraz o umiejętność przeszukiwania molekularnych baz danych. Od podstaw zorganizowałam laboratorium badań molekularnych i wyszkoliłam trzech studentów.

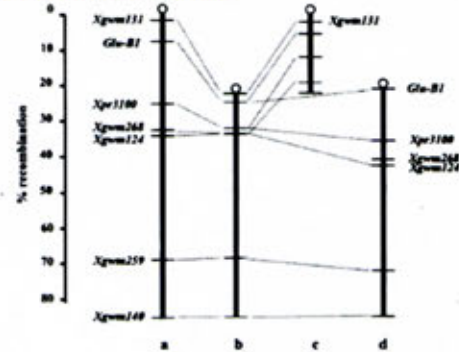
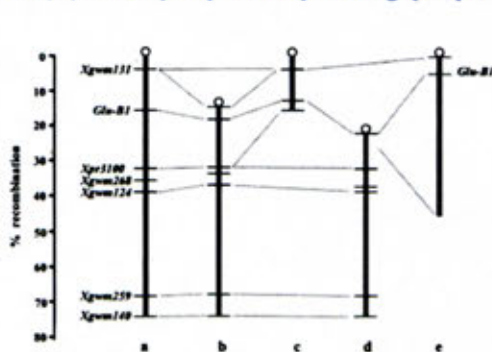
Klamra spinająca staże podoktorskie: względność dystansów genetycznych

Ryż: locus Pi-ta2, region centromerowy na chromosomie 2
locus PiB, region telomerowy na chromosomie 12

0.3 cM > 1 MB
2.4 cM = 371 kb



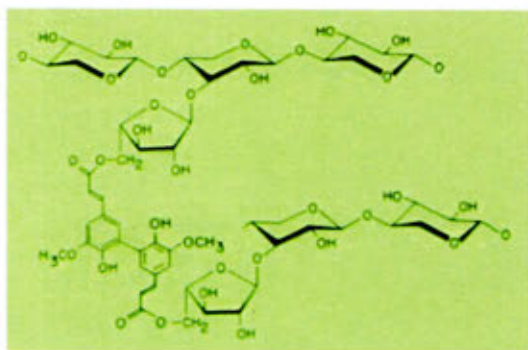
Pszenica: wpływ deficencji i delecji na względną długość chromosomu 1BL



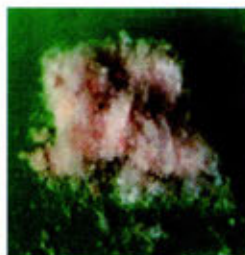
Przytaczam wykresy w z moich publikacji z zagranicznymi zespołami. Na mapach chromosomów ryżu widać, że względna długość chromosomu wyrażana w centymorganach, ma różną długość fizyczną w zależności od lokalizacji na chromosomie: 1 cM części dystalnej chromosomu jest fizycznie krótszy niż proksymalnej. Natomiast mapy chromosomu 1BL pszenicy pokazują, że w zależności od odległości od telomerów, dystans genetyczny maleje pomiędzy dwoma tymi samymi markerami na zmodyfikowanym przez deficjencje bądź delecje chromosomie.

Praca doktorska: Zależność między właściwościami nieskrobiowych polisacharydów a strawnością białka ziarna linii wsobnych żyta, promotor : prof. dr hab. Konstancja Raczyńska-Bojanowska
publikacje [Zal 3 Supl #19 - #29]

Kończąc studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego byłam zdecydowana wejść na drogę kariery naukowej, jednakże poszukiwałam dziedziny bardziej związanej z naturą, niż elektrochemia w środowisku niewodnym pomimo, że moja praca magisterska pt.: "Elektroredukcja tris(acetyloacetono)kobaltu III na elektrodzie rtęciowej", została opublikowana w 1987 roku w Polish J Chem. Szczęśliwie, pani prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska, kierownik Zakładu Biochemii IHAR poszukiwała w tym czasie chemika, by rozwinąć prace nad biochemicznymi podstawami wartości żywieniowej ziarna żyta, który to temat realizowała współpracy z prof. dr hab. Marią Rakowską i dr Lucjanem Madejem. Krótko po rozpoczęciu pracy w Zakładzie Biochemii Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin wdrożyłam technikę oznaczania zawartości włókna pokarmowego w ziarnie zbóż wg. zmodyfikowanej metody Asp'a, którą to metodę poznałam dzięki , wtedy mgr a obecnie prof. dr hab. Danucie Boros. Pracując wspólnie, w interdyscyplinarnym zespole, stwierdziliśmy, że 1/ zarówno zawartość rozpuszczalnych polisacharydów nieskrobiowych jak i lepkość ekstraktu wodnego śruty są ujemnie skorelowane z wartością żywieniową ziarna linii wsobnych żyta, wykorzystywanego jako pasza dla zwierząt. Wynik ten był głównym rezultatem mojej rozprawy doktorskiej, w której ponadto stwierdziłam, że 2/ białko jest integralnym składnikiem frakcji niestrawnych; 3/ zawartość rozpuszczalnej frakcji niestrawnej *in vitro* w przeciwieństwie do frakcji nierozpuszczalnej jest skorelowana ze strawnością białka *in vivo* i może stanowić test w selekcji linii wsobnych żyta; 4/ istnieje możliwość oznaczania tej frakcji metodą spektrofotometrii w bliskiej podczerwieni (NIT), 5/ istnieje zmienność genetyczna zawartości tej frakcji w ziarnie linii wsobnych żyta, mimo znacznej zmienności w latach.



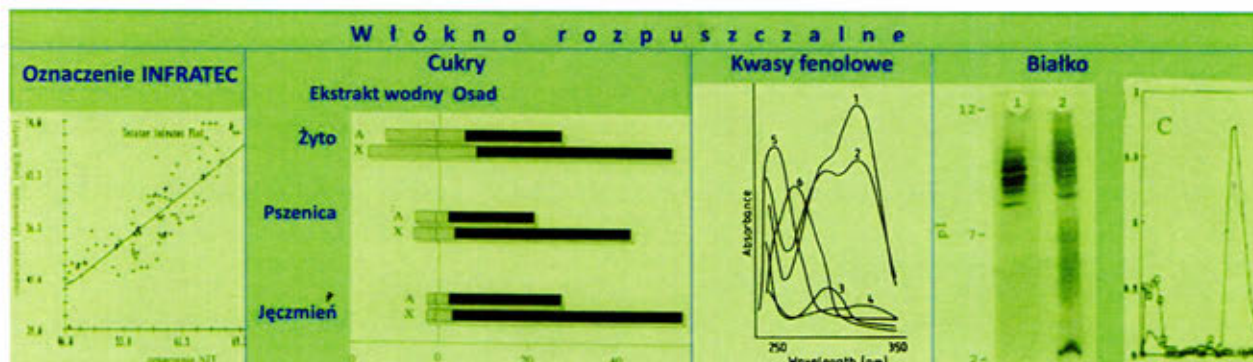
mostek diferulowy w cząsteczce arabinoksyłanu



Liofilizaty włókna rozpuszczalnego:
ziarna pszenicy ziarna żyta

Postawiliśmy również tezę, że o rozpuszczalności i właściwościach biologicznych arabinoksyłanów decydują różnice masy cząsteczkowej i konformacja cząsteczek uwarunkowana rozmieszczeniem podstawników arabinozowych. Teza ta została opublikowana w pracy wydanej w Cereal Chemistry (1993) i jest to do dnia dzisiejszego trzecią pod względem liczby cytowań moją publikacją (89 cytowań wg GoogleScholar z dn. 22.01.2019). Śledzę uważnie rozwój badań nad polimerami ściany komórkowej,

gdyż od lat jestem przekonana- a wyniki eksperymentalne to coraz bardziej potwierdzają- że zmiany konformacji polimerów ściany, indukowane przez bodźce bio-chemiczne i fizyczne (np. hydratacja), są ważnym czynnikiem regulacji odpowiedzi roślin na negatywne bodźce środowiskowe. Zawartość nieskrobiowych polisacharydów w ziarnie i lepkość ekstraktu wodnego są parametrami stale wykorzystywanymi w ocenie jakości ziarna, aczkolwiek pierwotne procedury uległy zasadniczym zmianom. Mój udział w badaniach nad wartością żywieniową ziarna żyta zakończył się po obronie pracy doktorskiej. Wyniki prac całego zespołu zostały podsumowane przez panią prof. Bojanowską w monografii "Rye toward better quality", wydanej jako tom Plant breeding and Seed Science w 1994 roku. W monografii tej jestem współautorem 7 rozdziałów.



Podziękowania

Serdecznie dziękuję Przełożonym oraz Koleżankom i Kolegom z którymi pracuję i pracowałam w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin IHAR-PIB w Radzikowie oraz w innych placówkach.

Moje podziękowania szczególnie kieruję do pani prof. dr hab. Konstancji Raczyńskiej-Bojanowskiej za ugruntowanie w przekonaniu, że trzeba zgłębiać interesujące tematy, nie uciekając przed tym co trudne.

Dziękuję również moim Nauczycielom zarówno akademickim, jak i z niższych poziomów kształcenia, nie tylko za solidne podstawy wiedzy lecz również za wpojenie nawyku dbałości o sposób wyrażania myśli.

I w końcu dziękuję Rodzinie i Przyjaciółom, gdyż to z nimi idę przez życie.

Informacja dotycząca finansowania badań zgłoszonych jako Osiągnięcie Habilitacyjne

Narodowe Centrum Nauki: grant NCN-NN304267540

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju: grant NCBiR-PBS3/B8/19/2015

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowy Instytut Badawczy: temat IHAR-PIB-1-1-01-4-02

Krystyna Rybka
dr Krystyna Rybka

KR 23