

Załącznik nr 2

Autoreferat

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

Dr Maria Stolarz

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii

Lublin 2018

Dr Maria Stolarz
Zakład Biofizyki
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
email: maria.stolarz@poczta.umcs.lublin.pl
tel.: 81 537 50 80

AUTOREFERAT

Imię i nazwisko

Maria Stolarz

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł magistra:

22.06.1993 Dyplom magistra biologii, specjalność biologia ogólna.

Praca magisterska pt. „Flora roślin naczyniowych miasta Nowego Sącza” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Promotor: prof. dr hab. Florian Świąś

Stopień doktora:

7.04.2004 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Praca doktorska pt. „Ruchy cyrkumnutacyjne łodygi a aktywność elektryczna *Helianthus annuus* L.” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Zawadzki

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.11.1993 – 30.09.1995 asystent w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

1.10.1995 - 21.06.2004 asystent w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

22.06.2004 – do chwili obecnej, adiunkt w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Praca magisterska

Tytuł magistra biologii (specjalność: biologia ogólna) uzyskałam w 1993 roku na podstawie pracy magisterskiej pt. „Flora roślin naczyniowych miasta Nowego Sącza” wykonanej w Zakładzie Geobotaniki, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Floriana Świąsa. Środowisko naturalne cechuje się specyficznym dla danego terenu składem gatunkowym roślin. Rozmieszczenie roślin w środowisku, ich wzajemny wpływ na siebie, jak również wpływ warunków środowiskowych na obecność charakterystycznego składu florystycznego jest przedmiotem wielu badań geobotanicznych. W obszarze moich zainteresowań była roślinność synantropijna, której obecność związana jest z aktywnością człowieka, w tym szczególnie zjawisko przenoszenia obcych gatunków na dany teren poprzez, między innymi, systemy komunikacyjne oraz zjawisko zanikania niektórych gatunków na danym obszarze. Środowisko miejskie posiada charakterystyczną florę, która w szczególnie dynamiczny sposób podlega zmianom na skutek działalności człowieka. Ważna zatem jest charakterystyka składu gatunkowego i dokumentacja florystyczna w danym okresie czasu i na danym terenie, która umożliwia badanie zmienności i migracji roślin w długiej perspektywie czasowej. Celem mojej pracy magisterskiej było sprawdzenie, jaki jest skład gatunkowy wybranego terenu i porównanie go z danymi literaturowymi. W wyniku mojej pracy powstał zielnik zdeponowany w Zakładzie Geobotaniki, liczący 249 gatunków roślin, zebranych w sezonie wegetacyjnym w roku 1991 i 1992. Podczas pracy nie odnaleziono 163 gatunków opisanych dla badanego terenu w latach 1925-1968. Wiedzę florystyczną, którą zdobyłam podczas przygotowywania pracy magisterskiej z powodzeniem wykorzystuję teraz w pracy z roślinami.

Praca doktorska

Pracę doktorską pt. „Ruchy cyrkumnutacyjne łodygi a aktywność elektryczna *Helianthus annuus* L.” wykonałam pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Tadeusza Zawadzkiego na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Moja praca doktorska była pionierską pracą na temat parametrów cyrkumnutacji u słonecznika. Praca ukierunkowana była również na pomiar i analizę różnorodnych form zmian potencjału bielektrycznego. W pracy został przedstawiony całościowy opis zmian potencjału elektrycznego u słonecznika. Opis obejmował długotrwałe dobowe zmiany potencjału elektrycznego, depolaryzację i hiperpolaryzację występujące odpowiednio po zaciemnieniu i oświetleniu rośliny, potencjał wariacyjny po podaniu bodźca uszkodzającego, ultradługościenne oscylacje potencjału oraz potencjały czynnościowe. Podczas pomiarów metodą zewnątrzkomórkową przy użyciu elektrod chlorosrebrnych, zastosowałam

nowy sposób wkłuwania elektrod do łodygi tylko na głębokość jednego milimetra. Pozwoliło to stwierdzić ok. 20 mV falę depolaryzacji po stronie wklęsłej i falę hiperpolaryzacji po stronie wypukłej cirkumnutującej łodygi podczas ultradiałnych oscylacji potencjału elektrycznego. W pracy doktorskiej opisałam nieliczne potencjały czynnościowe, które propagowały się w kierunku akropetalnym lub basipetalnym, obejmując cały przekrój łodygi. Do najważniejszych osiągnięć mojej pracy doktorskiej można zaliczyć: charakterystykę cirkumnutacji oraz zmian potencjału elektrycznego po zastosowaniu bodźca uszkodzającego. Udało się ustalić, że propagacja potencjału wariacyjnego tylko po jednej stronie łodygi po przypaleniu liścia wywoływała charakterystyczne zaburzenia trajektorii cirkumnutacji (**Stolarz i wsp. 2003**). Obraz zmian trajektorii zależał od miejsca przypalenia i sposobu propagacji potencjału wariacyjnego wzdłuż łodygi. Szczególnie szeroko i dokładnie zostały przedstawione zmiany kierunku cirkumnutacji. Zapoczątkowane w pracy doktorskiej badania nad relacjami pomiędzy cirkumnutacjami a szeroko pojętą aktywnością elektryczną zostały rozwinięte i pogłębione w dalszych latach w badaniach nad potencjałem czynnościowym oraz relacjami cirkumnutacji ze wzrostem. Podczas pracy doktorskiej zainicjowałam również badania nad ultradiałnymi oscylacjami potencjału elektrycznego, które w późniejszym czasie zostały rozwinięte przez **Kurendę i wsp. (2014)**. Badania przeprowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora były tematem 4 artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. Trębacz K, **Stolarz M**, Dziubińska H, Zawadzki T (1997) Electrical control of plant development. In: Travelling shot on plant development. Edited by Hubert Greppin, Claude Penel and Patrice Sitnon. University of Geneva, ISBN 2-88164-009-5, pp. 165-181
2. Favre P, Król E, **Stolarz M**, Szarek I, Grppin H, Trębacz K, Degli Agosti R (1999) Action potentials elicited in the liverwort *Conocephalum conicum* (Hepaticae) with different stimuli. Archives Des Sciences, Geneve, 52: 175-185
IF₁₉₉₉ -/ IF₂₀₁₁ 0,296 / IF₂₀₁₇ - Scopus CiteScore₂₀₁₅ 0,57
MNiSW₁₉₉₉ - / MNiSW₂₀₁₆ - cyt. Web of Science 7
3. **Stolarz M**, Dziubińska H, Krupa M, Buda A, Trębacz K, Zawadzki T (2003) Disturbances of stem circumnutations evoked by wound-induced variation potentials in *Helianthus annuus* L. Cellular & Molecular Biology Letters 8: 31-40
IF₂₀₀₃ 0,455 / IF₂₀₁₇ 1,291; MNiSW₂₀₀₃ -/ MNiSW₂₀₁₆ 15 IF_{5 year} 1,558
cyt. Web of Science 2

4. Buda A, Zawadzki T, Krupa M, **Stolarz M**, Okulski W (2003) Daily and infradian rhythms of circumnutation intensity in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum* 119: 582-589. **IF₂₀₀₃ 1,767/ IF₂₀₁₇ 2,580 IF_{5 years 2017} 2,986 MNiSW₂₀₀₃ - / MNiSW₂₀₁₆ 40 cyt. *Web of Science* ⁷**

Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 9 oryginalnych prac eksperymentalnych oraz 3 artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach międzynarodowych i 1 artykuł przeglądowy opublikowany w czasopiśmie krajowym. Dziewięć prac znajduje się w czasopismach z bazy JCR. Łączny *impact factor* zgodny z rokiem opublikowania wynosi **23,872**, a sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW₂₀₁₆ wynosi **316**. Ponadto wyniki zostały przedstawione w 28 komunikatach prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz w raporcie końcowym z realizacji projektu badawczego, którego byłam kierownikiem (projekt finansowany przez Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 2007-2008).

Wskazanie osiągnięcia naukowego

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

- a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola cirkumnutacji i potencjałów czynnościowych we wzroście *Helianthus annuus* L.

- b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* (IF) zgodnie z rokiem opublikowania oraz za rok 2017, a także punktację MNiSW wg wykazu czasopism zgodnie z rokiem opublikowania oraz z dn. 26.01.2016; średni pięcioletni wskaźnik IF w dn. 10.07.2018)

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to 6 oryginalnych prac eksperymentalnych oraz 1 praca przeglądowa:

- P1. Stolarz M**, Król E, Dziubińska H, Zawadzki T (2008) Complex relationship between growth and circumnutations in *Helianthus annuus* stem. **Plant Signaling & Behavior** 3: 376-380 **IF₂₀₀₈ -/ IF₂₀₁₇ - MNiSW₂₀₀₈ -/MNiSW₂₀₁₆ - cyt. *Web of Science* ⁷**

- P2. Stolarz M, Król E, Dziubińska H, Kurenda A (2010) Glutamate induces series of action potentials and a decrease in circumnutation rate in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum* 138: 329-338 IF₂₀₁₀ 3,067 / IF₂₀₁₇ 2,580 MNiSW₂₀₁₀ 32/ MNiSW₂₀₁₆ 40 IF_{5 year} 2,986 cyt. *Web of Science* 6**
- P3. Stolarz M, Król E, Dziubińska H (2010) Glutamatergic elements in an excitability and circumnutation mechanism. *Plant Signaling & Behavior* 5:1108-1111 IF₂₀₁₀ - / IF₂₀₁₇ - MNiSW₂₀₁₀ 2/ MNiSW₂₀₁₆ - cyt. *Web of Science* 2**
- P4. Stolarz M, Żuk M, Król E, Dziubińska H (2014) *Circumnutation Tracker*: novel software for investigation of circumnutation. *Plant Methods* 10:24 IF₂₀₁₄ 3,102 / IF₂₀₁₇ 4,269 MNiSW₂₀₁₄ 35/ MNiSW₂₀₁₆ 40 IF_{5 year} 4,502 cyt. *Web of Science* 3**
- P5. Stolarz, M, Król E, Dziubińska H (2015). Lithium distinguishes between growth and circumnutation and augments glutamate-induced excitation of *Helianthus annuus* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 37 (4):69 IF₂₀₁₅ 1,563 / IF₂₀₁₇ 1,438 MNiSW₂₀₁₅ 25/ MNiSW₂₀₁₆ 25 IF_{5 year} 1,691 cyt. *Web of Science* 2**
- P6. Stolarz M, Dziubińska H (2017) Spontaneous action potentials and circumnutation in *Helianthus annuus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:234 IF₂₀₁₇ 1,438 MNiSW₂₀₁₆ 25 IF_{5 year} 1,691**
- P7. Stolarz M, Dziubińska H (2017) Osmotic and salt stresses modulate spontaneous and glutamate-induced action potentials and distinguish between growth and circumnutation in *Helianthus annuus* seedling. *Frontiers in Plant Science* 8:1766 IF₂₀₁₇ 3,678 MNiSW₂₀₁₆ 40 IF_{5 year} 4,354**

Wszystkie prace składające się na osiągnięcie naukowe zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych, w tym 5 w czasopismach z bazy JCR. Ich sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **12,848**, sumaryczna liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ to **170**, a sumaryczna liczba cytowań wynosi **20** (*Web of Science All Databases* na dzień 10.07.2018, bez autocytowań). We wszystkich publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a mój wkład w ich powstanie wynosi od 85 do 95%. Wkład poszczególnych autorów do publikacji udokumentowano w osobnym załączniku nr 5. W dalszej części autoreferatu prace wchodzące w skład przedstawionego do oceny cyklu są przywoływane jako **P1 – P7**.

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Wzrost roślin to nieodwracalne powiększanie masy, objętości i długości organów roślinnych. Wydłużaniu się organów roślinnych towarzyszą endogenne, rytmiczne ruchy zwane cirkumnutacjami. Cirkumnutacje są szeroko rozpowszechnione wśród roślin, a ich mechanizm oparty jest na skoordynowanych zmianach objętości komórek (1-3). Do koordynacji procesów wzrostowych i rozwojowych organizmu niezbędne są sygnały międzykomórkowe w tym sygnały elektryczne. Wśród sygnałów elektrycznych wyróżniamy potencjały czynnościowe (APs *action potentials*), które są przejściową depolaryzacją błony komórkowej propagującą się na długie dystanse. Potencjały czynnościowe są typowe dla organizmów zwierzęcych, ale występują również u roślin. Wywoływane są one przez bodźce środowiskowe oraz uczestniczą w regulacji procesów fizjologicznych takich jak zmiany intensywności oddychania, fotosyntezy, i wzrostu, a także uczestniczą w wywoływaniu bardzo szybkich ruchów organów roślinnych np. u *Dionaea muscipula* i *Mimosa pudica* (4-8).

Tematem moich badań było poznanie roli cirkumnutacji i APs w regulacji wzrostu roślin słonecznika (*Helianthus annuus* L.). Szczególną uwagę poświęciłam zależnościom pomiędzy cirkumnutacjami i wzrostem oraz zależnościom pomiędzy pojawianiem się APs a cirkumnutacjami. Badania związku APs z cirkumnutacjami mają charakter pionierski.

Powyższe zagadnienia mają nie tylko wartość poznawczą, ale w przyszłości mogą mieć znaczenie praktyczne. Ostatnio nastąpił wzrost zainteresowania ruchami roślin, w tym również cirkumnutacjami. Znajomość kinetyki i mechaniki ruchów roślin jest inspiracją do budowy dynamicznych i adaptujących się struktur i materiałów wykorzystywanych przez człowieka (9). Analiza i badanie ruchów cirkumnutacyjnych pędów roślin pnących oraz korzeni jest pomocna np. w konstruowaniu zrobotyzowanych systemów do wspinania, chwytania oraz zadań eksploracyjnych (10). Dodatkowo, następujący w ostatnich latach bardzo szybki rozwój technik rejestrowania i analizowania obrazu pozwoli na bardziej powszechne zastosowanie techniki analizy obrazu w badaniach cirkumnutacji i wzrostu roślin. Już obecnie wprowadza się ocenę tempa wzrostu i rozwoju roślin przy użyciu cyfrowego obrazu z wyspecjalizowanych kamer, nie tylko pojedynczych roślin, ale nawet upraw szklarniowych i polowych (11, 12). Taki sposób fenotypowania roślin jest jedną z metod, które w przyszłości przyczynią się do lepszego zrozumienia powiązań pomiędzy genotypem a fenotypem i wyodrębniania roślin najlepiej przystosowanych do niesprzyjających warunków środowiska.

Badany przeze mnie słonecznik jest rośliną o szczególnych właściwościach użytkowych. Jest to roślina o jadalnych nasionach nadających się do produkcji oleju, jego zielona masa jest wykorzystywana do produkcji pasz dla zwierząt, oraz ma on walory dekoracyjne, przez co jest wykorzystywany w ogrodnictwie. Z tego powodu, słonecznik jest przedmiotem wielu badań biologicznych i biotechnologicznych, szczególnie w zakresie metabolizmu lipidów, totipotencji i regeneracji, procesów zapylenia, dziedziczenia oraz wpływu stresu środowiskowego. Słonecznik jest również wykorzystywany w pracowni elektrofizjologii roślin w Zakładzie Biofizyki. W 1991 roku Zawadzki i wsp. (13) scharakteryzowali pobudliwość słonecznika opisując jego zdolność do generowania APs. Określono również jego próg pobudliwości, okres refrakcji, reobazę i chronaksję oraz zgodność z prawem „wszystko albo nic”. *Helianthus annuus* obok *Lupinus angustifolius* (14-17) jest kolejną rośliną naczyniową dla której zostały określone parametry i prawa pobudliwości.

Od wielu lat słonecznik jest również bardzo dobrym modelem do badań ruchów cirkumnutacyjnych. Cirkumnutacje są rytmicznymi i napędzanymi zmianami turgoru komórek ruchami organów roślinnych (1-3, 18, 19). Bodźce środowiskowe takie jak grawitacja, światło, temperatura i substancje chemiczne (auksyny, lit, aluminium) mogą wpływać na parametry cirkumnutacji (Stolarz, 2009). Słonecznik jest również powszechnie znany ze swojego dobowego ruchu śledzącego położenie Słońca (20). W Zakładzie Biofizyki od roku 1993 są prowadzone badania nad cirkumnutacjami obejmujące badania rytmu oraz wpływu czynników zewnętrznych, w tym słabych oddziaływań grawitacyjnych pochodzących od sił pływowych (21-23).

Decydujące znaczenie dla wyboru przeze mnie tematu badań miał fakt, że mechanizmy AP, cirkumnutacji i wzrostu mają wspólne podstawy jonowe. Transmembranowe przepływy jonów potasu, chloru, wapnia oraz protonów jak i aktywność pomp i kanałów jonowych stanowią podstawę mechanizmu tych trzech wybranych przeze mnie procesów fizjologicznych. Przepływ jonów przez błonę komórkową jest przyczyną zmian turgoru komórkowego, który jest podstawą zmian objętości komórki i tłumaczy zjawiska ruchu organów roślinnych i wzrostu oraz leży u podstaw utrzymania napięcia elektrycznego na błonie komórkowej (potencjału spoczynkowego) i pojawiania się potencjału czynnościowego (24).

Mechanizm potencjału czynnościowego. Dzięki swej półprzepuszczalności i właściwościom selektywnym, błona komórkowa utrzymuje napięcie elektryczne o wartości kilkudziesięciu miliwoltów między wnętrzem komórki a przestrzenią zewnątrzkomórkową, zwane potencjałem spoczynkowym. U roślin, po zadziałaniu bodźca, następuje przejściowa (około sekundowa lub minutowa) zmiana polaryzacji błony komórkowej. W początkowej fazie depolaryzacji następuje napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy i zmiana jego stężenia w cytoplazmie z 10-300 nM do ok. 1 μM podczas pobudzenia (25-28). Ten napływ jonów Ca^{2+}

otwiera zależne od Ca^{2+} i napięcia kanały chlorkowe w błonie komórkowej, co powoduje wypływ jonów Cl^- skutkujący dalszą depolaryzacją błony. Repolaryzacja błony jest wywołana wypływem jonów K^+ z komórki. Kluczowe znaczenie dla signalingu komórkowego ma napływ Ca^{2+} do cytoplazmy i zmiany jego stężenia, ponieważ Ca^{2+} zwany wtórnym przekaźnikiem informacji jest regulatorem procesów metabolicznych komórki.

Mechanizm cirkumnutacji. Zmiany objętości komórek w strefie elongacyjnej organu są kluczowe dla cirkumnutacji i wzrostu, a przepływy jonowe i aktywność pomp i kanałów jonowych są w tym procesie niezbędne (2, 3, 29). Schemat sekwencji przepływów jonowych i wody podczas cirkumnutacji może wyglądać następująco: H^+ ATPaza ciągle pracuje co doprowadza błonę komórkową do powolnej hiperpolaryzacji. Hiperpolaryzacja powoduje otwarcie kanałów potasowych bramkowanych napięciem i skierowany do wnętrza komórki napływ jonów K^+ . Dodatkowo, dzięki pracy H^+ ATPazy, jony Cl^- są transportowane do cytoplazmy przez kotransport (antyport) z jonami H^+ . Napływ jonów K^+ i Cl^- do komórki powoduje wzrost potencjału osmotycznego, co umożliwia napływ wody do wnętrza komórki, np. poprzez akwaporyny. Napływ wody powiększa objętość komórki i napręża błonę komórkową, co może spowodować otwarcie mechanowrażliwych kanałów Ca^{2+} i wejście jonów Ca^{2+} do cytoplazmy. Wejście jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki początkuje depolaryzację błony komórkowej, a depolaryzacja ta może otwierać kanały jonowe K^+ skierowane na zewnątrz, co obniża potencjał osmotyczny wewnątrz komórki i powoduje wypływ wody. Zwiększanie objętości komórki zostaje zahamowane. Elektrofizjologiczny mechanizm cirkumnutacji został przeze mnie przedstawiony w pracy przeglądowej na temat cirkumnutacji (Stolarz, 2009) w oparciu o mechanizm zmian objętości komórek motorycznych poduszczyk liściowych. Również prace Shabali i wsp. (30, 31) opisujące oscylacje przepływów jonowych i towarzyszące im nutacje korzeni potwierdzają kluczowe znaczenie jonów dla mechanizmu cirkumnutacji.

Wspólne podłoże jonowe cirkumnutacji i APs pozwalało przypuszczać, że zmiany w intensywności jednego zjawiska mogą wpływać na intensywność drugiego zjawiska. Dodatkowo, zarówno APs jak i cirkumnutacje są słabo zbadane, a ich rola we wzroście roślin nie jest sprecyzowana.

Cel badań

Główne problemy do rozwiązania

Wrażliwość na czynniki środowiskowe i zdolność adaptacji do niesprzyjających warunków otoczenia jest kluczowa dla roślin, które są organizmami osiadłymi i nie mogą opuścić swojego siedliska. Jednym z pierwszych symptomów działania czynników środowiska na rośliny, bardzo często opisywanym w literaturze, jest zahamowanie wzrostu. Badanie relacji

pomiędzy wzrostem a cirkumnutacjami stało się tematem moich badań. Powszechnie panuje przekonanie, że cirkumnutacje są nierozzerwalnie związane ze wzrostem i że są one jedynie nieuniknioną konsekwencją wzrostu. Teoria Engelmanna i Johnssona (2) zakłada, że cirkumnutacje zapewniają stabilność hipokotyła podczas elongacji. Według tej teorii, rozluźnienie fibryli celulozowych ściany komórkowej, które jest niezbędne podczas zwiększania objętości komórki w procesie elongacji organu, odbywa się tylko po jednej stronie organu. Rozluźnienie takie obiega sukcesywnie organ dookoła. Mechanizm ten zapobiega destabilizacji organu i podatności na wyboczenia i wyleganie rośliny, która nastąpiłaby w przypadku rozluźnienia ściany komórkowej wszystkich komórek jednocześnie wokół rosnącego organu. Opisany mechanizm zakłada, że rozluźnianie ściany komórkowej podczas wzrostu odbywa się sukcesywnie w sposób okrężny wokół rosnącego organu i to gwarantuje mu wzrost na długość i jednocześnie stabilność. Zatem zmiany prędkości cirkumnutacji powinny być w proporcjonalny sposób związane ze zmianami prędkości wzrostu, a cirkumnutacje mogłyby być markerem prędkości wzrostu. Interesujące było również, czy czynniki środowiska wpływają tak samo na wzrost i cirkumnutacje. W literaturze istniały doniesienia, że niektóre czynniki chemiczne jak np. chlorek litu czy jony aluminium mogą hamować cirkumnutacje bez zahamowania wzrostu (Stolarz, 2009). Celem mojej pracy było sprawdzenie, jak po podaniu różnych rodzajów bodźców będzie się zmieniać prędkość wzrostu, a jak cirkumnutacje.

Oprócz zahamowania wzrostu, jednym z pierwszych przejawów odpowiedzi roślin na bodźce środowiskowe są zmiany potencjału błonowego, a więc pojawianie się sygnałów elektrycznych w tym APs (6). Celem pracy było sprawdzanie czy po podaniu różnych rodzajów bodźców słonecznik generuje nie tylko jeden, ale większą liczbę APs zależną od rodzaju i siły bodźca, czy adaptacja słonecznika do zmienionych warunków środowiska może odbywać się w obecności APs i czy w różnych warunkach środowiska np. stresowych można otrzymać fenotypy słonecznika generujące różną, mniejszą lub większą, liczbę APs. Poza analizą częstości pojawiania się APs, planowałam przeprowadzić próbę sprawdzenia korelacji pomiędzy pojawiającymi się APs a parametrami cirkumnutacji. U roślin analogicznie jak u zwierząt, istnieje typowy schemat reagowania: bodziec - sygnał - odpowiedź efektora, więc zakładałam, że pojawiające się u słonecznika APs mogłyby wywoływać zmiany w cirkumnutacjach.

Podsumowując, dwoma głównymi celami pracy było:

1. Podjęcie badań, które zweryfikują, czy cirkumnutacje są jedynie sposobem wzrostu i jego nieodłączną konsekwencją.
2. Podjęcie pionierskich badań nad problemem istnienia u roślin odpowiedzi na czynniki zewnętrzne w postaci wielu APs (*frequency coding*) oraz związków APs z cirkumnutacjami.

Do badań wybrałam następujące czynniki zewnętrzne: zmiany oświetlenia rośliny (zmiana natężenia światła i fotoperiodu), neuromodulatory (glutaminian, lit), stres solny (jony potasu, sodu, chloru) i osmotyczny (D-sorbitol) oraz unieruchamianie rośliny.

Zdolność do reakcji na zmieniające się w otoczeniu natężenie i jakość światła jest kluczowa w procesach adaptacji roślin do środowiska. Światło jest czynnikiem niezbędnym we wzroście roślin i dodatkowo nieinwazyjnym podczas zastosowania go w doświadczeniach laboratoryjnych. **Światło** wywołuje nie tylko zmiany w fotosyntezie, ale również zmiany w pobudliwości oraz cirkumnutacjach (6, 21, 32-34) wpływając zarówno na potencjał spoczynkowy jak i na pracę zegara biologicznego. Do tej pory nie prowadzono badań nad wpływem światła na zmiany relacji cirkumnutacje-wzrost u słonecznika. Wpływ światła na pojawianie się APs w relacji do ruchów endogennych nie był także do tej pory badany. W moich badaniach zastosowałam fotoperiod światło/ciemność 16/8 godz. (**P1, P6**), ciągle oświetlenie oraz ciągle, ale bardzo słabe oświetlenie imitujące długotrwałe zacienienie lub pochmurne dni (**P6**).

Od wielu lat badacze roślin zastanawiają się, jaka może być fizjologiczna lub ekologiczna rola **substancji neuroaktywnych** obecnych w roślinach (35). Jedną z takich substancji jest **kwask glutaminowy**, najważniejszy neurotransmitter układu nerwowego, a u roślin najważniejszy endogenne aminokwas biorący udział w metabolizmie azotu (36, 37). Kwask glutaminowy jest kluczowy w początkowym etapie syntezy aminokwasów następującej po pobraniu azotu z podłoża w formie azotanów i soli amonowych. W warunkach fizjologicznych kwask glutaminowy występuje w przeważającej formie jako glutaminian, czyli anion karboksylowy kwasu glutaminowego. Istotne jest, że w ostatnim czasie u roślin został odkryty receptor glutaminianu podobny do receptora glutaminianu występującego w układzie nerwowym (38). Z tego powodu w ostatnich latach prowadzone są badania nad sygnałnym znaczeniem glutaminianu w regulacji procesów fizjologicznych u roślin (**P3**). W moich doświadczeniach zastosowałam roztwory glutaminianu o różnych stężeniach wstrzykiwane do łodygi lub hipokotyla słonecznika (**P2, P5, P7**). Po raz pierwszy zastosowałam metodę wstrzyknięcia substancji neuroaktywnej do rośliny. Pobudzenie uzyskiwane tą metodą na całej roślinie starałam się modulować innymi czynnikami takimi jak lit oraz stres osmotyczny i solny. Jednym z najbardziej znanych neuroprotektantów modulujących pobudliwość u zwierząt jest lit (39, 40). **Lit** jest jonem współzawodniczącym z potasem. Jest składnikiem leków neuroaktywnych, ponadto jest stosowany w badaniach nad rytmami. Jest on regulatorem zegara biologicznego u człowieka, gryzoni, organizmów jednokomórkowych i roślin. Lit został zastosowany przeze mnie jako składnik pożywki lub był wstrzykiwany do hipokotyla (**P5**). Zarówno glutaminian jak i lit oddziałują na transport membranowy organizmów (38, 40).

W ostatnim czasie, z powodu deficytów wody w licznych ekosystemach, stres suszy jest przedmiotem intensywnych badań w wielu laboratoriach. Stresowi suszy towarzyszy zarówno **stres solny** jak i **stres osmotyczny**. Słonecznik jest dobrym obiektem do tego typu badań ze względu na swoją zwiększoną odporność na suszę. Dodatkowo, źródło tego stresu czyli jony Na^+ , K^+ i Cl^- są bezpośrednio zaangażowane w transport membranowy leżący u podstaw utrzymania potencjału błonowego, potencjału osmotycznego i turgoru komórki. W swoich badaniach zastosowałam KCl, NaCl oraz D-sorbitol jako składnik pożywki hydroponicznej oraz jako składnik roztworu do wstrzyknięcia (**P7**). Po raz pierwszy został sprawdzony wpływ składu jonowego pożywki na cirkumnutacje oraz pojawianie się APs na całych roślinach.

Dodatkowym typem eksperymentów były badania z **unieruchomieniem rośliny** jako ingerencja w endogenną motorykę słonecznika i sprawdzenie wpływu cirkumnutacji łodygi na pojawianie się APs (**P6**).

Do moich badań wykorzystywałam zarówno siewki jak i trzytygodniowe rośliny słonecznika uprawiane w glebie i kulturach hydroponicznych.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały

1. Zbadanie wpływu światła na zależność wzrost – cirkumnutacje w fotoperiodzie światło/ciemność u trzytygodniowego słonecznika.
2. Określenie znaczenia glutaminianu w signalingu elektrycznym i cirkumnutacjach.
3. Określenie wpływ litu na cirkumnutacje i pobudzenia indukowane glutaminianem.
4. Zbadanie wpływu światła na pojawianie się spontanicznych APs w relacji do ruchów endogennych.
5. Zbadanie wpływu stresu osmotycznego i solnego na cirkumnutacje oraz pojawianie się APs spontanicznych i indukowanych glutaminianem.
6. Zbudowanie oprogramowania służącego do analizy filmów *time-lapse* i opracowywania parametrów cirkumnutacji.
7. Określenie teoretycznych podstaw mechanizmu działania glutaminianu, litu i stresu solnego na cirkumnutacje i APs u roślin.

Podczas pracy nad cirkumnutacjami zauważyłam, że istnieje kilka różnych sposobów analizy cirkumnutacji przez różnych badaczy i niektórych wyników nie daje się porównywać. Zauważyłam również, że brak jest ogólnie dotępnego oprogramowania, dzięki któremu można by wystandaryzować i przyspieszyć opracowywanie cirkumnutacji. Moim celem stało się zbudowanie takiego oprogramowania.

W Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej od wielu lat prowadzone są badania pobudliwości roślin metodą mikroelektrodową i aktywności kanałów

jonowych metodą *patch-clamp*. Badania te obejmują zmiany elektryczne na błonie komórkowej i tonopłacie w krótkim czasie (sekundy, minuty) po podaniu bodźca. Celem mojej pracy, były pomiary APs i cirkumnutacji na całych roślinach, prowadzone podczas wielogodzinnych i wielodniowych pomiarów jako uzupełnienie badań prowadzonych na poziomie komórkowym.

Dodatkowym celem pracy było wykorzystanie bardzo dobrze rozwijającej się techniki filmowania w interwale (41) do wykonania filmów przedstawiających cirkumnutacje, które mogłyby stanowić materiał poglądowy oraz służyć do celów dydaktycznych i popularyzacji wiedzy na temat cirkumnutacji.

Wyniki

ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY WZROSTEM I CIRKUMNUTACJAMI

Charakterystyka zależności pomiędzy wzrostem i cirkumnutacjami była jednym z dwóch głównych celów badawczych w publikacjach zgłaszanych w ramach osiągnięcia naukowego. W roku 2007 otrzymałam grant pt. „Badanie zależności pomiędzy wzrostem a ruchami cyrkumnutacyjnymi łodygi *Helianthus annuus*”. Kierowanie Projektem Prorektora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej pozwoliło mi przeprowadzić badania z wykorzystaniem metody filmowania z interwałem (*time-lapse*) i jednoczesnego pomiaru prędkości wzrostu za pomocą kątownego czujnika wzrostu. Wyniki tych badań, zostały przedstawione w pierwszej pracy (P1) cyklu publikacji zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe. Badany był trzytygodniowy słonecznik, w fotoperiodzie zbliżonym do naturalnego, to jest światło/ciemność 16/8 godz. Wyniki ujawniły, że zarówno prędkość wzrostu jak i prędkość cirkumnutacji wykazują dobowe zmiany związane z wyłączeniem i włączeniem światła, jednak ich przebiegi różnią się. Szczególnie interesującym był fakt, że podczas okresu światła następuje zmniejszenie prędkości cirkumnutacji bez zahamowania prędkości wzrostu łodygi. Potwierdziło to przypuszczenie oparte na danych literaturowych, że w niektórych warunkach cirkumnutacje nie są proporcjonalne do wzrostu. Doświadczenia moje wykazały po raz pierwszy, że przy takiej samej prędkości wzrostu (4-5 $\mu\text{m min}^{-1}$ tj. 0,6-0,7 cm 24 h⁻¹) cirkumnutacje mogą być długie podczas ciemności (3-6 cm) i małe na świetle (0,5-2 cm). Podczas pierwszych godzin oświetlenia rośliny światło inaczej wpływa na wzrost a inaczej na cirkumnutacje. To świadczy o możliwości rozprzęgnięcia tych dwóch wydawałoby się nierozzerwalnych procesów oraz wskazuje, że nie są one w pełni tożsame. Czy cirkumnutacje są bardziej czułe na czynniki środowiska niż sam wzrost? Jeżeli cirkumnutacje nie są jedynie konsekwencją wzrostu to mogłyby one uczestniczyć we wczesnej detekcji czynników środowiska, zanim nastąpi zahamowanie wzrostu. Jednym z pierwszych przejawów niektórych dysfunkcji czy chorób wywołanych czynnikami egzogennymi lub endogennymi u zwierząt są zaburzenia motoryki występujące bez widocznych zmian anatomicznych czy morfologicznych.

Również u roślin zaburzenia cyrkumnutacji mogłyby być markerem wczesnych zmian fizjologicznych, podczas których nie są jeszcze upośledzone procesy wzrostowe. Zaburzenia cyrkumnutacji mogłyby być uznane za wczesną oznakę działania czynników środowiska, w tym również czynników patogennych.

Podczas pracy opisanej w publikacji **P1** przeprowadziłam również pionierskie badania sposobów zmian trajektorii cyrkumnutacji po zaciemnieniu i oświetleniu słonecznika. Analizy takie nie były do tej pory przez nikogo prowadzone. Po zaciemnieniu dochodzi do 10-15 minutowego zatrzymania cirkumnutującej łodygi słonecznika, a w niektórych przypadkach może dochodzić nawet do zmiany kierunku cyrkumnutacji. Należy zauważyć, że trajektoria cyrkumnutacji widziana z góry odzwierciedla wzór zmian turgoru komórek wewnątrz strefy motorycznej, w które zaangażowane są przepływy jonowe. Poznanie geometrycznych wzorów trajektorii jest więc zarazem poznaniem wzoru zmian turgoru komórek wewnątrz organu i może wnosić nowe informacje na temat signalingu międzykomórkowego.

Opisane powyżej wyniki ujawniły pewien stopień niezależności cyrkumnutacji od prędkości wzrostu. Następna seria eksperymentów z zastosowaniem chlorku litu (**P5**) oraz stresu osmotycznego i solnego (**P7**) u siewek słonecznika umieszczonych w uprawie hydroponicznej pozwoliły zweryfikować tę obserwację.

Lit jest pierwiastkiem śladowym występującym naturalnie w organizmach (39, 40). Występuje on w glebie oraz zasobach wodnych i jest pobierany przez wszystkie rośliny. Pomimo że lit nie jest klasyfikowany jako pierwiastek niezbędny, to jednak wiadomo, że u roślin wpływa on na wiele procesów fizjologicznych. Ponadto lit ma właściwości neuroprotektoryjne oraz wpływa na pobudliwość i motorykę u zwierząt. Hamujący wpływ litu na cirkumnutację u słonecznika i fasoli został opisany wcześniej (3, 42). Wpływał on również na ruchy liści *Cassia fasciculata* i przylistków *Desmodium motorium*. Lit był więc odpowiednim czynnikiem, który mógł wywoływać zmiany w pobudliwości i motoryce siewek słonecznika. W serii doświadczeń przedstawionych w pracy **P5** aplikowałam chlorek litu o stężeniu 0,2-80 mM do pożywki w hydroponiku. W pracy badałam długość hipokotyli, świeżą masę siewek oraz intensywność i okres cirkumnutacji. Pierwsze analizy wykazały, że prędkość cirkumnutacji zależy od długości hipokotyli. Aby rozróżnić czystą prędkość cirkumnutacji na tle zmian długości hipokotyli, sformułowałam po raz pierwszy parametr określający czystą prędkość cirkumnutacji tzw. **intensywność cirkumnutacji**. Intensywność cirkumnutacji określałam dzieląc prędkość cirkumnutacji przez długość hipokotyli. Parametr ten został później również użyty w analizach w publikacji **P7**. Wyniki wykazały, że intensywność cirkumnutacji nie zależy od długości hipokotyli ani od świeżej masy. W mikro- i milimolowych stężeniach chlorku litu istotne zahamowanie wzrostu nie powodowało zmian w intensywności cirkumnutacji. U roślin rosnących w 40 mM stężeniu LiCl zaobserwowano natomiast brak zahamowania wzrostu

siewek oraz towarzyszący mu istotny spadek intensywności cirkumnutacji. Wynik ten był podobny do obserwacji zahamowania cirkumnutacji bez zahamowania wzrostu, jakie uzyskałam we wcześniej przeprowadzonych eksperymentach z zastosowaniem zaciemnienia i oświetlenia w pracy **P1**. Potwierdzało to, że wzrost i cirkumnutacje mogą być rozdzielone i mogą być regulowane w niezależny sposób przez czynniki zewnętrzne. W pracy **P5** sprawdzałam również korelacje pomiędzy świeżą masą słonecznika a cirkumnutacjami. Okres i intensywność cirkumnutacji nie zależały od świeżej masy siewek. Cirkumnutacje były takie same u siewek, które różniły się między sobą świeżą masą nawet dwukrotnie. Zatem, jakie znaczenie we wzroście mogą mieć cirkumnutacje jeżeli są one takie same (okres i intensywność) u roślin, które różnią się między sobą nawet dwukrotnie świeżą masą? Potwierdza to autonomię cirkumnutacji względem wzrostu.

Wniosek ten został następnie jeszcze raz zweryfikowany przez zastosowanie stresu solnego i osmotycznego u siewek słonecznika, co przedstawiono w publikacji **P7**. Odpowiednie stężenie jonów w glebie oraz w apoplazmie i cytoplazmie jest niezbędne dla utrzymania potencjału błonowego oraz właściwego turgoru komórek, a tym samym ich zdolności do wzrostu (24). W kolejnej serii eksperymentów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedstawionych w pracy **P7** badałam wzrost i cirkumnutacje u tygodniowych siewek słonecznika poddanych stresowi osmotycznemu i solnemu w zakresie 160-300 mOsm. Aplikowałam KCl, NaCl i D-sorbitol o stężeniu 80-160 mM do pożywki w hydroponiku. Stres solny ma swoją komponentę osmotyczną i jonową. Z literatury wiadomo, że komponenty te w sposób zróżnicowany modulują ekspresję genów oraz przepływy jonowe (29, 43-45). W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach stres osmotyczny hamował wzrost i cirkumnutacje, natomiast stres solny hamował tylko wzrost. Wyniki te wykazały, że można rozdzielić cirkumnutacje i wzrost. Długość hipokotyla była silnie zmniejszana przez stres osmotyczny i solny (o 10-30 %), natomiast intensywność cirkumnutacji spadała tylko pod wpływem stresu osmotycznego (woda destylowana i D-sorbitol), ale nie solnego (**P7**). W łagodnym i silnym stresie solnym cirkumnutacje były intensywne i nie różniły się od kontrolnych, pomimo zahamowania wzrostu. Widać więc wyraźnie, że inhibicji wzrostu hipokotyla nie towarzyszyło zmniejszenie intensywności cirkumnutacji, tak samo jak to wcześniej wykazano stosując lit (**P5**).

Zegar biologiczny. Cirkumnutacje są zjawiskiem rytmicznym i doskonale nadają się do obserwowania aktywności wewnętrznego zegara biologicznego, którego są widoczną „wskazówką” (2, 18, 30). Istotne wyniki uzyskane zostały podczas analizy okresu cirkumnutacji po zastosowaniu chlorku litu oraz stresu osmotycznego i solnego. Okres cirkumnutacji siewek słonecznika nie zależał od długości hipokotyla ani od świeżej masy siewek. Przy stężeniach 0,5 i 20 mM lit powodował wydłużenie okresu cirkumnutacji o 18% (30 min), co potwierdziło, że

oscylator ultradialny jest wrażliwy na lit. Po aplikacji litu o stężeniu nawet 60 mM i towarzyszącemu jej silnemu zahamowaniu wzrostu, okres pozostawał taki sam jak u roślin kontrolnych. To dodatkowo dowodzi, że mechanizm cirkumnutacji jest częściowo niezależny od wzrostu. Podobne wnioski uzyskano po wykonaniu eksperymentów z zastosowaniem stresu osmotycznego i solnego (**P7**). Okres cirkumnutacji wzrastał istotnie do 245 min jedynie w wodzie destylowanej (wydłużenie o ok. 70 min.), natomiast w stresie solnym utrzymywał się na stałym poziomie zbliżonym do kontroli (ok. 164 min). Hipokotyle o takiej samej długości miały kompletnie inny okres w warunkach stresu osmotycznego i solnego, co jeszcze raz podkreśla brak „sztywnego” związku pomiędzy cirkumnutacjami i wzrostem. Najistotniejsza była obserwacja, że pomimo redukcji długości hipokotyła (po podaniu litu i stresu solnego), okres pozostawał na kontrolnym poziomie, co świadczy o dużej odporności mechanizmu ultradialnego oscylatora na lit i stres solny. Pokazuje to również jeszcze raz pewien stopień autonomii cirkumnutacji względem wzrostu.

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty ujawniły, że w pierwszych godzinach po oświetleniu cirkumnutacje są bardzo małe a wzrost szybki (**P1**). Podobnie chlorek litu o stężeniu 40 mM hamował tylko cirkumnutacje, ale nie wzrost (**P5**). Odwrotnie było po zastosowaniu 0,2-20 mM LiCl i stresu solnego (80-160 mM KCl i NaCl), które to hamowały wzrost, ale nie zmieniały intensywności cirkumnutacji (**P5**, **P7**). Przedstawione wyniki potwierdziły, że cirkumnutacje mogą być w pewnym stopniu niezależne od wzrostu. Wyniki te podtrzymują również hipotezę przedstawioną przez Hayashi i wsp (46), że zahamowanie cirkumnutacji jest pierwszą fazą reakcji na stres jeszcze przed zahamowaniem wzrostu. Otrzymane przeze mnie wyniki, wskazują również, że zahamowanie wzrostu może nastąpić bez zahamowania cirkumnutacji. Zatem uogólniając, cirkumnutacje mogą być zahamowane zanim jeszcze wzrost zostanie zaburzony (**P1**, **P5**) i odwrotnie: wzrost może być zahamowany, ale nie cirkumnutacje (**P5**, **P7**). Wskazuje to na pewien stopień autonomii cirkumnutacji względem wzrostu i sugeruje, że mogą one pełnić specjalne ekologiczne lub fizjologiczne funkcje nie będąc jedynie sposobem wzrostu. Cirkumnutacje, jako proces częściowo autonomiczny względem wzrostu organu będący przestrzennym poruszaniem się organu, są dobrym kandydatem do miana modelu w badaniach behawioralnych roślin. Zachowanie się roślin może być opisywane na podstawie cirkumnutacyjnego ruchu organów częściowo autonomicznego względem wzrostu. Na podstawie przedstawionych przeze mnie wyników badań, cirkumnutacje mogłyby być rozpatrywane jako czynnik wzrostu, a nie jedynie jego konsekwencja. Moje badania wykazały, że cirkumnutacje nie są precyzyjnym markerem prędkości wzrostu, ale raczej złożonego zachowania roślin częściowo autonomicznego względem wzrostu.

ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY POTENCJAŁAMI CZYNNOŚCIOWYMI I CIRKUMNUTACJAMI

Drugim głównym celem moich badań zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe było ustalenie czy słonecznik może generować wiele APs w odpowiedzi na działanie czynników zewnętrznych oraz ustalenie ewentualnych związków APs z cirkumnutacjami.

Potencjał czynnościowy u roślin, jego jonowy mechanizm i funkcja fizjologiczna są dobrze udokumentowane w literaturze (4, 6, 8, 13, 14, 34). Bierze on udział w zamknięciu liści *Mimosa pudica* i liścia pułapki *Dionaea muscipula*. Ponadto wykazano jego udział w regulacji elongacji (*Luffa cylindrica*), oddychania i zapłodnienia oraz ekspresji genów (4-8, 13, 32). Dla gatunków *Conocephalum conicum*, *Lupinus angustifolius* i *Helianthus annuus* zostały określone parametry i prawa pobudliwości: próg pobudliwości, okres refrakcji, reobaza, chronaksja, prawo „wszystko albo nic” oraz drogi propagacji wzdłuż rośliny (4, 8, 13, 14, 47). Następnym etapem w rozwoju elektrofizjologii roślin powinno być sprawdzenie, czy analogicznie jak u zwierząt, u roślin również istnieje kodowanie częstotliwościowe (*frequency coding*) w oparciu o APs (8).

Indukowane bodźcem serie APs

Serie APs zostały wcześniej opisane u *Conocephalum conicum*, *Arabidopsis thaliana*, oraz *Helianthus annuus*. Były one zwykle wywołane bodźcem uszkodzeniowym oraz występowały na tle potencjału wariacyjnego (8, 32, 48). Ponieważ udokumentowane w literaturze stymulacje elektryczne wywoływały tylko jeden AP, postanowiłam sprawdzić możliwość wywołania wielu APs przez stymulację glutaminianem, który jest głównym neurotransmiterem w układzie nerwowym. Stosunkowo niedawne odkrycie receptora glutaminianu u roślin (38) dało dodatkowy impuls do badań nad znaczeniem glutaminianu dla signalingu elektrycznego u roślin. Wcześniej w badaniach, w których brałam udział, zostały stwierdzone serie APs u rośliny niższej, wątrobowca *Conocephalum conicum*, metodą mikroelektrodową (Król i wsp. 2007).

Badania opisane w omawianej poniżej publikacji (P2) finansowane były z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant No. N301 464534). Celem pracy była charakterystyka pobudliwości i cirkumnutacji po wstrzyknięciu roztworu glutaminianu do łodygi trzytygodniowego słonecznika. W pracy wykorzystałam technikę zewnątrzkomórkowego pomiaru potencjału elektrycznego na całej roślinie przez zastosowanie elektrod chlorosrebrowych wkłuwanych do łodygi. Wyniki wykazały **serie APs i przejściowe zmiany w cirkumnutacjach wywoływane glutaminianem (P2)**. Eksperymenty te po raz pierwszy wykazały serie APs indukowane glutaminianem u rośliny naczyniowej.

W tej pracy po raz pierwszy została zastosowana i opisana przeze mnie pionierska metoda wstrzykiwania substancji aktywnej do ciała rośliny w określonym miejscu łodygi. Okazała się ona bardzo dobrą metodą, umożliwiającą badanie pobudzenia elektrycznego na całych roślinach, dzięki czemu możliwe było równoczesne obserwowanie cirkumnutacji. Metoda ta, została również wykorzystana w dalszych eksperymentach na siewkach słonecznika w celu wykazania modulowania pobudzenia elektrycznego indukowanego glutaminianem przez czynniki zewnętrzne (lit, stres solny i osmotyczny, w publikacjach **P5** i **P7**) oraz wykazania różnych jakościowo serii APs po wstrzyknięciu innych substancji np. roztworów KCl, NaCl, wody destylowanej, lub D-sorbitolu (w publikacji **P7**). Metoda ta była również wykorzystywana do aplikowania inhibitorów kanałów jonowych w badaniach nad oscylacjami potencjału elektrycznego w łodydze słonecznika (**Kurenda i wsp. 2014**). Przeprowadziłam również porównanie skuteczności podawania substancji przez wstrzyknięcie do hipokotyla a dodaniem jej do pożywki w hydroponiku. W badaniach, w których zastosowałam chlorek litu, sprawdzono efekt działania litu po wstrzyknięciu i porównano go z efektem uzyskanym przez długotrwałą ekspozycję na lit w pożywce w uprawie hydroponicznej (**P5**). Wyniki wykazały, że aplikacja litu przez wstrzyknięcie do hipokotyla słonecznika przynosi podobny efekt jak podanie litu w pożywce w hydroponiku. Podsumowując, wprowadzona metoda iniekcji substancji aktywnej jest skuteczna, podobnie jak dodanie substancji do pożywki.

Indukowane glutaminianem serie APs miały bardzo wysoką powtarzalność i zostały scharakteryzowane za pomocą takich parametrów jak czas trwania serii (min), liczba APs w serii i prędkość propagacji APs (cm min^{-1}). **Parametry serii APs zależały od stężenia roztworu glutaminianu.** W pracy wykazano, że najbardziej efektywnym stężeniem glutaminianu było stężenie 50 mM (6-7 APs w serii), natomiast 200 mM i 5 mM wywoływało mniej APs (3-4 APs w serii). Pokazana została możliwość propagacji APs na odległość 20-25 cm w kierunku akropetalnym, basipetalnym oraz akropetalnym i basipetalnym równocześnie, nawet podczas jednej serii. Podanie 50 mM glutaminianu wywoływało serie APs u ponad 75% roślin. **Ponieważ udokumentowane w literaturze stymulacje elektryczne wywoływały tylko jeden AP, podanie glutaminianu okazało się być dobrym, alternatywnym sposobem wywoływania kilku APs, a zarazem dobrą, wystarczająco wystandaryzowaną metodą do studiowania problemu liczby pojawiających się APs w zależności od rodzaju i siły bodźca u roślin (P5, P7).**

Eksperymenty te ujawniły, że w łodydze słonecznika funkcjonuje długodystansowy signaling elektryczny z udziałem APs i glutaminianu. Pokazuje to, że glutaminian będący najważniejszym neurotransmiterem zaangażowanym w mechanizmy aktywności neuromotorycznej zwierząt zarówno wywołuje APs jak i wpływa na cirkumnutacje, czyli endogenną aktywność motoryczną słonecznika. W opisywanej publikacji (**P2**) stwierdzono, że

podanie 20 μ l 50 mM glutaminianu u podstawy łodygi słonecznika hamowało prędkość cirkumnutacji o 40-60% na okres około 5 godzin. Istotne było to, że bodziec podany u podstawy łodygi wywoływał APs, które propagowały się wzdłuż łodygi, a odpowiedź w postaci zahamowania cirkumnutacji (*effector response*) następowała w obszarze strefy motorycznej, oddalonej o około 12 cm od miejsca podania bodźca.

Problem udziału glutaminianu i elementów glutaminianergicznych w signalingu elektrycznym i cirkumnutacjach roślin został przedstawiony w następnej mojej publikacji **P3** mającej charakter pracy przeglądowej. Przeprowadzone przeze mnie analizy teoretyczne wskazywały, że składniki systemu glutaminianergicznego mogą pośredniczyć w powstawaniu APs i zmianach w cirkumnutacjach wywołanych przez bodziec środowiskowy.

Jak wykazano w pracy **P2**, trzytygodniowe rośliny słonecznika uprawiane w glebie generują różną liczbę APs po wstrzyknięciu glutaminianu. Następna seria doświadczeń miała na celu sprawdzenie, czy siewki słonecznika uprawiane w hydroponiku również reagują na glutaminian oraz czy zastosowanie litu (**P5**) i stresu solnego oraz osmotycznego (**P7**) moduluje tę aktywność. Uprawa w hydroponiku daje możliwość aplikowania substancji aktywnych dokorzeniowo, a dobrze rozpuszczalny w wodzie chlorek litu, jako neuroprotektor, był potencjalnie bardzo dobrą substancją, aby sprawdzić możliwość zmian pobudliwości siewek po jego aplikacji. U roślin stosuje się dawki chlorku litu od stężeń mikromolowych do 100 mM. Wyniki potwierdziły moje założenie. **Aplikowanie chlorku litu o stężeniu 40 i 60 mM wydłużało serie APs indukowane glutaminianem.** Zwiększała się zarówno liczba APs (średnio z 4 do 11 na serię) oraz czas trwania serii (z ok. 10 do 30 min). Wyniki były identyczne po wstrzyknięciu chlorku litu do hipokotyla oraz przez podanie go dokorzeniowo w pożywce hydroponicznej. Dla porównania, po traktowaniu siewek silnym stresem solnym (160 mM KCl lub NaCl) serie wywołane glutaminianem były zahamowane z średnio 10 APs na serię do 2-3 APs na serię (wyniki przedstawione w publikacji **P7**). Serie APs wywołane glutaminianem były hamowane w silnym stresie solnym (2-3 APs na serię), ale nie w łagodnym stresie solnym i stresie osmotycznym (5-10 APs na serię). Przedstawiono tu po raz pierwszy modulację pobudzenia elektrycznego wywołanego glutaminianem przez zasolenie. Stres osmotyczny nie zmieniał serii APs indukowanych glutaminianem.

W pracach **P2, P3, P5, i P7** przedstawiłam istnienie signalingu glutaminianergicznego u roślin oraz wykazałam zdolność egzogenego glutaminianu do wywoływania serii APs i możliwość modulacji ich przez aplikację litu i stresu solnego u słonecznika. U roślin istnieje zatem przekąźnictwo glutaminianergiczne i może ono być modulowane przez warunki odżywcze (stężenie litu, potasu, sodu), w których roślina rośnie. Wydaje się zatem, że glutaminian, kluczowy „uczestnik” metabolizmu azotu u roślin, uczestniczy również w signalingu elektrycznym opartym na APs. Badania tego typu w przyszłości pozwolą lepiej

zrozumieć zasady nawożenia mineralnego roślin, w tym szczególnie ważne w ogrodnictwie zależności pomiędzy nawożeniem potasowym i azotowym. Badania te rzucają również dodatkowe światło na signaling elektryczny związany z uszkodzeniem rośliny. Można przyjąć, że pojawianie się APs po uszkodzeniu rośliny (32, 33) jest wynikiem działania glutaminianu, który podczas uszkodzenia wydostaje się z komórek do apoplastu i działa na znajdujące się w błonie komórkowej receptory glutaminianu. Badania te są również istotne dla problematyki signalingu związków azotu zawartych w glebie, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wykorzystywania aminokwasów znajdujących się w glebie jako źródła azotu (36, 37).

W publikacji **P2** wykazałam, że wstrzyknięcie glutaminianu do hipokotyla i łodygi słonecznika wywołuje jakościowo zróżnicowane serie APs, ale podobne serie mogą być również wywołane przez aplikację innych roztworów np. wstrzyknięcie hiperosmotycznego roztworu NaCl lub KCl lub wstrzyknięcie wody destylowanej. Serie takie zostały przedstawione w publikacji **P7**. Zaprezentowałam w niej serie składające się z 3 do 24 APs propagujących się wzdłuż łodygi na odległość ok. 15 cm. Na przykład wstrzyknięcie 250 mM KCl wywoływało nawet kilkanaście APs, natomiast po wstrzyknięciu 250 mM NaCl brak było APs. To doświadczenie wykonane na całej roślinie potwierdza zróżnicowane działanie jonów potasu i sodu wykazane wcześniej metodą *patch-clamp* i mikroelektrodową. W pracy tej, również po raz pierwszy, ujawniono istnienie APs wywołanych osmotycznie i propagujących się wiele centymetrów wzdłuż łodygi.

Podsumowując, zlokalizowane podanie bodźca tj. wstrzyknięcie różnych substancji o różnych stężeniach u podstawy hipokotyla lub łodygi indukuje różną liczbę APs, które z różną skutecznością propagują się wzdłuż organu. Dodatkowo został tu również potwierdzony uniwersalny charakter sygnału, jakim jest AP, ponieważ wiele różnych czynników wywołuje taki sam AP. Przedstawiona powyżej możliwość wywoływania większej lub mniejszej liczby APs i sposób ich analizy jest dobrą podstawą metodyczną do dalszych badań nad problemem kodowania częstotliwościowego u roślin.

Ultradialne serie spontanicznych APs i cirkumnutacje

U roślin, oprócz APs wywołanych bodźcem (np. elektrycznym, świetlnym, mechanicznym, temperaturowym lub substancjami chemicznymi), istnieją jeszcze spontaniczne APs (SAPs) opisane po raz pierwszy u słonecznika przez Zawadzkiego i wsp. w 1995 roku (49) w Zakładzie Biofizyki oraz później przez Macedo i wsp. u pomidora (50). Spontaniczne APs to APs, których bezpośrednia przyczyna nie jest obecnie znana.

W serii eksperymentów przedstawionych w następnej publikacji **P6** wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego badałam występowanie SAPs, a także ich związek z cirkumnutacjami łodygi u trzytygodniowego słonecznika w różnych warunkach oświetlenia.

Każdy pomiar trwał trzy doby. Zastosowałam fotoperiod światło/ciemność 16/8 godz., ciągle oświetlenie ($25\text{--}40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) oraz ciągle bardzo słabe oświetlenie ($5\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). W eksperymentach tych oprócz swobodnie cirkumnutujących roślin przebadano rośliny z unieruchomionymi łodygami. Ogólnie, długość i okres cirkumnutacji, jak również liczba SAPs różniły się w zależności od warunków świetlnych. Cirkumnutacje były bardzo intensywne lub nawet całkowicie zatrzymane. W fotoperiodzie światło/ciemność rośliny cirkumnutowały w rytmie dobowym oraz pojawiały się liczne SAPs, szczególnie w okresie ciemności. W pracy tej po raz pierwszy zastosowałam sformułowaną przeze mnie nową miarę pobudliwości tj. **liczbę SAPs w ciągu doby u jednej rośliny**. Wykazałam, że liczba ta może się różnić u roślin poddawanych różnym warunkom świetlnym oraz u roślin swobodnie cirkumnutujących i unieruchomionych. Obserwowane były SAPs o amplitudzie 5-60 mV, trwające ok. 1 minuty i propagujące się z prędkością 8-19 cm min⁻¹. **Swobodnie cirkumnutujące rośliny miały dwa razy więcej SAPs (10 SAPs/24h/roślinę) niż rośliny unieruchomione (5 SAPs/24h/roślinę), a interwał pomiędzy kolejnymi APs wydłużał się dwukrotnie (z ok. 120 min do ok. 240 min). Wyniki te sugerują, że cirkumnutacje zwiększają liczbę SAPs u słonecznika.**

Dla uniknięcia zaburzeń cirkumnutacji (P1) i wywołania AP zaciemnieniem lub oświetleniem (6) zastosowano ciągle oświetlenie. Przeprowadzono serię doświadczeń z zastosowaniem bardzo słabego oświetlenia imitującego pochmurny dzień lub przedłużające się zaciemnienie rośliny. Po eksperymencie z trzydniowym niedoborem światła rośliny były przetrzymywane w komorze wegetacyjnej, gdzie przeszły typowy rozwój wegetatywny oraz zakwitły. To wskazywało, że zastosowany stres niedoboru światła mieścił się w zakresie tolerancji fizjologicznej słonecznika. W ciągłym bardzo słabym oświetleniu, cirkumnutacje były słabe i nieregularne, a SAPs występowały ale nie wykazywały rytmu dobowego. Liczba SAPs wynosiła 4-5 SAPs/24h/roślinę i była taka sama u roślin swobodnie cirkumnutujących oraz unieruchomionych. W tych warunkach występowały dwa rodzaje serii SAPs: **ultradialne serie długodystansowych SAPs** propagujące się ok. 20-35 cm wzdłuż łodygi oraz **serie lokalnych SAPs** propagujące się ok. 5 cm wzdłuż łodygi i trwające ok. 1 godziny o interwale 3-4 min pomiędzy kolejnymi APs. Serie lokalnych SAPs pojawiały się najczęściej podczas braku cirkumnutacji w ciągu trzeciej doby pomiaru. Liczba APs w takich seriach skorelowana była z czasem trwania serii, co świadczy o pewnej stałej częstotliwości SAPs. Te lokalne serie przypominały serie otrzymywane po wstrzyknięciu glutaminianu, KCl czy D-sorbitolu opisane w pracach **P2, P5 i P7** przedstawionych powyżej. Być może endogenne zasoby glutaminianu lub inne czynniki endogenne np. lokalne zmiany stężenia jonów lub naprężenia tkanek również mogą wywoływać serie APs.

Najciekawszym wynikiem przedstawionym w prezentowanej pracy (P6) była obserwacja, że SAPs pojawiają się w seriach w rytmie ultradialnym, a interwał pomiędzy

kolejnymi SAPs wynosił ok. 160 minut i był taki sam jak okres cirkumnutacji w tych warunkach. We wszystkich zastosowanych warunkach świetlnych więcej SAPs propagowało się w kierunku basipetalnym (ok.75%) niż akropetalnym (25%). SAPs propagujące się w obu kierunkach zdarzały się sporadycznie. Szczegółowe dane na temat serii SAPs i kierunku propagacji każdego APs u poszczególnych roślin umieszczono w tabelach w materiałach dodatkowych załączonych do publikacji. Dane te mogą zostać jeszcze raz wykorzystane do analiz w poszukiwaniu powtarzalnych sekwencji APs, które potencjalnie mogłyby stanowić pewien kod informacji.

W następnej serii doświadczeń przedstawionych w pracy **P7** sprawdziłam zmiany w pobudliwości elektrycznej siewek słonecznika poddanych stresowi osmotycznemu i solnemu. Obecność jonów K^+ , Cl^- i Na^+ jest kluczowa dla utrzymania potencjału spoczynkowego komórki. W pracy tej po raz pierwszy wykazałam, że rosnące w uprawie hydroponicznej siewki słonecznika generowały SAPs. Ich amplitudy i prędkość propagacji były podobne jak u trzytygodniowych roślin słonecznika i pomidora uprawianych w doniczkach z glebą. Obserwacja ta stwarza nowe perspektywy dla badań, w których będzie można modyfikować skład pożywki w celu otrzymania bardziej pobudliwych fenotypów słonecznika lub innych gatunków roślin. W pracy tej po raz drugi z sukcesem wykorzystałam wprowadzoną przeze mnie nową miarę pobudliwości tj. liczbę SAPs w ciągu doby u jednej rośliny. Wykazałam endogenną spontaniczną impulsację siewek słonecznika, która może być modulowana przez skład pożywki. W publikacji scharakteryzowałam liczbę, prędkość i kierunek propagacji SAPs. Spontaniczne APs propagowały się akropetalnie lub basipetalnie z prędkością $12-20\text{ cm min}^{-1}$. **Liczba SAP wzrastała 2-3 krotnie (7-10 SAPs/24h/roślinę) w łagodnym stresie solnym w porównaniu do liczby SAP w kontroli i silnym stresie solnym (3-4 SAPs/24h/roślinę).** Wzmożenie spontanicznej impulsacji u siewek słonecznika w łagodnym stresie solnym jest bardzo obiecującym zjawiskiem do dalszych badań. Procentowy rozkład propagowania się SAPs w kierunku basipetalnym (75%) i akropetalnym (25%) był taki sam we wszystkich zastosowanych wariantach eksperymentów. Szczególnie ciekawe było to, że 75% APs propagowało się w kierunku basipetalnym podobnie jak u trzytygodniowego słonecznika, co przedstawiłam w pracy **P6**. Analiza kierunku propagowania się SAPs może wnosić nową wiedzę na temat znaczenia sygnałów elektrycznych w życiu roślin. Sygnały te, propagując się w kierunku akropetalnym (od korzeni w kierunku liści i wierzchołka wzrostu), mogłyby nieść inną informację niż sygnały propagujące się w kierunku basipetalnym (od liści i wierzchołka wzrostu w kierunku korzeni).

To nowe podejście do określania pobudliwości elektrycznej siewek jako liczby SAPs u jednej rośliny w podczas jednej doby dla powoli cirkumnutującego hipokotyla jest uzasadnione. Powolnym ruchom cirkumnutacyjnym towarzyszą serie SAPs o niskiej

częstości (1-45 SAPs/24h/roślinę). Istnieje więc endogenna impulsacja elektryczna o bardzo niskiej ultradźwiękowej częstotliwości u siewek słonecznika, którą można by traktować jako specyficzną (dla warunków zewnętrznych lub dla danego osobnika) sygnaturę elektryczną (kodowanie informacji w oparciu o częstotliwość).

Opracowałam również nowy sposób prezentacji oryginalnych zapisów elektrofizjologicznych dokumentujący ultradźwiękowe SAPs występujące podczas jednej doby, przedstawione na filmie załączonym jako materiał dodatkowy do publikacji **P7 (Video 2)**. Taki sposób przedstawiania dobrze dokumentuje pojawiające się SAPs i może być również wykorzystywany jako łatwy do prezentacji materiał poglądowy i dydaktyczny (nawet na smartfonie).

Zaburzenia trajektorii cirkumnutacji. Potencjał czynnościowy odgrywa kluczową rolę w transdukcji bodźca środowiskowego na odpowiedź efektora. Najlepiej poznanym przykładem roli AP w wywoływaniu efektu u roślin jest przykład zamknięcia pułapki u *Dionaea muscipula* oraz zgięcia liścia u *Mimosa pudica*. Dane literaturowe wskazują, że w ruchach roślin takich jak tropizmy, nastie i nutacje udział mają długo trwające zmiany elektryczne typu ultradźwiękowe oscylacje i potencjał wariacyjny (**Kurenda i wsp. 2014, Stolarz i wsp. 2003**). Ruchy organów roślinnych (nastie i tropizmy) są sposobem adaptacji rośliny do zmieniających się warunków środowiskowych, w tym do zmiany oświetlenia (fotonastie i fototropizm). Słonecznik znany jest również z ruchów śledzących położenie Słońca (20). Ponadto reaguje on zaburzeniami cirkumnutacji po zaciemnieniu i oświetleniu (**P1**) jak również wykazuje rytm dobowy i cirkadiany cirkumnutacji (21, 23). Czy jest możliwy udział APs w regulacji ruchów cirkumnutacyjnych? Kluczowa dla całości moich badań była obserwacja, że trajektorie cirkumnutacji mogą być regularne bądź nieregularne w zależności od warunków świetlnych, co przedstawiłam w publikacji **P6** oraz na filmach zawartych w materiałach dodatkowych (**Video 1-8**). Przy zastosowaniu ciągłego oświetlenia wszystkie rośliny cirkumnutowały intensywnie, a trajektorie ich cirkumnutacji były regularnymi elipsami oraz cechował je całkowity brak SAPs. Wskazuje to jednoznacznie na to, że APs nie są niezbędne do generowania cirkumnutacji. Nie wyklucza to jednak możliwości, że jeżeli APs są obecne, to mogą one być powiązane z cirkumnutacjami. W ciągłym ale bardzo słabym oświetleniu obserwowano nieregularne trajektorie cirkumnutacji, którym towarzyszyły liczne SAPs. Zdarzały się sytuacje, również przedstawione na filmach, że **po pojawieniu się akropetalnie propagującego się SAPs, obserwowano zmianę kierunku cirkumnutacji łodygi. Akropetalnie propagującym się SAPs towarzyszyły również ruchy torsyjne polegające na gwałtownym drgnięciu/skręceniu łodygi o ok. 2-4 mm na tle powolnego ruchu cirkumnutacyjnego**, co również przedstawiłam na filmach. Spontaniczne APs pojawiały się również podczas całkowitego zatrzymania się cirkumnutacji, co świadczy o tym, że cirkumnutacje nie są

konieczne do wywołania APs, a ich źródło jest endogenne. Nie wyklucza to jednak sytuacji, że podczas występowania cirkumnutacji mogą one być regulowane przez pojawiające się endogenne APs. **Publikacja P6 zawiera materiały dodatkowe w postaci ośmiu filmów dokumentujących nieregularności, zmiany kierunku trajektorii cirkumnutacji i ruchy torsyjne.**

ROZWÓJ METODY ANALIZY CIRKUMNUTACJI

Ostatnio, dzięki rozwojowi informatyki i technik analizy obrazu, pojawiły się publikacje prezentujące różne oprogramowania do analizy np. wzrostu, rozwoju korzeni, pomiarów liści i oceny kształtu rozetowatego ulistnienia (12, 51). Dla wsparcia badań nad cirkumnutacjami opracowałam nowe oprogramowanie do czaso-przestrzennej analizy cirkumnutacji nazwane *Circumnutation Tracker (CT)* opublikowane w pracy **P4**. Utworzyłam stronę internetową (www.circumnutation.umcs.lublin.pl), na której program jest prezentowany i może być pobrany wraz z napisaną przeze mnie instrukcją obsługi i plikami demonstracyjnymi i której część stanowi integralny element publikacji **P4**. Program jest dostępny do swobodnego użytku dla naukowców i studentów oraz wszystkich zainteresowanych tą tematyką. Program *CT* w sposób istotny ułatwia i przyspiesza analizę cirkumnutacji. Badacze szeroko rozpowszechnionych wśród roślin cirkumnutacji uzyskali w ten sposób pierwsze informatyczne narzędzie typu *open source* do analizy wystandaryzowanych parametrów cirkumnutacji w odniesieniu do kierunków geograficznych i możliwe do zastosowania przy opracowywaniu cirkumnutacji różnych gatunków roślin. Badanie cirkumnutacji zmierza do ustalenia ich wewnętrznego mechanizmu oraz udziału ultradiabnego i dobowego oscylatora oraz jest istotne przy badaniu heliotropizmu, mechanizmu odpowiedzi grawitropowych i zjawiska prawo- i lewoskrętności u roślin. Program *CT* zastosowany wraz z innymi technikami badawczymi może być dobrym narzędziem do badań nad grawitropizmem, zegarem biologicznym i transportem membranowym, to jest procesami zaangażowanymi w mechanizm cirkumnutacji.

W omawianej publikacji (**P4**) przedstawiłam metodę analizy parametrów cirkumnutacji na podstawie analizy ruchów hipokotyli dwudziestu słoneczników rosnących w hydroponiku. Zostały przedstawione wymagania sprzętowe i sposób pobrania oprogramowania. Następnie, opisałam ogólny sposób pracy w *CT* oraz szczegóły dotyczące plików źródłowych, sposobów kalibrowania mierzonego czasu i przestrzeni, korekcję perspektywy i odniesienie do kierunków geograficznych. Przedstawione zostały zalety odniesienia pomiarów do kierunków geograficznych i morfologii rośliny. Następnie opisałam procedurę ręcznego zbierania współrzędnych x i y oraz sposób automatycznego określania parametrów cirkumnutacji. Zostały podane też definicje poszczególnych parametrów cirkumnutacji, które są podstawą dla pracy nad cirkumnutacjami i które pozwalają na wysoką precyzję podczas badań. Określone zostały

również pliki wyjściowe i możliwe sposoby prezentacji otrzymanych wyników. Wszystkie możliwości oprogramowania *CT* zaprezentowałam za pomocą plików demonstracyjnych. Działanie programu przedstawiłam na przykładzie analizy cirkumnutacji siewek słonecznika rosnących w kulturze hydroponicznej w wodzie destylowanej i pożywce w odniesieniu do ich morfologii. Ruchy cirkumnutacyjne siewek zostały też przedstawione na demonstracyjnym filmie *time-lapse* dołączonym do publikacji. Publikacja ta przedstawia możliwości wykorzystania szybko rozwijającej się techniki cyfrowego rejestrowania obrazu do badania ruchów roślin. Jest to jedyne do tej pory oprogramowanie do analizy ruchów cirkumnutacyjnych. Przedstawione oprogramowanie może być wykorzystywane przez różne nisko-budżetowe systemy filmujące w trybie *time-lapse*. W efekcie wyniki opublikowane w pracy **P4** mają znaczenie praktyczne. Obecnie *CT* jest wykorzystywany w badaniach i podczas przygotowywania prac magisterskich w Zakładzie Biofizyki. *CT* był wykorzystywany podczas opracowywania wyników przedstawionych w pracach **P6** i **P7**. Publikacja **P4** została zacytowana przez trzech badaczy. *CT* figuruje również jako narzędzie na bioinformatycznych platformach: *Plant Image Analysis* (51) oraz *OMICTools* (52).

Najważniejsze wyniki zawarte w monotematycznym cyklu prac:

- Wykonanie pionierskiego oprogramowania *Circumnutation Tracker*. *CT* jest przydatnym narzędziem standaryzującym i przyspieszającym opracowywanie i analizę parametrów cirkumnutacji. Zastosowanie *CT* i nieinwazyjnej metody filmowania w interwale pozwala na prowadzenie badań cirkumnutacji zgodnie z jednym z najnowszych trendów w biologii, jakim jest badanie zachowania się roślin. Program stanowi również materiał źródłowy dla innych badaczy, a w przyszłości można go rozwijać i doskonalić aż do wersji w pełni automatycznej.
- Opracowanie niestosowanej do tej pory w żadnym laboratorium metody ciągłego, wielodniowego, równoczesnego pomiaru zmian potencjału elektrycznego i cirkumnutacji na całych roślinach. Pomiary są nieinwazyjne lub mało inwazyjne. Szeroka skala czasowa pomiarów (co najmniej trzy doby) pozwoliła mi na wprowadzenie nowego parametru określającego pobudliwość roślin tj. **liczbę SAPs w ciągu doby u jednej rośliny** (SAPs/24h/roślina). Analizie podlegał nie jeden AP uzyskany po podaniu bodźca, ale różna ich liczba, od 1 do 45 na dobę, zmieniająca się w zależności od osobnika lub warunków środowiskowych. Jest to dobra podstawa metodyczna do dalszych badań nad kodowaniem częstotliwościowym i rolą APs u roślin. Wprowadziłam również nową metodę dokumentowania oryginalnych zapisów elektrofizjologicznych SAPs na filmie (Video 2, P7).
- **Odkrycie, że wolno cirkumnutujące hipokotyle i lodygi słonecznika generują rytm SAPs o niskiej ultradiadnej częstotliwości. Po raz pierwszy wykazałam, że oprócz ultradiadnego**

powolnego rytmu cirkumnutacji istnieje ultradialny powolny rytm SAPs. Interwał pomiędzy kolejnymi SAPs jest taki sam jak okres cirkumnutacji i wynosi 2-3 godziny.

- Wykonanie charakterystyki spontanicznych serii lokalnych APs o wysokiej częstotliwości (1 AP co 3-4 minuty) i ultradialnych serii długodystansowych APs (1 AP co 2-3 godziny).
- Odkrycie i scharakteryzowanie spontanicznych APs u siewek słonecznika rosnących w kulturach hydroponicznych. Wykazałam, że odpowiednia modyfikacja pożywki w kulturze hydroponicznej może zmieniać spontaniczne i indukowane glutaminianem pobudzenia uzyskane na całych siewkach. Badanie pobudliwości roślin uprawianych na odpowiednio dobranych pożywkach daje nowe możliwości przyszłych badań elektrofizjologicznych.
- W warunkach fotoperiodu światło/ciemność swobodnie cirkumnutujące rośliny słonecznika generują ok. dwa razy więcej SAPs niż rośliny unieruchomione, zatem cirkumnutacje zwiększają liczbę SAPs u słonecznika.
- Liczba spontanicznych pobudzeń jest zależna od warunków zewnętrznych. Wykazałam całkowity brak SAPs u siewek rosnących w wodzie destylowanej i D-sorbitolu, a zwiększoną ich liczbę i prędkość propagacji w łagodnym stresie solnym. Ujawniłam także zwiększoną liczbę SAPs/24h/roślinę podczas niedoboru światła u trzytygodniowego słonecznika. Pojawianie się SAPs było wywołane stresem niedoboru światła, ponieważ w lepszych warunkach świetlnych SAPs nie występowały. Pojawianie się SAPs i zmiany cirkumnutacji towarzyszą adaptacji roślin słonecznika do warunków środowiska.
- Spontaniczne APs towarzyszą nieregularnościom cyrkumnutacji. Udokumentowałam, również na filmach, że po przejściu akropetalnie propagującego się AP następowała zmiana kierunku cirkumnutacji łodygi. Akropetalnie propagującym się SAPs towarzyszyły również ruchy „torsyjne”.
- Zahamowanie cirkumnutacji u siewek rosnących w wodzie destylowanej i D-sorbitolu, a ich wysoka intensywność w łagodnym, a nawet w silnym stresie solnym, podkreśla znaczenie obecności jonów potasu, sodu i chloru dla cirkumnutacji. Wskazuje to również na słuszność przedstawionego przeze mnie elektrofizjologicznego modelu cirkumnutacji (**Stolarz 2009**).
- Zastosowanie nowej metody wstrzyknięcia do łodygi lub hipokotyła słonecznika substancji neuroaktywnych do badań nad pobudliwością elektryczną i motoryką całych roślin.
- Glutaminian indukuje serie APs i przejściowo hamuje cirkumnutacje.
- Lit wydłużał, a silny stres solny znacznie hamował serie APs wywołane glutaminianem. Signaling elektryczny u roślin może zatem być modulowany przez warunki środowiskowe, a ujawnia się to w zmienionej liczbie pojawiających się APs.
- Chlorek potasu, woda destylowana, i D-sorbitol, ale nie chlorek sodu, indukują serie APs.

- Zróżnicowane pod względem liczby APs odpowiedzi na bodźce wskazują, że podobnie jak u zwierząt, również u roślin może istnieć sygnatura częstotliwości APs. Dodatkowo również różna liczba SAPs w różnych warunkach oświetlenia, osmotyczności i zasolenia pożywki wskazuje na potencjalną rolę APs w kodowaniu informacji. Wykazałam możliwość występowania wielu APs w różnych odstępach czasowych. Moje dwie ostatnie prace przyczyniły się do potwierdzenia istnienia SAPs u roślin i wykazały, że jest to zjawisko powtarzalne i nie tak „kapryśne” jak się wcześniej wydawało (49).
- Otrzymanie fenotypów słoneczników o niższej i wyższej liczbie generowanych APs. Również u roślin pobudliwość jako zdolność do generowania APs może wyrażać się mniejszą lub większą liczbą APs pojawiających się po podaniu bodźca w zależności od jego jakości. Otrzymałam fenotypy słonecznika różniące się od siebie stopniem pobudliwości w warunkach słabego światła, po traktowaniu litem, w warunkach stresu solnego i osmotycznego.
- Opracowanie nowego parametru opisującego cirkumnutacje z uwzględnieniem długości hipokotyla tj. intensywność cirkumnutacji.
- Wykazanie że światło, lit, stres osmotyczny i solny inaczej wpływają na cirkumnutacje, a inaczej na wzrost. Cirkumnutacje mogą być zahamowane zanim jeszcze wzrost zostanie zahamowany np. po oświetleniu rośliny oraz zastosowaniu 40 mM chlorku litu oraz odwrotnie: wzrost może być zahamowany (stres solny i chlorek litu), ale nie cirkumnutacje. Intensywność wzrostu i cirkumnutacje są częściowo od siebie niezależne, a zmiany cirkumnutacji mogą być raczej precyzyjnym markerem zachowania się roślin, a nie wzrostu.

Literatura

1. Darwin C, Darwin F (1880) *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London
2. Engelmann W, Johnsson A (1998) Rhythms in organ movement, In: *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants* P. Lumsden and A. Millar, Editors., BIOS Scientific Publishers: Oxford. p. 35-50
3. Millet B, Badot P (1996) The revolving movement mechanism in *Phaseolus*; New approaches to old questions, In: *Vistas on Biorhythmicity*, H. Greppin, R. Degli Agosti, and M. Bonzon, Editors.: University of Geneva. p. 77-98
4. Dziubińska H (2003) Ways of signal transmission and physiological role of electrical potentials in plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72(4): p. 309-318
5. Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell and Environment*, 30(3): p. 249-257
6. Król E, Dziubińska H, Trębacz K (2010) What do plants need action potentials for?, in *Action potential*, M.L. DuBois, Editor., Nova Science Publisher: New York. p. 1-28
7. Sibaoka T (1991) Rapid plant movements triggered by action potentials. *The Botanical Magazine, Tokyo*, 104(1073): p. 73-95
8. Paszewski A, Dziubinska H, Trębacz K, Zawadzki T (1982) Electrical activity of the liverwort *Conocephalum conicum*. Method of investigation and general characteristics of excitation. *Physiologia Plantarum*, 54(1): p. 83-87
9. Riviere M, Derr J, Douady S (2017) Motions of leaves and stems, from growth to potential use. *Physical Biology*, 14(5)

10. Del Dottore E, Mondini A, Sadeghi A, Mattoli V, Mazzolai B (2018) An efficient soil penetration strategy for explorative robots inspired by plant root circumnutation movements. *Bioinspiration & Biomimetics*, 13(1)
11. Spalding EP, Miller ND (2013) Image analysis is driving a renaissance in growth measurement. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1): p. 100-104
12. Lobet G, Draye X, Perilleux C (2013) An online database for plant image analysis software tools. *Plant Methods*, 9:38
13. Zawadzki T, Davies E, Dziubińska H, Trebacz K (1991) Characteristics of action potentials in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum*, 83(4): p. 601-604
14. Paszewski A, Zawadzki T (1973) Action potentials in *Lupinus angustifolius* shoots. *Journal of Experimental Botany*, 24(82): p. 804-809
15. Paszewski A, Zawadzki T (1974) Action potentials in *Lupinus angustifolius* shoots. 2. Determination of strength-duration relation and all-or-nothing law. *Journal of Experimental Botany*, 25(89): p. 1097-1103
16. Paszewski A, Zawadzki T (1976) Action potentials in *Lupinus angustifolius* shoots 3. Determination of refractory periods. *Journal of Experimental Botany*, 27(97): p. 369-374
17. Zawadzki T, Trebacz K (1982) Action-potentials in *Lupinus angustifolius* shoots .6. Propagation of action-potential in the stem after the application of mechanical block. *Journal of Experimental Botany*, 33(132): p. 100-110
18. Johnsson A (1997) Circumnutations: Results from recent experiments on Earth and in space. *Planta*, 203: p. 147-158
19. Johnsson A, Solheim BGB, Iversen TH (2009) Gravity amplifies and microgravity decreases circumnutations in *Arabidopsis thaliana* stems: results from a space experiment. *New Phytologist*, 182(3): p. 621-629
20. Vandenbrink JP, Brown EA, Harmer SL, Blackman BK (2014) Turning heads: The biology of solar tracking in sunflower. *Plant Science*, 224: p. 20-26
21. Buda A, Zawadzki T, Krupa M, Stolarz M, Okulski W (2003) Daily and infradian rhythms of circumnutation intensity in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum*, 119(4): p. 582-589
22. Charzewska A, Kosek W, Zawadzki T (2010) Does circumnutation follow tidal plumb line variations? *Biological Rhythm Research*, 41(6): p. 449-455
23. Charzewska A, Zawadzki T (2006) Circadian modulation of circumnutation length, period, and shape in *Helianthus annuus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(4): p. 324-331
24. Grefen C, Honsbein A, Blatt MR (2011) Ion transport, membrane traffic and cellular volume control. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3): p. 332-339
25. Trębacz K, Schönknecht G, Dziubinska H, Hanaka A (2007) Characteristics of anion channels in the tonoplast of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiology*, 48(12): p. 1747-1757
26. Trębacz K, Simonis W, Schönknecht G (1994) Cytoplasmic Ca^{2+} , K^{+} , Cl^{-} , and NO_3^{-} activities in the liverwort *Conocephalum conicum* at rest and during action-potentials. *Plant Physiology*, 106(3): p. 1073-1084
27. Trębacz K, Simonis W, Schonknecht G (1997) Effects of anion channel inhibitors on light-induced potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant and Cell Physiology*, 38(5): p. 550-557
28. Trębacz K, Tarnecki R, Zawadzki T (1989) the effects of ionic channel inhibitors and factors modifying metabolism on the excitability of the liverwort *conocephalum-conicum*. *Physiologia Plantarum*, 75(1): p. 24-30
29. Moran N (2007) Osmoregulation of leaf motor cells. *FEBS Letters*, 581(12): p. 2337-2347
30. Shabala S (2003) Physiological implications of ultradian oscillations in plant roots. *Plant Soil*, 255(1): p. 217-226
31. Shabala SN, Newman IA (1997) Proton and calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutation. *Physiologia Plantarum*, 100(4): p. 917-926
32. Stankovic B, Witters DL, Zawadzki T, Davies E (1998) Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiologia Plantarum*, 103(1): p. 51-58
33. Stankovic B, Zawadzki T, Davies E (1997) Characterization of the variation potential in sunflower. *Plant Physiology*, 115(3): p. 1083-1088
34. Trębacz K, Zawadzki T (1985) Light-triggered action potentials in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiologia Plantarum*, 64(4): p. 482-486

35. Murch SJ (2006) Neurotransmitters, neuroregulators and neurotoxins in plants. *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life*, ed. F. Baluska, S. Mancuso, and D. Volkmann. 137-151
36. Davenport R (2002) Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany*, 90(5): p. 549-557
37. Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9): p. 2339-2358
38. Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi G (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*, 396(6707): p. 125-126
39. Aral H, Vecchio-Sadus A (2008) Toxicity of lithium to humans and the environment - A literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3): p. 349-356
40. Shahzad B, Mughal MN, Tanveer M, Gupta D, Abbas G (2017) Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1): p. 103-115
41. Brenner ED (2017) Smartphones for Teaching Plant Movement. *American Biology Teacher*, 79(9): p. 740-745
42. Zachariassen E, Johnsson A (1988) Effects of lithium ions on the circumnutations of *Helianthus hypocotyls*. *Physiol Plant*, 72(72): p. 147-152
43. Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1): p. 651-681
44. Shabala S (2000) Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant Cell and Environment*, 23(8): p. 825-837
45. Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5): p. 441-445
46. Hayashi Y, Nishiyama H, Tanoi K, Ohya T, Nihei N, Tanioka K, Nakanishi TM (2004) An aluminum influence on root circumnutation in dark revealed by a new super-HARP (high-gain avalanche rushing amorphous photoconductor) camera. *Plant Cell Physiology*, 45(3): p. 351-356
47. Dziubińska H, Trębacz K, Zawadzki T (2001) Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. *Journal of Plant Physiology*, 158(9): p. 1167-1172
48. Favre P, Greppin H, Degli Agosti R (2011) Accession-dependent action potentials in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 168(7): p. 653-660
49. Zawadzki T, Dziubińska H, Davies E (1995) Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum*, 93(2): p. 291-297
50. Macedo FCO, Dziubińska H, Trębacz K, Oliveira RF, Moral RA (2015) Action potentials in abscisic acid-deficient tomato mutant generated spontaneously and evoked by electrical stimulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(10)
51. Lobet G (2017) Image Analysis in Plant Sciences: Publish Then Perish. *Trends in Plant Science*, 22(7): p. 559-566
52. Henry VJ, Bandrowski AE, Pepin AS, Gonzalez BJ, Desfeux A (2014) OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation* ID 10.1093/database/bau069
53. Larson KC (2000) Circumnutation behavior of an exotic honeysuckle vine and its native congener: Influence on clonal mobility. *American Journal of Botany*, 87(4): p. 533-538

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Równolegle do przedstawionych powyżej badań, które wchodziły w skład osiągnięcia naukowego, uczestniczyłam w pracach badawczych, których wyniki znajdują się w publikacjach, których jestem współautorem. Tematyka tych prac obejmowała: cirkumnutacje, zjawisko oscylacji potencjału elektrycznego, i występowanie APs u różnych gatunków roślin (*Conocephalum conicum*, *Dionaea muscipula*, *Arabidopsis thaliana*), w tym również u roślin mięsożernych i roślin żyjących w symbiozie z bakteriami z grupy *Rhizobium* (*Medicago truncatula*).

Cirkumnutacje są szeroko rozpowszechnione wśród roślin i jest to jeden z powodów, dla którego zajęłam się badaniem tego zjawiska. Cirkumnutują hipokotyle, koleoptyle, łodygi,

pędy, szypułki kwiatowe, wąsy, liście i korzenie bardzo wielu gatunków roślin. Cirkumnutacje u różnych gatunków roślin szeroko opisał Karol Darwin w swoim dziele *The Power of Movement in Plants* w roku 1880 (1). Dla lepszego zrozumienia roli cirkumnutacji i APs we wzroście słonecznika, moje zainteresowania badawcze ukierunkowane były na ogólny opis zjawiska cirkumnutacji oraz jego podstawy komórkowe i molekularne. W swojej pracy przeglądowej (Stolarz, 2009) przedstawiłam cirkumnutowanie jako widoczną endogenną aktywność i odpowiedź motoryczną rośliny. Cirkumnutacje to zjawisko złożone, w którym uczestniczą procesy wzrostowe, procesy komunikacji międzykomórkowej oraz zegar biologiczny ultradienny i dobowy. W jednym zintegrowanym opisie, przedstawiona została rola kanałów jonowych, akwaporyn, syntazy celulozowej, zmian turgoru i zmian potencjału membranowego w mechanizmie cirkumnutacji. W przedstawionym przeze mnie elektrofizjologicznym modelu cirkumnutacji znane dla poduszek i komórek szparkowych sekwencje przepływów jonowych zostały zaadoptowane do mechanizmu cirkumnutacji. Zaprezentowany w pracy hipotetyczny elektrofizjologiczny mechanizm cirkumnutacji był podstawą teoretyczną dla moich badań.

Szczególnie intrygująca jest również funkcja cirkumnutacji w życiu roślin. Jest ona oczywista u roślin pnących, które w ten sposób poszukują podpory jak podkreślał K. Darwin w swoim dziele o ruchach roślin (1). Znane są również nowsze ekologiczne badania na *Lonicera japonica* (Thunb.) dotyczące znaczenia cirkumnutacji dla ekspansji i zajmowania nowych terenów w środowisku (53). Większość roślin nie jest roślinami pnącymi, a jednak cirkumnutuje. Wytlumaczeniem funkcji tego ruchu w życiu rośliny jest teoria Engelmanna i Johnssona (2), według której cirkumnutacje zapewniają stabilność hipokotyla podczas elongacji. Jednocześnie w literaturze relacje ze wzrostem nie są jednoznacznie opisane. Moje późniejsze prace (P1, P6, P7) przyczyniły się do lepszego opisu relacji cirkumnutacji ze wzrostem i stwierdzenia, że nie zawsze szybkiemu wzrostowi towarzyszą intensywne cirkumnutacje oraz że nie zawsze wraz z zahamowaniem wzrostu maleją cirkumnutacje. Zjawisko cirkumnutowania u roślin jest doskonałym modelem do badań zachowania się roślin i dla biologii systemowej. Przedstawiana praca przeglądowa (Stolarz, 2009) została opublikowana w czasopiśmie międzynarodowym, jest wiele razy cytowana, w tym w najlepszych czasopismach biologicznych, co potwierdza aktualność podjętego problemu. Autorzy chętnie korzystają z tej pracy ponieważ jest ona najnowszą do tej pory pracą przeglądową i kompendium wiedzy o cirkumnutacjach.

Stolarz M (2009) Circumnutation as a visible plant action and reaction: physiological, cellular and molecular basis for circumnutations. *Plant Signaling & Behavior* 4: 380-387 (Web of Science 25 cytowań, Scopus 30, Google Scholar 37)

Wykonałam stronę internetową poświęconą cirkumnutacjom i sygnałom elektrycznym u roślin (www.circumnutation.umcs.lublin.pl), służącą udostępnieniu i popularyzacji moich wyników badań. Jest tam zawarta kolekcja 26 filmów *time-lapse* z opisami cirkumnutacji różnych gatunków roślin. Wyniki moich badań mają charakter ogólnobiologiczny i dotyczą mechanizmu ruchów endogennych i długodystansowego signalingu elektrycznego u roślin. Szeroko rozpowszechnione wśród roślin cirkumnutacje nie mają swojej adekwatnej reprezentacji w nauczaniu o ruchach roślin. Stąd pomysł by popularyzować wiedzę o cirkumnutacjach przez powszechnie dostępną tematyczną stronę internetową. Pozwala to na szersze wykorzystanie zebranych przeze mnie w trakcie badań materiałów filmowych w dydaktyce i nauczaniu o ruchach roślin i sygnałach elektrycznych.

Oprócz przedstawionych przeze mnie wywołanych bodźcem i spontanicznych APs (**P2**, **P5**, **P6**, **P7**) istotną rolę w cirkumnutowaniu mogą pełnić długotrwałe oscylacje potencjału elektrycznego. Uczestniczyłam w badaniach oscylacji potencjału elektrycznego prowadzonych we współpracy z prof. Arturem Zdunkiem z Instytutu Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Badania te były przeprowadzone przy wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant NN301464534. W pracy opisano depolaryzację komórek po stronie wklęsłej łodygi i w tym samym czasie hiperpolaryzację po stronie wypukłej łodygi. Nowe było podejście, w którym zastosowano odniesienie położenia cirkumnutującego pędu (na płaszczyźnie geograficznej wschód-zachód, północ-południe) do położenia zmian potencjału elektrycznego w łodydze. Zastosowano elektrody wkłuwane pod skórę łodygi słonecznika w odniesieniu do kierunków geograficznych. Zastosowana metoda była modyfikacją mojej metody zastosowanej w pracy doktorskiej. Dzięki zastosowaniu odniesień do kierunków geograficznych możliwe było określenie położenia poszczególnych faz cirkumnutacji w stosunku do depolaryzacji i hiperpolaryzacji poszczególnych stron łodygi słonecznika. Ponadto wykazano, że depolaryzacje/hyperpolaryzacje wyprzedzają o ok. 30 minut zgięcie łodygi. W pracy tej wykorzystywana została również wprowadzona przeze mnie po raz pierwszy metoda wstrzyknięcia roztworu do łodygi (**P2**). Tutaj przez wstrzyknięcie aplikowane były inhibitory kanałów jonowych. Wyniki zawarte w omawianej publikacji potwierdziły, że komórkowy mechanizm cirkumnutacji związany jest z transmembranowym przepływem jonów, a źródłem cirkumnutacji mogą być cykliczne zmiany potencjału elektrycznego. Potwierdza to, że cirkumnutacje mogą być wywoływane przez ultradłgie oscylacje potencjału elektrycznego i wskazuje na elektrofizjologiczne podłoże cirkumnutacji.

Kurenda A, **Stolarz M**, Zdunek A (2014) Electrical potential oscillations - movement relations in circumnutating sunflower stem and effect of ion channel and proton pump inhibitors on circumnutation. **Physiologia Plantarum** **153:307-317** IF₂₀₁₄ **3,138/**
IF₂₀₁₇ **2,580** MNiSW₂₀₁₄ **40/MNiSW₂₀₁₆ 40** IF_{5 year} **2,986**

W moich badaniach zaliczonych do osiągnięcia naukowego posługiwałam się metodą zewnątrzkomórkowego pomiaru AP, która jest uzupełnieniem metody wewnątrzkomórkowej, mikroelektrodowej, od wielu lat stosowanej w naszym zespole badawczym. Podczas pomiarów mikroelektrodowych rejestrowane są APs z pojedynczych komórek we fragmentach tkanek. Jest to precyzyjna rejestracja zmian potencjału błonowego, ale w krótkim czasie po podaniu bodźca. Szeroka skala czasowa moich pomiarów (kilka dni) i zarejestrowanie wielu APs na całej rosnącej i cirkumnutowącej roślinie jest uzupełnieniem badań na poziomie tkankowym i komórkowym prowadzonych metodą mikroelektrodową. Brałam udział w cyklu takich badań prowadzonych w Zakładzie Biofizyki UMCS. Dotyczyły one APs u *Dionaea muscipula* i *Conocephalum conicum*. Zarejestrowane APs były wywoływane przez różne bodźce np. elektryczne, świetlne lub glutaminian.

Badane były komórki mezofilu pułapki liściowej *Dionaea muscipula*. Wykazano, że u *Dionaea muscipula* oprócz stymulacji mechanicznej, elektrycznej i bodźca świetlnego, również zmiana temperatury może wywołać AP. W serii eksperymentów zastosowano inhibitory kanałów jonowych potasowych, anionowych, różnych typów plazmolemmowych i wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych. Celem pracy było sprawdzenie, czy ogólny schemat aktywacji kanałów jonowych wapniowych, chlorowych i potasowych, podczas AP, opisany dla komórek *Chara* i *Conocephalum conicum* stosuje się również do APs *Dionaea muscipula*. Wyniki eksperymentów potwierdziły ogólny schemat zaangażowania wapnia w pierwszej fazie depolaryzacji, następnie podtrzymywanej przez chlor i w końcowej fazie przez wpływ potasu. Ustalono również, że podczas AP zarówno zewnątrzkomórkowe jak i wewnątrzkomórkowe zasoby stanowią źródła napływu jonów wapnia do cytoplazmy.

Uczestniczyłam również w badaniach nad wpływem glutaminianu i innych aminokwasów na pobudliwość wątrobowca *Conocephalum conicum*. Badania te były finansowane z grantu Komitetu Badań Naukowych 3P04C05325 kierowanym przez prof. Kazimierza Trębacza. *Conocephalum conicum* jest rośliną niższą należącą do wątrobowców, która stosunkowo dobrze pobudza się. W Zakładzie Biofizyki opisano dla niej parametry i prawa pobudliwości oraz komponent wapniowy AP. W odpowiedzi na bodźce nieuszkodzające i uszkodzające plecha *Conocephalum conicum* generuje APs, w tym również serie. W omawianej pracy badany był potencjał spoczynkowy, AP i wapniowa składowa AP zwana potencjałem przejściowym (*voltage transient*). Podanie 5 lub 15 mM glutaminianu lub glicyny

wywoływało jeden lub serie APs. Jest to również przykład zróżnicowania siły bodźca (różne stężenie) i liczby pojawiających się APs. W publikacji tej po raz pierwszy zostały przedstawione u roślin serie APs generowane po podaniu glutaminianu lub glicyny. W przeprowadzonych później przeze mnie eksperymentach na słoneczniku przedstawionych w publikacji **P2** serie takie po raz pierwszy zostały opisane u rośliny naczyniowej. Badania te ujawniły, że u roślin istnieje glutaminianergiczna pobudliwość i że stanowi ona analogię do glutaminianergicznej pobudliwości u zwierząt.

Król E, Dziubińska H, **Stolarz M**, Trębacz K (2006) Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. **Biologia Plantarum** **50**: 411-416 IF₂₀₀₆ 1,198/ IF₂₀₁₇ 1,424 MNiSW₂₀₀₆ -/MNiSW₂₀₁₆ 25 IF_{5 year} 1,511 cyt. *Web of Science* 33

Król E, **Stolarz M**, Dziubińska H, Trębacz K (2006) Receptory glutaminianu u roślin. *Acta Universitatis Lodzensis* 3: 67-73 MNiSW₂₀₁₆ 6

Król E, Dziubińska H, Trębacz K, Koselski M, **Stolarz M** (2007) The influence of glutamic and aminoacetic acids on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum*. **Journal of Plant Physiology** **164**: 773-784 IF₂₀₀₇ 2,239/ IF₂₀₁₇ 2,833 MNiSW₂₀₀₇ -/MNiSW₂₀₁₆ 35 IF_{5 year} 3,034 cyt. *Web of Science* 9

Problem pobudliwości elektrycznej najwcześniej był przedmiotem badań u roślin mięsożernych, a mechanizm APs roślin mięsożernych jest obecnie przedmiotem szczegółowych badań. Zagadnienia związane z mięsożernością roślin zostały obszernie opisane w pracy przeglądowej, w której jestem współautorem, zrealizowanej przy wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przez grant NN301464534 kierowany przez prof. Kazimierza Trębacza oraz przez granty N304002536 i N304220135 kierowane przez prof. Bartosza Płachno z Zakładu Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz przez Research Program of the Academy of Sciences of the Czech Republic, AV0Z60050516 kierowanym przez prof. Lubomíra Adamca. Rośliny mięsożerne posiadają złożone morfologiczne i fizjologiczne przystosowania do mięsożerności. Czerpią one korzyści pokarmowe z chwytania niewielkich zwierząt. Rośliny mięsożerne nie mają istotnego znaczenia ekonomicznego w rolnictwie, ale przyciągają uwagę naukowców jako wygodny model badawczy, w tym szczególnie w temacie szybkich ruchów roślin i pobudliwości. Mechanizm AP jest u nich dobrze poznany. Potencjały czynnościowe *Dionaea muscipula* i *Aldrovanda vesiculosa* są najszybciej propagującymi się sygnałami elektrycznymi poznanyymi u roślin: 80-250 mm s⁻¹,

natomiast u roślin nie-mięsożernych ok. 30 mm s⁻¹. Również czas trwania jest krótki od ok. 1 s do kilku sekund u roślin mięsożernych, natomiast u roślin niższych i naczyniowych wynosi ok. jednej, a nawet kilku minut. Co ciekawe, właśnie seria APs, a nie pojedynczy AP, wygenerowana w pułapce przez powtarzające się potrącenia włoska czuciowego wyzwała całkowite zamknięcie się pułapki. Rośliny mięsożerne są również przedmiotem badań genetycznych. Badania nad *Dionaea muscipula* zmierzają do znalezienia genów zaangażowanych w ruch pułapki oraz genów odpowiedzialnych za ekspresję kanałów jonowych zaangażowanych w AP wyzwalający zamknięcie pułapki. Rośliny mięsożerne zasiedlają ekstremalnie ubogie siedliska. Dla współczesnej biologii i biotechnologii fizjologia roślin mięsożernych jest szczególnie ciekawa w kontekście alternatywnych sposobów pobierania związków azotu przez rośliny w środowiskach ubogich w makroelementy. Rośliny te wykorzystują swoją ofiarę głównie jako alternatywne źródło azotu, fosforu i siarki, ale także jako źródło jonów, np. potasu i magnezu.

Król E, Płachno BJ, Adamec L, **Stolarz M**, Dziubińska H, Trębacz K (2012) Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. **Annals of Botany** 109: 47-64 IF₂₀₁₂ 4,449/ IF₂₀₁₇ 3,646 MNiSW₂₀₁₂ 40/MNiSW₂₀₁₆ 40 IF_{5 year} 4,246 cyt. *Web of Science* 52

Innym ważnym problemem badawczym współczesnej biotechnologii jest możliwość wykorzystania olbrzymich zasobów azotu atmosferycznego przez rośliny żyjące w symbiozie z mikroorganizmami. W związku z tym, intensywnie poszukuje się czynników uczestniczących w symbiozie roślin z bakteriami brodawkowymi. W ramach międzynarodowego projektu badawczego POLONIUM 35377YF „*Role of electrical signalling in plant-rhizobia symbiosis*” pod kierownictwem prof. Kazimierza Trębacza brałam udział w badaniach, których celem była charakterystyka sygnałów elektrycznych u modelowej rośliny motylkowej *Medicago truncatula*. Projekt był realizowany we współpracy z prof. Jean-Baptiste Thibaud i prof. Hervé Sentenac z Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) w Montpellier we Francji. We współpracy z wyżej wymienionym ośrodkiem prowadzone były również badania pobudliwości i cirkumnutacji *Arabidopsis thaliana* u typu dzikiego i mutantów *akt2* i *gork* (ze znokautowanymi genami kodującymi kanały potasowe) w ramach projektu POLONIUM “*Disclosing molecular basis of electrical signalling in plants*”. Wyniki tych badań zostały opisane w raportach merytorycznych z realizacji projektów oraz zostały przedstawione w 5 doniesieniach konferencyjnych, a w chwili obecnej są przygotowywane do druku dwa artykuły.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania nad cirkumnutacjami i długodystansowymi sygnałami elektrycznymi u roślin. Przedstawione wyniki wykazały istnienie nowego zjawiska SAPs o ultradźwiękowej częstotliwości, takiej samej jak okres cirkumnutacji słonecznika, dlatego w dalszych badaniach planuję dokładniejszą charakterystykę tego zjawiska. Analiza częstości, prędkości i kierunku propagowania się SAPs może ujawnić dalsze prawidłowości w pojawianiu się tych sygnałów w związku z cirkumnutacjami, warunkami środowiskowymi lub fazą wzrostu roślin. Zamierzam prowadzić badania SAPs zarówno u słonecznika jak i innych gatunków roślin, ze szczególnym uwzględnieniem roślin żyjących w symbiozie z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny oraz problemów związanych z nawożeniem mineralnym. Moje wstępne wyniki potwierdzają istnienie SAPs u *Lupinus angustifolius* i *Medicago truncatula* – modelowych roślin motylkowatych. We współpracy z badaczami z Institut National de la Recherche Agronomique w Montpellier w badaniach tych zamierzam wykorzystać mutanty kanału potasowego i receptora glutaminianu *Medicago truncatula*. Obiecujące dla dalszych badań wydaje mi się odpowiednie modyfikowanie pożywki w hydroponiku w celu uzyskiwania roślin z nasiloną spontaniczną impulsacją. W tym kontekście interesujący jest temat nawożenia azotowego i potasowego związany również z problemem wylegania roślin użytkowych. Przedstawiona przeze mnie problematyka wpływu litu, glutaminianu, stresu solnego i osmotycznego na pobudliwość i cirkumnutacje u roślin jest nadal niewyczerpana, a przedstawione wyniki są dobrą podstawą do dalszych odkryć.

Planuję także we współpracy z informatykami ulepszyć oprogramowanie *Circumnutation Tracker*, aby analiza filmów *time-lapse* była w pełni automatyczna i wyposażona w odpowiednią analizę statystyczną, co znacznie przyspieszyłoby uzyskiwanie nowych wyników. W przyszłych badaniach zamierzam wykorzystać dotychczasowe dobrze znane mi techniki filmowania i pomiaru potencjału elektrycznego metodą zewnątrzkomórkową, a także we współpracy z innymi badaczami zastosować technikę mikroelektrodową *patch-clamp* i nie-inwazyjną technikę mikroelektrodową do pomiarów przepływów jonowych (MIFE) i charakterystyki kanałów jonowych w komórkach motorycznych strefy elongacyjnej cirkumnutujących organów.

Planuję również działalność popularyzującą wyniki moich badań. Zamierzam rozbudować moją kolekcję filmów na temat cirkumnutacji i stworzyć bazę danych parametrów cirkumnutacji u różnych gatunków roślin. Ulepszona strona internetowa będzie mogła stanowić jeszcze lepszy materiał źródłowy i dydaktyczny do popularyzacji wiedzy na temat cirkumnutacji i występowania długodystansowych sygnałów elektrycznych u roślin.

Dane bibliometryczne

	Sumaryczny IF (zgodnie z rokiem opublikowania)	Suma punktów MNiSW 2016(17)	Liczba cytowań (bez autocytowań) <i>Web of Science</i>
Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora	2,222	55	16
Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	12,848	170	20
Prace nie wchodzące w skład osiągnięcia	11,024	146	119
Wszystkie prace habilitanta (10.07.2018)	26,094	371	155

Index Hirscha (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	8
Liczba projektów badawczych w których brałam udział (kierownik 1, wykonawca 5)	6
Liczba komunikatów zjazdowych (prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych)	28
Liczba wygłoszonych referatów	5
Liczba wykonanych recenzji do czasopism międzynarodowych	10

Maria Stolarz