

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

Dr Agnieszka Hanaka

Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2019

dr Agnieszka Hanaka
Zakład Fizjologii Roślin
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
agnieszka.hanaka@poczta.umcs.lublin.pl
tel. 81 537 59 94

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Hanaka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1997 Tytuł zawodowy – magister biologii w zakresie biochemii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Zakład Biofizyki
Praca magisterska pt. „Wpływ jonów magnezu na zmiany potencjału membranowego *Conocephalum conicum* wywołane bodźcami elektrycznymi i świetlnymi”
Promotor – prof. dr hab. Kazimierz Trębacz

2007 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Zakład Biofizyki
Praca doktorska pt. „Określenie zasad funkcjonowania kanałów jonowych w tonoplaście wątrobowca *Conocephalum conicum*”
Promotor – prof. dr hab. Kazimierz Trębacz

Studia podyplomowe

2002-2003 Politechnika Lubelska i Uniwersytet Illinois w USA,
studia podyplomowe w zakresie Zarządzanie i Marketing

2003-2004 Politechnika Lubelska i Uniwersytet Illinois w USA,
menedżerskie studia podyplomowe Master of Business Administration

2015-2016 Uniwersytet Rzeszowski, Pozawydziałowy Zamiejscowy
Instytut Biologii Stosowanej i Nauk Podstawowych
Uniwersytetu Rzeszowskiego w Werynii, Ziołoznawstwo

Ważniejsze kursy i szkolenia

2012 – seminarium – LCMS and GCMS. Perlan Technologies, 26-27.09.2012, Warszawa

2013 – Hodowle komórkowe. Analiza komórek. Merck Millipore, 28.10.2013, Lublin

2014 – seminarium – LCMS i GCMS. Perlan Technologies, 21-22.10.2012, Jachranka

2015 – Kurs doskonalący – Charakterystyka białek: elektroforeza SDS PAGE i „western blotting”. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 19-21.10.2015, Warszawa

2015 – Kurs doskonalący – Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE, metoda i zastosowanie. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 24-26.11.2015, Warszawa

2016 – Kurs doskonalący – Podstawy techniki immunoenzymatycznej ELISA – kurs praktyczny. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 13.01.2016, Warszawa

2016 – Kurs doskonalący – Techniki biologii molekularnej. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 11-14.04.2016, Warszawa

2016 – Kurs doskonalący – Podstawy chromatografii. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z uwzględnieniem peptydów i białek. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 27-29.04.2016, Warszawa

2017 – Warsztaty GIS dla botaników – Wydziałowa Pracownia Biologicznych Informacji Przestrzennych, Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 4-6.09.2017, Lublin

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od **16.02.2009** do chwili obecnej – adiunkt

Zakład Fizjologii Roślin

Instytut Biologii i Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

(do września 2011 – Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi)

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Lublin

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Odpowiedź fizjologiczna roślin na nadmiar miedzi oraz czynniki biotyczne (glebowy izolat bakteryjny, owad żerujący na liściach) modyfikowana obecnością cząsteczki sygnałowej – jasmonianu metylu

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl publikacji złożony z sześciu oryginalnych prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej opublikowanych w latach 2015-2019.

Oryginalne prace eksperymentalne

H1. Hanaka A., Maksymiec W., Bednarek W. 2015. The effect of methyl jasmonate on selected physiological parameters of copper-treated *Phaseolus coccineus* plants. Plant Growth Regulation 77: 167-177.

IF₂₀₁₅ = 2,333; MNiSW = 30 pkt; liczba cytowań (bez autocytowań) = 7

H2. Hanaka A., Wójcik M., Dresler S., Mroczek-Zdyrska M., Maksymiec W. 2016. Does methyl jasmonate modify the oxidative stress response in *Phaseolus coccineus* treated with Cu? Ecotoxicology and Environmental Safety 124: 480-488.

IF₂₀₁₆ = 3,743; MNiSW = 30 pkt; liczba cytowań (bez autocytowań) = 7

H3. Hanaka A., Plak A., Zagórski P., Ozimek E., Rysiak A., Majewska M., Jaroszuk-Ścisiel J. 2019. Relationships between the properties of Spitsbergen soil, number and biodiversity of rhizosphere microorganisms, and heavy metal concentration in selected plant species. Plant and Soil 436: 49-69.

IF₂₀₁₇ = 3,306; MNiSW = 45 pkt

H4. Hanaka A., Ozimek E., Majewska M., Rysiak A., Jaroszek-Ścisła J. 2019. Physiological diversity of Spitsbergen soil microbial communities suggests their potential as plant growth-promoting bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1207.
IF₂₀₁₇ = 3,687; MNiSW = 30 pkt

H5. Hanaka A., Nowak A., Plak A., Dresler S., Ozimek E., Jaroszek-Ścisła J., Wójcik-Kosior M., Sowa I. 2019. Bacterial isolate inhabiting Spitsbergen soil modifies the physiological response of *Phaseolus coccineus* in control conditions and under exogenous application of methyl jasmonate and copper excess. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1909.
IF₂₀₁₇ = 3,687; MNiSW = 30 pkt

H6. Hanaka A., Lechowski L., Mroczek-Zdyrska M., Strubińska J. 2018. Oxidative enzymes activity during abiotic and biotic stresses in *Zea mays* leaves and roots exposed to Cu, methyl jasmonate and *Trigonotylus caelestialium*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24(1): 1-5.
IF₂₀₁₇ = 1,151; MNiSW = 25 pkt; liczba cytowań (bez autocytowań) = 1

Praca przeglądowa

H7. Hanaka A., Nurzyńska-Wierdak R. 2019. Methyl jasmonate – a multifunctional molecule throughout the plant life. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 18(2): 237-249.
IF₂₀₁₆ = 0,448; MNiSW = 20 pkt

Wszystkie prace, składające się na osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy JCR. Ich sumaryczny Impact Factor zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **18,355**, sumaryczna liczba punktów MNiSW – **210**, a liczba cytowań (bez autocytowań) – 15 (stan na dzień 20.04.2019 r.). We wszystkich wyżej wymienionych publikacjach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Mój wkład w powstanie tych prac wynosi od 65 do 90%, co potwierdzają oświadczenia współautorów (Załącznik nr 5).

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

W niestresowych warunkach środowiska, w chloroplastach, mitochondriach, peroksysomach, błonach plazmatycznych i ścianie komórkowej wytwarzane są reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), m.in. rodniki ponadtlenkowe ($O_2^{\cdot-}$), czy nadtlenek wodoru (H_2O_2), które są ważnymi cząsteczkami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnałów regulujących odpowiedź rośliny na szereg czynników (Demidchik 2015). Czynniki stresowe wywołują stres oksydacyjny przez wytwarzanie zwiększonych ilości ROS. Reaktywne formy tlenu zakłócają pracę szlaków metabolicznych i uszkadzają podstawowe komponenty komórkowe, tj. kwasy nukleinowe, białka, tłuszcze i węglowodany (Demidchik 2015). Pod ich wpływem produkcja metabolitów pierwotnych i wtórnych ulega zaburzeniu. Aby obniżyć nadmierny poziom ROS, rośliny wykształciły wyspecjalizowany mechanizm obronny, który obejmuje enzymatyczny i nieenzymatyczny system antyoksydacyjny. Funkcjonowanie enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego, uznawanego za pierwszą linię obrony, oparte jest na działaniu enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase, SOD) – przekształcająca $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , katalaza (ang. catalase, CAT), peroksydaza askorbinianowa (ang. ascorbate peroxidase, APX) i peroksydaza gwajakolowa (ang. guaiacol peroxidase, GPX) przekształcające H_2O_2 do H_2O . Nieenzymatyczny system antyoksydacyjny, zwany drugą linią obrony, obejmuje związki należące do różnych chemicznie grup. Zaliczane są tu: glutation (ang. glutathione, GSH) i jego homolog – homoglutation (hGSH), aminokwas prolina, antocyjany, niskocząsteczkowe kwasy organiczne (ang. low molecular weight organic acids, LMWOAs), karotenoidy, flawonoidy, związki fenolowe (Tukendorf i in. 1997, Dresler i in. 2014, Berni i in. 2019).

Jasmonian metylu (MJ), czyli ester metylowy kwasu jasmonowego, jest endogennym hormonem roślinnym należącym do rodziny jasmonianów (Dar i in. 2015, Wasternack i Strnad 2016). Jasmonian metylu pełni szereg funkcji we wzroście i rozwoju roślin oraz w ich odpowiedzi w warunkach stresu abiotycznego (Maksymiec i Krupa 2007, Santino i in. 2013, Fugate i in. 2018, Talebi i in. 2018, Wang i in. 2019) i biotycznego (Quintana-Rodriguez i in. 2015, Senthil-Nathan 2019). Jest cząsteczką sygnałową biorącą udział w komunikacji wewnętrznej (w obrębie jednego organizmu) i zewnętrznej (pomiędzy roślinami) (Das i in. 2013). Efekt, jaki wywołuje MJ zależy od wielu czynników, m.in. od gatunku rośliny, jej wieku, stanu fizjologicznego i hormonalnego. Obszerne omówienie możliwości

oddziaływania MJ na fizjologię rośliny, tj. jej podstawowe funkcje życiowe w warunkach niestresowych oraz stresowych zawarte jest w publikacji Hanaka i in. (2019; praca H7).

Miedź, jako niezbędny mikroelement w żywieniu roślin, wpływa na nie korzystnie tylko w wąskim przedziale stężeń. Wyższe stężenia działają toksycznie (Cornu i in. 2017). Zawartość Cu w glebie zależy od rodzaju i właściwości minerałów obecnych w skale macierzystej, procesów tworzenia się gleby oraz aktywności antropogenicznej, przejawiającej się w różnych gałęziach przemysłu, np. rolniczego, wydobywczego czy transportowego. Zazwyczaj zawartość Cu w glebie mieści się w przedziale 13-24 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias 2001), natomiast skażenie w wierzchnich warstwach (0-30 cm) gleby może osiągać kilka tysięcy mg kg⁻¹ (Shutcha i in. 2015). Miedź pochodząca ze źródeł antropogenicznych jest bardziej mobilna, a tym samym bardziej biodostępna niż ta pochodząca ze źródeł pedogenicznych (Duplay i in. 2014).

Rośliny rozwinęły różne strategie tolerancji i odporności na nadmiar Cu, który wywołuje efekt toksyczności. Do tych strategii zaliczyć można wydzielanie kwasów organicznych do gleby w celu ograniczenia biodostępności Cu (Smith 2009), bądź wewnątrzkomórkową detoksykację odbywającą się na drodze wiązania Cu z ligandami i odkładania Cu w przedziałach wewnątrzkomórkowych. Tolerancja roślin na Cu różni się pomiędzy gatunkami, a nawet odmianami tego samego gatunku i może być podwyższona przez interakcję między roślinami, a bakteriami wykazującymi określone właściwości. Taka interakcja roślina-bakteria może mieć zastosowanie w fitoremediacji, np. w fitoekstrakcji (Sessitsch i in. 2013). Rośliny zawierające podwyższone stężenia Cu wprowadzają ten pierwiastek do łańcucha pokarmowego, a jego akumulacja w organizmie człowieka skutkuje uszkodzeniami mózgu, nerek, marskością wątroby czy chroniczną anemią (Dixit i in. 2015). Na podstawie regulacji EC 396/2005 dotyczącej pestycydów, maksymalna dopuszczalna zawartość Cu w produktach spożywczych w krajach Unii Europejskiej wynosi 5-20 mg kg⁻¹ dla większości owoców i warzyw, 20-100 mg kg⁻¹ dla warzyw liściastych, 50 mg kg⁻¹ dla winogron i 10 mg kg⁻¹ dla zbóż (EC 396/2005).

Co więcej, mobilność Cu, podobnie jak innych pierwiastków, zależy od procesów mikrobiologicznych zachodzących w glebie (Gadd 2010). Mikroorganizmy mogą pośredniczyć w immobilizacji (unieruchomieniu) Cu w glebie na drodze biosorpcji, bioakumulacji czy biomineralizacji (Volesky i Holan 1995) lub w mobilizacji Cu w przypadku jej niedoboru (Cornu i in. 2017).

Bakterie należące do grupy bakterii promujących wzrost roślin (ang. plant growth-promoting bacteria, PGPB) mogą poprawiać kondycję rośliny i jej możliwość radzenia sobie

w niesprzyjających warunkach środowiska wykorzystując szereg mechanizmów bezpośrednich i pośrednich (Etesami 2018, Weber i in. 2018). Należą do nich m.in. wiązanie azotu cząsteczkowego, produkcja sideroforów, rozpuszczanie minerałów, synteza enzymów, fitohormonów i ułatwienie pobierania składników odżywczych z gleby (Glick 2014, Majeed i in. 2018). Niektóre bakterie glebowe, należące do bakterii produkujących siderofory (ang. siderophore producing bacteria, SPB), np. *Pseudomonas*, wydzielają cząsteczki organiczne o niskiej masie (150-2000 Da) zwane właśnie sideroforami. Cząsteczki te wykazują się wysokim powinowactwem do jonów Fe(III) i mogą wiązać również inne dwuwartościowe metale przejściowe, przy czym jony Cu wiązane są z największym powinowactwem (Ferret i in. 2015). Podobnie istotna może się okazać umiejętność rozpuszczania przez bakterie minerałów z uwolnieniem biodostępnych form fosforu (Souza i in. 2015). Spośród syntezowanych przez bakterie enzymów, szczególnie istotną rolę odgrywa deaminaza ACC (ACC, ang. aminocyklopropano-1-karboksylan), która powoduje obniżenie poziomu innego hormonu, etylenu (ET) – hamującego wzrost korzeni (Glick 2014). Natomiast spośród fitohormonów produkowanych przez bakterie kluczowy jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), który oddziałuje z ET poprzez aktywację syntazy ACC (Nascimento i in. 2018). Szczególnie interesujące jest poznanie właściwości mikroorganizmów z terenów słabo dostępnych o rygorystycznych warunkach klimatycznych, np. ze Spitsbergenu. Na skutek oddziaływania niskiej temperatury czy lokalnie podwyższonej zawartości Cd, mikroorganizmy spitsbergenowe cechują się ponadprzeciętnymi zdolnościami adaptacyjnymi i plastycznością. Te podwyższone zdolności przystosowawcze mikroorganizmów umożliwiają ich wykorzystanie w fizjologii roślin w celu intensyfikacji wzrostu roślin i ich lepszego radzenia sobie w różnych niekorzystnych warunkach środowiska naturalnego.

Również żerowanie owadów roślinożernych generuje szereg zmian biochemicznych w roślinie, które najczęściej skutkują wydzielaniem substancji odstrasżających lub toksycznych dla szkodnika lub przywabiających jego naturalnych wrogów (Turlings i in. 2012). Zaatakowane rośliny wydzielają również związki lotne (ang. volatile organic compounds, VOC), m.in. MJ, które ostrzegają inne rośliny przed zbliżającym się atakiem szkodnika (Bruce i Pickett 2011, Kim i Felton 2013).

Zatem, ważne nie tylko poznawczo, ale również aplikacyjnie, jest prześledzenie odpowiedzi fizjologicznych roślin modelowych, np. fasoli i kukurydzy, w jak najszerszym kontekście, uwzględniającym aktywność lub poziom różnorodnych cząsteczek w celu znalezienia takich, które będą czułymi markerami zmian dokonujących się w organizmie roślinnym pod wpływem bodźców zewnętrznych.

Cele badań

Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było:

- A. poznanie odpowiedzi fizjologicznej roślin (*Phaseolus coccineus* L., *Zea mays* L.) na abiotyczny czynnik stresowy – nadmiar jonów Cu w środowisku wzrostu w obecności lub braku egzogennej MJ jako modulatora odpowiedzi,
- B. analiza mikrobiomu gleb pozyskanych ze Spitsbergenu, w szczególności izolatów bakteryjnych o potencjalnych zdolnościach stymulacji wzrostu roślin, bądź modulacji odpowiedzi rośliny w warunkach stresu,
- C. zbadanie wpływu wyselekcjonowanego z gleby Spitsbergenu izolatu bakteryjnego na odpowiedź fizjologiczną *Phaseolus coccineus* w warunkach stresu Cu i dodatku egzogennej MJ.
- D. określenie wpływu żerowania owada, *Trigonotylus caelestialium*, na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach *Zea mays* w warunkach stresu Cu i dodatku egzogennej MJ.

Do tej pory, ze względu na poziom skomplikowania układu pomiarowego i późniejszych potencjalnych niejednoznaczności interpretacyjnych, niewiele badań skupiało się na śledzeniu zmian w organizmie roślinnym poddanym wpływowi kilku czynników jednocześnie, które by pełniej oddawały warunki panujące w naturze. Zatem swoje badania rozpoczęłam od śledzenia zmian fizjologicznych dokonujących się w roślinach fasoli pod wpływem nadmiaru Cu w obecności lub bez dodatku MJ (prace **H1**, **H2**). Następnie skupiałam się na przedstawieniu drogi poszukiwania izolatu bakteryjnego z gleb Spitsbergenu. Zaprezentowałam charakterystykę gleb Spitsbergenu, jako siedliska występowania mikroorganizmów przystosowanych do życia w skrajnie niekorzystnych warunkach środowiska (praca **H3**). Przeprowadziłam badania przesiewowe i scharakteryzowałam otrzymane izolaty pod kątem posiadania przez nie cech użytecznych w promocji wzrostu roślin (PGP) (praca **H4**). Zbadałam wpływ wybranego izolatu bakteryjnego na zmiany fizjologiczne zachodzące się w roślinach fasoli pod wpływem lub bez nadmiaru Cu w obecności lub bez dodatku MJ (praca **H5**). Ponadto, przedstawiam wpływ żerowania owada na system antyoksydacyjny roślin kukurydzy w obecności lub nieobecności egzogennej MJ (praca **H6**).

I. Określenie odpowiedzi fizjologicznej *Phaseolus coccineus* na działanie nadmiaru Cu w obecności egzogennie podanego MJ

Kluczowa rola MJ we wszelkich procesach życiowych roślin została jednoznacznie potwierdzona. Biosynteza MJ rozpoczyna się od cząsteczki kwasu α -linolenowego, będącego składnikiem błon komórkowych. Zatem endogenne procesy powstawania tej molekuly zależą od kondycji membran komórkowych. Wiadomo, że aplikacja MJ skutkuje regulacją syntezy metabolitów wtórnych u roślin ważnych dla człowieka z punktu widzenia użyteczności dla przemysłu rolnego i farmaceutycznego. Zakres używanych stężeń MJ jest szeroki i zazwyczaj mieści się w przedziale od 0,1 do 300 μM . Obecność MJ może też sprzyjać syntezie białek związanych z patogenezą (ang. pathogenesis related, PR) i obniżać poziom stresu oksydacyjnego związanego z produkcją ROS poprzez zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Jasmonian metylu reguluje szereg procesów w roślinie na każdym etapie jej wzrostu i rozwoju, począwszy od wpływu na kiełkowanie nasion, poprzez rozwój części nadziemnych i podziemnych rośliny, proces kwitnienia, dojrzewania owoców, po starzenie się rośliny. Bierze udział w kluczowych procesach, np. zamykania się aparatów szparkowych czy transportu azotu.

Ponadto, MJ jest cząsteczką uczestniczącą w odpowiedzi rośliny w warunkach stresu abiotycznego i biotycznego. Niezależnie od pierwotnego źródła stresu abiotycznego, tj. nadmiernego zasolenia, suszy, zbyt niskiej temperatury czy obecności metali ciężkich w środowisku życia rośliny, następnie będzie się pojawiał zarówno stres osmotyczny, jak i oksydacyjny. Zatem różne rodzaje stresów współwystępują ze sobą i często trudno jest postawić między nimi wyraźną granicę, bowiem łączą się podobieństwem objawów, jakie wywołują w roślinie.

Rośliny wytworzyły różne strategie obrony przed zakażeniami patogenami i atakami owadów. Potrafią uruchamiać zróżnicowane szlaki metaboliczne i wytwarzać różne typy substancji sygnałowych i związków obronnych, a przez to redukować niekorzystne efekty działania szkodliwych organizmów. Duży potencjał wydaje się ciągle drzemać w cząsteczce MJ – substancji sygnałowej wytwarzanej w szlaku indukowanej odporności systemicznej (ang. induced systemic resistance, ISR), naturalnym, nieszkodliwym dla człowieka związku chemicznym wykorzystywanym w walce ze szkodnikami szczególnie istotnych gospodarczo upraw. Jasmonian metylu okazuje się również użyteczny w farmakologii, indukując w roślinie wytwarzanie związków cennych w lecznictwie. Ze względu na bezpieczeństwo stosowania, MJ pozostaje cenną cząsteczką o rosnącym potencjale aplikacyjnym.

Stan wiedzy na temat MJ (zebrany w pracy przeglądowej Hanaka i Nurzyńska-Wierdak 2019, praca **H7**) jednoznacznie wskazuje na potencjał tej cząsteczki w modulacji odpowiedzi rośliny w różnych warunkach środowiska. Zatem w przedstawionych poniżej eksperymentach, poza efektem namiaru Cu, zbadano również wpływ egzogennie podanego MJ na rośliny.

Fasola (*Phaseolus coccineus* L.) uprawiana była na pożywce Hoaglanda w kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej. Zastosowano następujące warianty eksperymentalne: kontrolny (nie traktowany Cu); traktowany 50 μM Cu; traktowany 100 μM Cu; a dodatkowo każdy z nich występował w wersji bez MJ lub z dodatkiem 10 μM MJ, zastosowanym do pożywki na 1 godz. lub 24 godz., na początku eksperymentu, po czym pożywkę wymieniano na nową, bez dodatku MJ (Hanaka et al. 2015, praca **H1**).

Preinkubacja siewek z MJ przez 24 godz. wpływała na parametry biometryczne roślin: zwiększała powierzchnię liści, przy jednoczesnym obniżeniu świeżej masy (ang. fresh weight, FW) części nadziemnej. Podanie 50 μM Cu w układzie z MJ pozostawało bez wpływu, a 100 μM Cu albo nie wpływało, albo obniżało wartość powierzchni liści i ich FW. Jasmonian metylu zastosowany w obu czasach preinkubacji redukował długość korzenia głównego przy jednoczesnym wzroście FW korzeni. Obecność Cu nie modyfikowała obu parametrów korzeni.

Jasmonian metylu miał ograniczony wpływ na akumulację Cu w liściach (obniżał stężenie Cu w układzie 1-godz. preinkubacja MJ + 50 μM Cu) i korzeniach (obniżał stężenie Cu w układzie 24-godz. preinkubacja MJ + 100 μM Cu). Wzrost stężenia Cu w pożywce skutkował nasiloną akumulacją Cu w korzeniach, przy niezmienionym poziomie akumulacji w liściach.

Jasmonian metylu nie powodował zmian w zawartości barwników fotosyntetycznych, poza jej obniżeniem w układzie 1-godz. preinkubacja MJ + 100 μM Cu. Tylko w warunkach kontrolnych 24-godz. inkubacja skutkowała podwyższeniem stosunku chlorofilu *a* (Chl *a*) do *b* (Chl *b*) przy jednoczesnym obniżeniu stosunku sumy chlorofilu (Chl *a+b*) do karotenoidów.

Badania parametrów fluorescencji chlorofilu *a* należą do nielicznej grupy nieinwazyjnych metod pomiarowych dokonywanych *in vivo* i stosowanych w ekofizjologii i fizjologii roślin. Parametry fluorescencji chlorofilu *a* pod wpływem samego MJ nie ulegały zmianie w warunkach kontrolnych. Miedź w obu stężeniach powodowała obniżenie maksymalnej wydajności kwantowej fotoukładu II (PSII) (F_v/F_m), a w wyższym – wzrost części zaabsorbowanej energii świetlnej nie zużytej w procesach fotochemicznych (ang. fraction of the absorbed light energy not used for photochemistry, LNU) i wygaszania

niefotochemicznego (ang. non-photochemical quenching, NPQ). Natomiast w obecności Cu i MJ, LNU i NPQ uległy podwyższeniu, z wyjątkiem braku zmiany w układzie z samym 50 μM Cu.

Ustalono, że Cu w stężeniu 50 μM silnie redukowała parametry wzrostu rośliny, tj. powierzchnię liści, długość korzenia głównego, FW części nadziemnej i korzeni (w podobnym nasileniu jak w stężeniu 100 μM). Zależność od zastosowanego stężenia Cu obserwowano też w poziomie akumulacji Cu i zawartości barwników fotosyntetycznych. Badanie parametrów fluorescencji chlorofilu *a* dostarczyło podobnych wniosków, do przedstawionych powyżej. Obniżenie wartości parametru Fv/Fm wskazuje na zaburzenie struktury błon tylakoidów i odwracalną inaktywację PSII. Podwyższenie NPQ w obecności metalu mogło odgrywać znaczącą rolę w ochronie aparatu fotosyntetycznego przed fotouszkodzeniem. Z kolei wzrost wartości LNU w układach zawierających Cu (z wyj. układu zawierającego tylko 50 μM Cu) sugerował niższą efektywność zużywania energii zaabsorbowanej przez kompleks antenowy na potrzeby fotosyntezy.

Preinkubacja 10 μM MJ nie modyfikowała negatywnego wpływu Cu na parametry wzrostu, redukowała akumulację Cu w liściach (1-godz. preinkubacja MJ + 50 μM Cu) oraz w korzeniach (24-godz. preinkubacja MJ + 100 μM Cu), obniżała zawartość barwników fotosyntetycznych (24-godz. preinkubacja MJ + 100 μM Cu) oraz powodowała wzrost wartości LNU i NPQ (w obecności tylko niższego stężenia Cu).

W badaniach przeprowadzonych na fasoli wyraźnie zarysowała się zdolność rośliny do ochrony liści przed niekorzystnym działaniem nadmiaru Cu, gdyż korzenie akumulowały znacznie większą pulę pobranego metalu niż liście, a wzrost stężenia Cu w pożywce powodował wzmożoną akumulację w korzeniach, przy niezmienionym poziomie transportu Cu do liści. Parametry fluorescencji chlorofilu *a* nie wskazywały na znaczące zaburzenia procesu fotosyntezy. Indeks vitalności roślin (ang. vitality index, Rfd) uległ obniżeniu tylko w obecności najwyższego stężenia Cu, co oznaczało, iż w pozostałych przypadkach aparat fotosyntetyczny i cykl Calvina funkcjonowały prawidłowo.

W kolejnym eksperymencie (Hanaka et al. 2016, praca **H2**) zbadano aktywność enzymatycznych i poziom nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych biorących udział w odpowiedzi rośliny na nadmiar Cu po uprzedniej preinkubacji lub bez MJ.

Rośliny fasoli uprawiano na pożywce Hoaglanda w kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej. Zastosowano następujące układy eksperymentalne:

A. doświadczenie krótkoterminowe (5 godz.): kontrola i 50 μM Cu; oba układy były zastosowane w wersji bez preinkubacji MJ lub z 1-godz. preinkubacją 10 μM MJ

B. doświadczenie długoterminowe (5 dni): kontrola i 50 μM Cu; powyższe układy były zastosowane w wersji bez MJ, z 1-godz. preinkubacją 10 μM MJ lub z 24-godz. preinkubacją 10 μM MJ.

Badano aktywność czterech enzymów antyoksydacyjnych w liściach i korzeniach: SOD, CAT, APX i GPX. Aktywność SOD, APX i GPX była wyższa w korzeniach, a CAT w liściach. Z zasady, w liściach i korzeniach roślin pochodzących z doświadczenia krótkoterminowego, przy braku inkubacji z Cu, aktywność SOD i CAT była wyższa niż w doświadczeniu długoterminowym, natomiast w przypadku obu peroksydaz wzrastała w liściach, a malała w korzeniach. W roślinach eksponowanych na 50 μM Cu przez 5 godz., aktywność SOD była wyższa w liściach i korzeniach, CAT – niższa w liściach i wyższa w korzeniach, obu peroksydaz – wyższa w liściach i niższa w korzeniach w porównaniu do roślin eksponowanych na Cu przez 5 dni. Oznacza to bardzo duże zróżnicowanie aktywności enzymatycznej w zależności od zastosowanych wariantów eksperymentalnych, w tym długości ekspozycji roślin na Cu i czasu preinkubacji MJ.

W ramach jednego układu pomiarowego aktywności czterech enzymów różniły się, np. niższej aktywności CAT w korzeniach towarzyszyła wyraźniej zwiększona aktywność obu peroksydaz. Może to wskazywać na to, że enzymy te współpracują w osiągnięciu stanu równowagi w niesprzyjających roślinie warunkach. Znacząco wyższa aktywność obu peroksydaz i częściowo SOD w korzeniach niż w liściach sugeruje, że również w warunkach stresu spowodowanego nadmiarem Cu, enzymy te stanowią pierwszą linię obrony rośliny, jeszcze zanim zdążą się włączyć mechanizmy obronne w liściu.

Zarówno aktywność enzymatyczna, jak i poziom peroksydacji lipidów (mierzony stężeniem malonyldialdehydu, MDA) mogą służyć jako biomarkery toksyczności, czyli odzwierciedlać poziom niekorzystnych zmian w tkance. Np. GPX może katalizować wychwytywanie organicznych nadtlenków, a niska aktywność GPX może wskazywać na aktywację peroksydacji lipidów spowodowaną obecnością Cu, a zatem na uszkodzenie błon komórkowych. Odwrotna zasada również jest słuszna. Można założyć, że u roślin pochodzących z uprawy długoterminowej poddanych działaniu Cu, zwiększona aktywność tego enzymu w korzeniach skutkowałą niższym poziomem peroksydacji lipidów.

Miedź generowała peroksydację lipidów (na drodze reakcji Fentona) bardziej nasiloną w liściach niż w korzeniach, co jest dowodem na różną wrażliwość tych organów na metal. Rośliny eksponowane na Cu przez 5 godz. były bardziej wrażliwe na uszkodzenia błony niż rośliny eksponowane dłużej, co może oznaczać, że wraz z wiekiem rośliny wzrasta jej

tolerancja na toksyczność Cu albo na drodze wychwytywania ROS, albo deponowania Cu w przedziałach wewnątrzkomórkowych.

Wykazałam, że istniała pozytywna korelacja między stężeniami MDA i proliny. W wyniku działania Cu zaobserwowano wzrost stężenia proliny, która może stabilizować syntezę białek i prowadzić detoksykację ROS na drodze nieenzymatycznej. Stwierdzono wyższą zawartość proliny w roślinach eksponowanych na Cu przez 5 godz. niż 5 dni. Jasmonian metylu nie zmieniał poziomu tego aminokwasu. Stężenie antocyjanów malało wraz z czasem ekspozycji na Cu. Niemniej 1-godz. preinkubacja MJ powodowała wzrost zawartości tych barwników w roślinach kontrolnych, jak i traktowanych Cu.

Stężenie hGSH wzrastało w liściach, a malało w korzeniach roślin traktowanych Cu w porównaniu z roślinami nie traktowanymi metalem. Zatem również w przypadku hGSH widoczna stała się różna wrażliwość organów roślinnych na Cu. Co więcej, dłuższa ekspozycja na nadmiar Cu skutkowała obniżeniem poziomu hGSH. Jasmonian metylu nie zmieniał poziomu hGSH.

Nie prowadzono do tej pory badań dotyczących zawartości LMWOA w obecności Cu i MJ. Potwierdziłam akumulację kwasów zależną od organu, gdyż z reguły ich stężenie było wyższe w liściach niż w korzeniach. To sugeruje wyższy poziom stresu w korzeniach. Egzogenny MJ modyfikował zawartość LMWOA po 5-dniowej ekspozycji na Cu, powodował redukcję zawartości winianu i pirogronianu w liściach oraz wzrost stężenia jabłczanu i częściowo winianu w korzeniach. Jabłczan, jako kwas organiczny występujący w największych ilościach, może stanowić pierwszą linię obrony w warunkach niekorzystnych dla rośliny.

Wyżej opisane wyniki zostały przedstawione w pracach:

H7. Hanaka A., Nurzyńska-Wierdak R. 2019. Methyl jasmonate – a multifunctional molecule throughout the plant life. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 18(2): 237-249.

H1. Hanaka A., Maksymiec W., Bednarek W. 2015. The effect of methyl jasmonate on selected physiological parameters of copper-treated *Phaseolus coccineus* plants. *Plant Growth Regulation* 77: 167-177.

H2. Hanaka A., Wójcik M., Dresler S., Mroczek-Zdyrska M., Maksymiec W. 2016. Does methyl jasmonate modify the oxidative stress response in *Phaseolus coccineus* treated with Cu? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124: 480-488.

II. Analiza mikrobiomu gleb pozyskanych ze Spitsbergenu, a szczególnie izolatów bakteryjnych o potencjalnych zdolnościach stymulacji wzrostu roślin, bądź modulacji odpowiedzi rośliny w warunkach stresu

Mimo ekstremalnie niekorzystnych warunków klimatycznych panującym na Spitsbergenie, wiele mikroorganizmów kolonizuje gleby tego obszaru. Mikroorganizmy te należą do grupy organizmów psychrofilnych i psychrotolerancyjnych dobrze radzących sobie w niesprzyjających warunkach środowiskowych, przez co od lat cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców. W dojrzałych glebach, dwa główne czynniki, tj. gatunki roślin i typ gleby, determinują skład mikrobiomu ryzosfery. Natomiast w przypadku słabo wykształconej gleby Spitsbergenu takie determinanty nie zostały do tej pory jasno ustalone. Dla dalszych badań kluczowe było założenie, że mikroorganizmy pochodzące ze Spitsbergenu mają szczególnie wysokie zdolności adaptacyjne i plastyczność, które można wykorzystać w aspekcie ich przystosowania do innych skrajnych warunków środowiskowych.

W pracy Hanaka i in. 2019 (H3) zaprezentowano krótki opis geomorfologiczny obszaru poboru prób roślinnych i glebowych, przedstawiono dane meteorologiczne, dokonano fizyko-chemicznej analizy prób glebowych, przeanalizowano zawartość metali ciężkich w materiale glebowym i roślinnym, zaproponowano wskaźniki oceny zanieczyszczenia w tkance roślinnej i glebie. Dokonano wstępnej analizy próbek gleby pod kątem liczebności i bioróżnorodności mikroorganizmów ją zamieszkujących.

Próbki glebowe charakteryzowały się szerokim zakresem pH H_2O – od kwaśnego (5,1) do zasadowego (8,5), składem granulometrycznym – w zakresie od piasku do piasku gliniastego, stosunkiem C/N – w zakresie 8,62-394,17. Zawartość biodostępnej formy Cu w przeanalizowanych glebach zawierała się w przedziale 0,71-1,80 mg g⁻¹. W oparciu o indeks geoakumulacji (ang. geoaccumulation index, I_{geo}) i współczynnik wzbogacenia (ang. enrichment factor, EF), podwyższone zawartości wskazujące na zanieczyszczenie (nie przekraczające umiarkowanego poziomu zanieczyszczeń) stwierdzono jedynie w kilku próbach glebowych dla Cd.

Niezależnie od właściwości gleby i gatunku rośliny, której gleba ryzosferowa podlegała analizie, liczebność hodowalnych mikroorganizmów była wysoka. Może to świadczyć o (znaczącym pod względem ilościowym) zaangażowaniu tych mikroorganizmów w procesy transformacji składników zawierających C, N i P oraz na dostępność metali ciężkich. Mikroorganizmy glebowe podzielono na trzy grupy, bakterie kopiotroficzne, bakterie oligotroficzne i grzyby, dla każdej grupy podając liczebność, indeks różnorodności ekofizjologicznej (ang. ecophysiological diversity index, EP) oraz indeks rozwoju kolonii

(ang. colony development index, CD). Stwierdzono, że na ogół liczebność oligotrofów jest podobna lub nieco niższa w porównaniu z kopiotrofami. Niska liczebność grzybów przekładała się na niską wartość EP i wysoką CD. Odwrotne zależności stwierdzono dla bakterii. Potwierdzono, że mikroorganizmy zasiedlające skrajnie surowe środowisko Spitsbergenu nie tylko są zaadaptowane do niskich temperatur, często ograniczonych zasobów mineralnych, ale niekiedy występują w dużej ilości w próbach gleb z podwyższoną zawartością toksycznych metali, np. Cd.

W toku dalszych badań dokonano pogłębionej analizy właściwości gleb pozyskanych ze Spitsbergenu w celu wyboru próbek glebowych do pozyskania izolatów bakteryjnych (Hanaka i in. 2019, praca **H4**). Następnym etapem działań było wyselekcjonowanie izolatów i zbadanie ich pod kątem cech wskazujących na właściwości charakterystyczne dla PGPB.

Szczegółowym analizom poddano 17 prób glebowych. Określono liczebność specyficznych bakterii glebowych, tj. bakterii produkujących siderofory, rozpuszczających fosforany, celulolitycznych, amylolitycznych i moczniowych. Wszystkie wymienione typy bakterii zostały rozpoznane, a ich liczebność wskazywała na znaczącą różnorodność między poszczególnymi próbami. Następnie, przy użyciu płytek EcoPlate, zmierzono poziom wykorzystania 31 różnych źródeł węgla przez mikroorganizmy zasiedlające daną próbę glebową. Potencjał metaboliczny i różnorodność kataboliczną tych mikroorganizmów wyznaczono i porównano przy użyciu szeregu wskaźników, tj. indeksu średniej wartości absorbancji dla pojedynczego substratu (AWCD) (ang. average well colour development), indeksu zużycia azotu, indeksu różnorodności Shannona, indeksu wzbogacenia, dominacji, równomierności wykorzystania substratu. Pomiar aktywności dehydrogenazy (DH) glebowej używany jest do wyznaczenia żyzności gleby poprzez liczebność i aktywność mikroorganizmów glebowych i jest skorelowany dodatnio z jakością gleby. W przeprowadzonych badaniach aktywność DH zawierała się w szerokich granicach (0,002 do 0,57 μg formazanu g^{-1} DW). Wyżej wymienione badania pozwoliły na odrzucenie kilku prób glebowych ze względu na niską liczebność bakterii, w tym bakterii specyficznych i/lub obniżone parametry aktywności i bioróżnorodności mikroorganizmów i/lub niską aktywność DH glebowej.

Z pozostałych prób gleby uzyskano 29 izolatów bakteryjnych. Zbadano w nich cechy charakterystyczne dla PGPB: aktywność deaminazy ACC, stężenie IAA w nieobecności i obecności egzogennie podanego tryptofanu i dokonano biochemicznej identyfikacji przy użyciu testu API (ang. analytical profile index). Wykonano również test kiełkowania fasoli, który pozwolił zweryfikować wpływ izolatów na kiełkowanie nasion i długość korzenia oraz

wyznaczyć indeks kiełkowania. Pomimo dużego zróżnicowania izolatów we wcześniejszych analizach biochemicznych, w teście kiełkowania otrzymałam dosyć porównywalne wartości. Zatem znacząca część uzyskanych izolatów może być badana w aspekcie PGP w celu weryfikacji profilu działania na roślinę.

Szczególnie interesujące do dalszych badań ze względu na potencjalne właściwości PGPB wydają się być izolaty należące do rodzaju *Pseudomonas*.

Wyżej opisane wyniki zostały przedstawione w pracach:

H3. Hanaka A., Plak A., Zagórski P., Ozimek E., Rysiak A., Majewska M., Jaroszek-Ścisł J. 2019. Relationships between the properties of Spitsbergen soil, number and biodiversity of rhizosphere microorganisms, and heavy metal concentration in selected plant species. *Plant and Soil* 436: 49-69.

H4. Hanaka A., Ozimek E., Majewska M., Rysiak A., Jaroszek-Ścisł J. 2019. Physiological diversity of Spitsbergen soil microbial communities suggests their potential as plant growth-promoting bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1207.

III. Określenie wpływu wybranego izolatu bakteryjnego z gleby Spitsbergenu na odpowiedź fizjologiczną *Phaseolus coccineus* w warunkach stresu Cu i dodatku egzogennej MJ

Po dokonaniu pogłębionej charakterystyki fenotypowej wybranego do badań na roślinie izolatu (S17) zidentyfikowanego jako *Pseudomonas luteola* przystąpiono do badań na roślinach (Hanaka i in. 2019, praca **H5**). Rośliny fasoli uprawiano na pożywce Hoaglanda w kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej. Zastosowano następujące układy eksperymentalne:

A. uprawa bez inokulacji izolatem bakteryjnym

a. kontrola (brak nadmiaru Cu);

- 1 μ M MJ;
- 10 μ M MJ;

b. 50 μ M Cu;

- 1 μ M MJ + 50 μ M Cu;
- 10 μ M MJ + 50 μ M Cu;

B. uprawa z izolatem bakteryjnym

a. kontrola (brak nadmiaru Cu);

- 1 μ M MJ;
- 10 μ M MJ;

b. 50 μ M Cu do pożywki;

- 1 μ M MJ + 50 μ M Cu;
- 10 μ M MJ + 50 μ M Cu.

Wykazano, że inokulacja izolatem bakteryjnym nie powodowała znaczących zmian w parametrach biometrycznych fasoli, co może oznaczać, że izolat o cechach PGPB przygotowuje roślinę do lepszego znoszenia warunków stresowych w aspekcie zmian

biochemicznych, a nie morfologicznych. Obecność izolatu skutkowała wzmożonym magazynowaniem P i nieco mniejszym Mn w roślinie. Ta właściwość może sugerować zasadność aplikacji tego izolatu do gleb o obniżonej dostępności P dla roślin.

Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w obecności izolatu wykazywały zależność od obecności i stężenia MJ. W wyniku inokulacji aktywność SOD, CAT i GPX znacząco wzrosła chroniąc roślinę przed uszkadzającym działaniem ROS. Szczególnymi indykatorami odporności są amoniakoliza fenyloalaninowa (ang. phenylalanine ammonia-lyase, PAL) i amoniakoliza tyrozynowa (ang. tyrosine ammonia-lyase, TAL). Oba enzymy nawzajem uzupełniały swoją aktywność, a produkty ich działania mogą być prekursorami metablitów wtórnych, np. flawonoidów. Zaobserwowałam również, że aktywność β -glukanazy (GLU), klasycznego białka PR (ang. pathogenesis related), była stymulowana obecnością MJ. W obecności dwóch czynników, izolatu i nadmiaru Cu, potencjał antyoksydacyjny wzrastał zależnie od stężenia MJ.

Inokulacja izolatem bakteryjnym skutkowała głównie obniżeniem zawartości LMWOA, co może być tłumaczone dwojako, albo izolat hamuje syntezę LMWOA, albo zużywa znacząco więcej tych kwasów. W obecności nadmiaru Cu, efekt jaki dawał izolat był niezależny od poziomu MJ.

Mało poznane jest zagadnienie wpływu alantoiny, będącej pochodną puryn, na zmiany odpowiedzi fizjologicznej roślin. Alantoina bezpośrednio i pośrednio wpływa na obniżenie poziomu ROS. Podwyższony poziom tego związku podczas stresu wydaje się być ważny w rozwoju tolerancji rośliny na niekorzystny czynnik. Co więcej, alantoina może być wydzielana przez korzenie stymulując w ten sposób działanie korzystnych dla rośliny mikroorganizmów. Stwierdzono wyższy poziom alantoiny w liściach niż w korzeniach fasoli. Po inokulacji izolatem bakteryjnym zaobserwowałam obniżony poziom tego związku, który podnosił się po zastosowaniu MJ. Zatem MJ, a nie Cu, wydaje się być czynnikiem indukującym wyższy poziom alantoiny.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że izolat bakteryjny modyfikuje odpowiedź fizjologiczną rośliny.

Wyżej opisane wyniki zostały przedstawione w pracy:

H6. Hanaka A., Nowak A., Plak A., Dresler S., Ozimek E., Jaroszuk-Ścisł J., Wójciak-Kosior M., Sowa I. 2019. Bacterial isolate inhabiting Spitsbergen soil modifies the physiological response of *Phaseolus coccineus* in control conditions and under exogenous application of methyl jasmonate and copper excess. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1909.

IV. Określenie wpływu żerowania owada, *Trigonotylus caelestialium*, na aktywność enzymatyczną w roślinach *Zea mays* uprawianych w obecności nadmiaru Cu i preinkubacji z MJ

Rośliny kukurydzy *Zea mays* uprawiano na pożywce Hoaglanda w kontrolowanych warunkach komory wegetacyjnej (Hanaka i in. 2015, praca **H6**).

Zastosowano następujące układy eksperymentalne:

A. w nieobecności owada:

- a) kontrola;
 - b) preinkubacja z 10 μ M MJ przez 24 godz;
 - c) preinkubacja z 10 μ M MJ przez 24 godz. i z dodatkiem 50 μ M Cu;
- B. w obecności owada *Trigonotylus caelestialium* żerującego na liściach:

- a) kontrola,
- b) preinkubacja z 10 μ M MJ przez 24 godz.;
- c) preinkubacja z 10 μ M MJ przez 24 godz. i z dodatkiem 50 μ M Cu.

W liściach oraz korzeniach roślin przeprowadzono pomiary aktywności enzymów antyoksydacyjnych: SOD, CAT, APX i GPX oraz zawartości białka. SOD i CAT przejawiały wyższą aktywność w liściach, a obie peroksydazy – w korzeniach.

Przy braku żerującego owada, pod wpływem działania samego MJ oraz MJ z Cu obserwowano wzrost aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych w liściach w porównaniu z kontrolą. Natomiast w korzeniach wzrastała aktywność wszystkich enzymów tylko w układzie MJ+Cu, a dla samego MJ tylko CAT.

W obecności żerującego owada, w liściach, pod wpływem zarówno działania samego MJ, jak i MJ z Cu, aktywność enzymów zmniejszała się (SOD dla wariantów z MJ i MJ + Cu oraz CAT dla MJ) lub nie ulegała zmianie (pozostałe enzymy i warianty doświadczalne) w porównaniu z układem zawierającym samego żerującego owada. W korzeniach aktywność badanych enzymów była wysoka w obecności żerującego owada zarówno przy zastosowaniu samego MJ, jak i MJ + Cu w porównaniu z innymi układami eksperymentalnymi.

We wszystkich zastosowanych wariantach eksperymentalnych stwierdzono podwyższone stężenie białka w liściach w porównaniu z kontrolą bez owada. Natomiast w korzeniach, podwyższone stężenie białka zanotowano we wszystkich układach z wyjątkiem kontroli z owadem oraz MJ+Cu z owadem, dla których stwierdzono obniżenie stężenia białka w porównaniu z kontrolą bez owada.

Spośród wszystkich zastosowanych układów, traktowanie MJ, a następnie Cu powodowało największe wzrosty aktywności wszystkich enzymów zarówno w liściach bez oddziaływania owada, jak i w liściach i korzeniach w obecności owada.

Wyżej opisane wyniki zostały przedstawione w pracy:

H6. Hanaka A., Lechowski L., Mroczek-Zdyrska M., Strubińska J. 2018. Oxidative enzymes activity during abiotic and biotic stresses in *Zea mays* leaves and roots exposed to Cu, methyl jasmonate and *Trigonotylus caelestialium*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24(1): 1-5.

Część badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym wykonałam w ramach projektu Miniatura 1; 2017/01/X/NZ8/00859, Właściwości wybranych mikroorganizmów psychrotroficznych i ich potencjał w modyfikowaniu odpowiedzi *Phaseolus coccineus* na podwyższony poziom miedzi. Dotyczy to następujących publikacji:

H3. Hanaka A., Plak A., Zagórski P., Ozimek E., Rysiak A., Majewska M., Jaroszuk-Ściśel J. 2019. Relationships between the properties of Spitsbergen soil, number and biodiversity of rhizosphere microorganisms, and heavy metal concentration in selected plant species. *Plant and Soil* 436: 49-69.

H4. Hanaka A., Ozimek E., Majewska M., Rysiak A., Jaroszuk-Ściśel J. 2019. Physiological diversity of Spitsbergen soil microbial communities suggests their potential as plant growth-promoting bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1207.

H5. Hanaka A., Nowak A., Plak A., Dresler S., Ozimek E., Jaroszuk-Ściśel J., Wójciak-Kosior M., Sowa I. 2019. Bacterial isolate inhabiting Spitsbergen soil modifies the physiological response of *Phaseolus coccineus* in control conditions and under exogenous application of methyl jasmonate and copper excess. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1909.

Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

1. Wykazanie, że rośliny fasoli – *Phaseolus coccineus* charakteryzują się dużą tolerancją na wysokie stężenia Cu w środowisku wzrostu. Pod wpływem stosowanych stężeń Cu (50 i 100 μM), stwierdzono wprowadzić zmiany morfologiczne – redukcję świeżej masy, długości korzeni i powierzchni liści, nie wykazano jednak istotnych zaburzeń w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego, mierzonego parametrami fluorescencji chlorofilu *a* oraz poziomem barwników fotosyntetycznych. W odpowiedzi na rosnące stężenia Cu poziom chlorofili i karotenoidów nawet zwiększał się, co przyczyniało się do ochrony aparatu fotosyntetycznego przed uszkodzeniem.

2. Określenie, że wysoki poziom tolerancji na nadmiar Cu wiąże się z wykształceniem przez fasolę strategii unikania translokacji metalu do części naziemnych (excluder strategy) – wzrost stężenia Cu z 50 do 100 μM pozostawał bez wpływu na poziom akumulacji metalu w liściach, przy jednoczesnym wzroście jego akumulacji w korzeniach.

3. Stwierdzenie, że MJ modyfikuje parametry wzrostu fasoli nie poddanej działaniu Cu; 24-godzinna preinkubacja z MJ powodowała wzrost powierzchni liści przy jednoczesnym obniżeniu masy części nadziemnej oraz indukowała redukcję długości korzenia głównego przy jednoczesnym wzroście świeżej masy korzeni (wzrost liczebności korzeni bocznych).
4. Nie dowiedziono istotnej roli MJ w modyfikowaniu procesu fotosyntezy ani poprzez zmianę zawartości barwników fotosyntetycznych, ani parametrów fluorescencji chlorofilu *a*, zarówno w roślinach poddanych stresowi nadmiaru Cu, jak i roślinach kontrolnych. Wskazuje to, że funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego nie podlega bezpośredniej regulacji przez szlaki sygnałowe zależne od MJ.
5. Młodsze rośliny fasoli są bardziej wrażliwe na podwyższone zawartości Cu w środowisku wzrostu niż rośliny starsze, o czym świadczy wzmożona peroksydacja lipidów (marker stresu oksydacyjnego). W odpowiedzi na stres oksydacyjny indukowany nadmiarem Cu w środowisku wzrostu, rośliny fasoli uruchamiają enzymatyczny (wzrost aktywności SOD) i nieenzymatyczny (wzrost akumulacji hGSH, proliny, flawonoidów, fenoli) system obronny. Obecność egzogenego MJ przyczynia się do wzmożonej akumulacji niektórych nieenzymatycznych oksydantów (flawonoidów, fenoli), a także niskocząsteczkowych kwasów organicznych (winowego, jabłkowego). Zwiększa to odporność rośliny na toksyczność Cu poprzez redukowanie toksycznych rodników tlenowych (antyoksydanty) oraz prawdopodobnie chelatowanie wolnych jonów Cu w komórce (kwasy organiczne), co chroni aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniem przez nadmiar Cu. Jasmonian metylu może pośredniczyć w regulacji szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych, takich jak flawonoidy, inne związki fenolowe czy kwasy organiczne.
6. Żerowanie owada *Trigonotylus caelestialium* na liściach roślin kukurydzy wywołuje stres oksydacyjny powodując wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Zastosowanie egzogenego MJ i MJ z Cu obniża aktywność enzymatyczną w liściach, wzmagając ją w korzeniach. Wydaje się, że MJ, poprzez obniżenie poziomu ROS, uczestniczy w ochronie liści, a tym samym aparatu fotosyntetycznego przed uszkodzeniem oksydacyjnym, przygotowując korzenie do przejęcia roli w obronności rośliny. MJ uczestniczy w regulacji odpowiedzi rośliny na atak owada.

7. Wykazanie, że gleby Spitsbergenu charakteryzują się zasobnością w mikroorganizmy przystosowane do skrajnych warunków środowiska i stanowią dobre źródło bakterii, które mają duży potencjał do stymulowania wzrostu roślin (ang. plant growth promoting bacteria) – bakterii o wysokiej aktywności deaminazy ACC, zdolności produkcji IAA i sideroforów. Analizowane przeze mnie izolaty bakterii dobrze rosną w temperaturze 20°C, co oznacza, że mogą mieć zastosowanie w prowadzeniu upraw roślinnych również w warunkach klimatu umiarkowanego.

8. Inokulacja roślin fasoli izolatem bakteryjnym, zakwalifikowanym do gatunku *Pseudomonas*, powoduje wzmożoną akumulację P w korzeniach roślin, co wskazuje na użyteczność tego izolatu w stosowaniu do gleb o obniżonej dostępności P. Inokulacja tym izolatem nie stymuluje wprawdzie wzrostu roślin (nie stwierdzono zwiększenia parametrów wzrostu korzeni ani części nadziemnych), ale pozytywnie wpływa na procesy biochemiczne w roślinie (wzrasta stężenie niskocząsteczkowych kwasów organicznych, które mogą uczestniczyć m.in. w utrzymaniu homeostazy jonów metali czy homeostazy redoks w komórce, a także stężenie alantoiny - źródła N), co może wskazywać na jego potencjał w zwiększaniu odporności rośliny w niekorzystnych warunkach środowiska. Izolat bakteryjny może pełnić rolę ochronną w stresie wywołanym nadmiarem Cu, na co wskazuje wzrost parametrów enzymatycznych (aktywności enzymów antyoksydacyjnych) i nieenzymatycznych (akumulacja kwasów organicznych) u fasoli.

Literatura

1. Berni R., Luyckx M., Xu X., Legay S., Sergeant K., Hausman J-F., Lutts S., Cai G., Guerriero G. 2019. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environ. Exp. Bot.*, 161: 98–106.
2. Bruce T.J.A., Pickett J.A. 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – finding the right mix. *Phytochemistry*, 72: 1605–1611.
3. Cornu J.Y., Huguenot D., Jézéquel K., Lollier M., Lebeau T. 2017. Bioremediation of copper contaminated soils by bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33(2): 26.
4. Dar T.A., Uddin M., Khan M.M.A., Hakeem K.R., Jaleel H. 2015. Jasmonates counter plant stress: a review. *Environ. Exp. Bot.*, 115: 49–57.
5. Das A., Lee S.H., Hyun T.K., Kim S.W., Kim J.Y. 2013. Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnol. Rep.*, 7(1): 9–26.
6. Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.*, 109: 212–228.
7. Dixit R., Wasiullah, Malaviya D., Pandiyan K., Singh U.B., Sahu A., Shukla R., Singh B.P., Rai J.P., Sharma P.K., Lade H., Paul D. 2015. Bioremediation of heavy metals

- from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7: 2189–2212.
8. Dresler S., Hanaka A., Bednarek W., Maksymiec W. 2014. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiol. Plant.*, 36: 1565–1575.
 9. Duplay J., Semhi K., Errais E., Imfeld G., Babcsanyi I., Perrone T. 2014. Copper, zinc, lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): The impact of cultural practices. *Geoderma*, 230–231: 318–328.
 10. Etesami H. 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues. Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 147: 175–191.
 11. Ferret C., Cornu J.Y., Elhabiri M., Sterckeman T., Braud A., Jézéquel K., Lollier M., Lebeau T., Schalk I.J., Geoffroy V.A. 2015. Effect of pyoverdine supply on cadmium and nickel complexation and phytoavailability in hydroponics. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22: 2106–2116.
 12. Fugate K.K., Lafta A.M., Eide J.D., Li G., Lulai E.C., Olson L.L., Deckard E.L., Khan M.F.R., Finger F.L. 2018. Methyl jasmonate alleviates drought stress in young sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *J. Agro. Crop Sci.*, 204: 566–576.
 13. Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156: 609–643.
 14. Glick B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.*, 169: 30–39.
 15. Kabata-Pendias A. 2001. Trace elements in Soils and plants, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton.
 16. Kim J., Felton G.W. 2013. Priming of antiherbivore defensive responses in plants. *Insect Sci.*, 20: 273–285.
 17. Majeed A., Muhammad Z., Ahmad H. 2018. Plant growth promoting bacteria, role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant Cell Rep.*, 37: 1599–1609.
 18. Maksymiec W., Krupa Z. 2007. Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. *Biol. Plant.*, 51(2): 322–326.
 19. Nascimento F.X., Rossi M.J., Glick B.R. 2018. Ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant-bacterial interactions. *Front. Plant Sci.*, 9: 114.
 20. Quintana-Rodriguez E., Morales-Vargas A.T., Molina-Torres J., Adame-Alvarez R.M., Jorge A., Acosta-Gallegos J.A., Heil M. 2015. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Ecol.*, 103: 250–260.
 21. Santino A., Taurino M., De Domenico S., Bonsegna S., Poltronieri P., Pastor V., Flors V. 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant Cell Rep.*, 32(7): 1085–1098.
 22. Senthil-Nathan S. 2019. Effect of methyl jasmonate (MeJA) induced defenses in rice against the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Manag. Sci.*, 75: 460–465.
 23. Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K., Puschenreiter M. 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 60: 182–194.
 24. Shutcha M.N., Faucon M.P., Kissi C.K., Colinet G., Mahy G., Luhembwe M.N., Visser M., Meerts P. 2015. Three years of phytostabilisation experiment of bare acidic soil

- extremely contaminated by copper smelting using plant biodiversity of metal-rich soils in tropical Africa (Katanga, DR Congo). *Ecol. Eng.*, 82: 81–90.
25. Smith S.R. 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ. Int.*, 35: 142–156.
 26. Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.*, 38: 401–419.
 27. Talebi M., Moghaddam M., Pirbalouti A.G. 2018. Methyl jasmonate effects on volatile oil compounds and antioxidant activity of leaf extract of two basil cultivars under salinity stress. *Acta Physiol. Plant.*, 40: 34.
 28. Tukendorf A., Skórzyńska-Polit E., Baszyński T. 1997. Homophytochelatin accumulation in Cd-treated runner bean plants is related to their growth stage. *Plant Sci.*, 129: 21–28.
 29. Turlings T.C.J., Hiltbold I., Rasman S. 2012. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant Soil*, 358: 51–60.
 30. Wang Y., Gao L., Wang Q., Zuo J. 2019. Low temperature conditioning combined with methyl jasmonate can reduce chilling injury in bell pepper. *Sci. Hortic.*, 243: 434–439.
 31. Wasternack C., Strnad M. 2016. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *N. Biotechnol.*, 33(5): 604–613.
 32. Weber N.F., Herrmann I., Hochholdinger F., Ludewig U., Neumann G. 2018. PDPR-induced growth stimulation and nutrient acquisition in maize, do root hairs matter? *Sci. Agric. Biochem.*, 49: 164–172.
 33. Volesky B., Holan Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.*, 11: 235–250.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Celem **pracy magisterskiej** było określenie wpływu jonów magnezu na zmiany potencjału membranowego *Conocephalum conicum* wywołane bodźcami elektrycznymi i świetlnymi. Przy użyciu mikroelektrod zewnętrznych i zastosowaniu dwóch różnych bodźców, elektrycznego i świetlnego, rejestrowałam potencjały spoczynkowe i czynnościowe, wyznaczałam próg pobudliwości, latencję, amplitudę, połówkowy czas trwania, hiperpolaryzację następczą potencjałów czynnościowych i tę w odpowiedzi na zgaszenie światła. Wysunęłam następujące najważniejsze konkluzje: 1) odpowiedzi *C. conicum* w obecności Mg^{2+} są niezależne od charakteru bodźca (elektryczny czy świetlny); 2) pobudliwość *C. conicum* jest niezależna od zastosowanej soli magnezowej ($MgSO_4$, czy $MgCl_2$); 3) jony Mg^{2+} dają odmienny kształt potencjałów czynnościowych dla bodźców elektrycznych i świetlnych; 4) wraz z podniesieniem stężenia jonów Mg^{2+} do 10 mM otrzymałam jednoznaczne wyniki wskazujące na podwyższenie progu pobudliwości, czyli obniżenie pobudliwości wątrobowca. Niższe stężenia jonów Mg^{2+} nie dawały tak jednoznacznych odpowiedzi.

W trakcie studiów doktoranckich, w ramach wykonywanej **pracy doktorskiej**, prowadziłam badania nad charakterystyką aktywności elektrofizjologicznej błony tonoplastu wątrobowca *Conocephalum conicum*. Dokonałam pomiarów z zastosowaniem techniki mikroelektrodowej w wariacie patch-clamp. Celem pracy było wyodrębnienie dwóch rodzajów kanałów jonowych zależnych od napięcia, czyli regulowanych przez potencjał błonowy – kanałów anionowych i wolno aktywujących się kanałów kationowych SV (ang. slowly activating vacuolar channels) oraz określenie zasad ich funkcjonowania i regulacji w warunkach kontrolnych i po podaniu określonych związków chemicznych. Zatem główne pytania badawcze były związane z wpływem poziomu stężenia jonów Mg^{2+} oraz innych kationów na aktywność kanałów jonowych, z wpływem anionów oraz inhibitorów na przewodnictwo kanałów oraz z wpływem kationów nieprzepuszczalnych na aktywność kanałów jonowych. Aby uzyskać odpowiedzi na postawione pytania, w pierwszym etapie ustaliłam odpowiedni skład roztworów, warunkujący pojawienie się kanałów określonego rodzaju. Następnie badałam różne związki chemiczne pod kątem ich potencjalnego wpływu na aktywność kanałów jonowych. Określiłam wielkości prądów płynących przez pojedyncze kanały w konfiguracjach vacuole-attached i outside-out oraz prądów makroskopowych w konfiguracji whole-vacuole. Wyznaczyłam krzywe prądowo-napięciowe, przewodnictwo jednostkowe, selektywność i gęstość kanałów oraz potencjały rewersji dla określonych jonów.

Najistotniejszymi wynikami były: 1) wykazanie obecności kanałów anionowych i wolno aktywujących się kanałów SV w tonoplaście wątrobowca *C. conicum*; 2) wykazanie, że kationy dwuwartościowe Mg^{2+} , Ba^{2+} i Sr^{2+} , przy niskim stężeniu komórkowego Ca^{2+} lub jego braku, aktywują prądy przy ujemnych potencjałach, czyli kanały anionowe, a blokują aktywność kanałów SV; 3) wykazanie przepuszczalności kanału anionowego dla anionów Cl^- , NO_3^- i SO_4^{2-} ; 4) wykazanie blokowania kanału anionowego przez blokery kanałów jonowych, tj. kwas antraceno-9-karboksylowy (A9C), kwas etakrynowy (ETA) i kwas 4,40-diizotycyjanatostilbeno-2,20-disulfonowy (DIDS); 5) wykazanie, że kanał SV, oprócz znaczącej przepuszczalności dla K^+ , jest również przepuszczalny dla kationów dwuwartościowych, tj. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} i Sr^{2+} , a nie jest przepuszczalny dla anionów takich jak Cl^- , NO_3^- i SO_4^{2-} i jabłczanowy.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 4 streszczenia konferencyjne zgłoszone na konferencje krajowe i zagraniczne. Badania dotyczące kanałów jonowych wykonane w ramach pracy doktorskiej, stanowiły kluczową część pracy:

Trębacz K., Schönknecht G., Dziubińska H., **Hanaka A.** (2007) Characteristics of anion channels in the tonoplast of the liverwort *Conocephalum conicum*. Plant and Cell Physiology 48(12): 1747-1757.

b) Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

W 2009 r. podjęłam pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W głównej mierze zajęłam się badaniem fizjologicznych i biochemicznych odpowiedzi roślin na stres wywołany nadmiarem metali takich jak Cu, Cd i Pb. Badania prowadziłam na roślinach dwuliściennych, tj. fasoli, słoneczniku, bobie, rukoli i ogórku oraz na jednoliściennych, tj. kukurydzy i pszenicy.

W swoich badaniach, nie wchodzących w zakres badań składających się na moje osiągnięcie naukowe, uwzględniłam suplementację roślin egzogenne podawanymi związkami krzemu, selenu oraz alantoiną.

Główne nurty badawcze obejmowały następujące zagadnienia:

1. Wpływ typu systemu korzeniowego na poziom stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością ołowiu u słonecznika

Badano rośliny słonecznika, *Helianthus annuus* L. o dwóch różnych systemach korzeniowych, z zachowanym pierwotnym systemem korzeniowym oraz z systemem korzeni przybyszowych wyrastającym (z tkanek łodygi) po odcięciu pierwotnego systemu korzeniowego. Rośliny uprawiano hydroponicznie w warunkach kontrolnych lub w obecności czterech stężeń Pb (0,5; 2,5; 5 i 20 mg dm⁻³). Świeża masa i długość korzeni przybyszowych po zastosowaniu różnych stężeń Pb była większa w porównaniu z pierwotnym systemem korzeniowym. Akumulacja Pb zarówno w częściach nadziemnych, jak i korzeniach przybyszowych była istotnie statystycznie niższa niż w tkankach roślin z pierwotnym systemem korzeniowym. Towarzyszyła temu z reguły obniżona zawartość malonylodialdehydu (MDA), a podwyższona aktywność SOD w częściach nadziemnych i podziemnych. Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P2:

P2. Strubińska J. i **Hanaka A.** (2011) Adventitious root system reduces lead uptake and oxidative stress in sunflower seedlings. *Biologia Plantarum* 55(4): 771-774 – IF₂₀₁₁ = 1,974; MNiSW = 25 pkt

2. Wpływ wieku liścia na odpowiedź kukurydzy na obecność kadmu lub nadmiar miedzi

Badania prowadzono na liściach kukurydzy, *Zea mays* L. dzieląc je na trzy części: najmłodszą, dojrzałą i najstarszą. Pod wpływem 100 μM Cd lub 50 μM Cu zaobserwowano podwyższoną akumulację niskocząsteczkowych kwasów organicznych w dojrzałych i najstarszych fragmentach liści. Oba metale generowały wzrost stężenia kwasu jabłkowego, ale jednocześnie różnicowały zawartość innych kwasów, np. w obecności Cd rósł poziom kwasu cytrynowego, a w obecności Cu – kwasu bursztynowego i pirogronowego. Podobnie, stężenie chlorofilu, karotenoidów i MDA rosło wraz z wiekiem liścia.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P6:

P6. Dresler S., **Hanaka A.**, Bednarek W., Maksymiec W. (2014) Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1565-1575 – IF₂₀₁₄ = 1,584; MNiSW = 25 pkt

3. Wpływ suplementacji krzemem na poziom stresu wywołanego kadmem u kukurydzy

Badano możliwość detoksykacji Cd (50 μM) przez dodanie jonów Si (0; 0,1; 0,5; 1,5; 3,0 i 5,0 mM) do środowiska wzrostu kukurydzy, *Zea mays* L. Krzem nie poprawiał odporności rośliny na stres spowodowany Cd. Dowiedziono, że wraz ze wzrostem stężenia Si w pożywce maleje akumulacja Cd i fitochelatyn w korzeniach.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P7:

P7. Dresler S., Wójcik M., Bednarek W., **Hanaka A.**, Tukiendorf A. (2015) The effect of silicon on maize growth under cadmium stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 62(1): 1-7 – IF₂₀₁₅ = 0,946; MNiSW = 20 pkt

4. Wpływ suplementacji selenem na poziom stresu wywołanego ołowiem u bobu

Badania prowadzone były na bobie, *Vicia faba* Mill., który w warunkach deficytu fosforu poddany był działaniu 50 μM Pb. Wykazano, że Se w stężeniu 1,5 μM redukował toksyczność Pb poprzez redukcję poziomu MDA, ROS oraz obniżenie aktywności CAT i peroksydaz: gwajakolowej i glutationowej.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P9:

P9. Mroczek-Zdyrska M., Strubińska J., **Hanaka A.** (2017) Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in shoots of lead-exposed *Vicia faba* L. minor plants grown under phosphorus-deficient conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 36(1): 186-199 – IF₂₀₁₇ = 2,047; MNiSW = 30 pkt

5. Wpływ suplementacji alantoiną na poziom stresu wywołanego kadmem u ogórka

Badania prowadzone na ogórku, *Cucumis sativus* L. pozwoliły na stwierdzenie, że toksyczny wpływ Cd może być niwelowany przez egzogennie dodawaną do pożywki alantoinę. Wykazano, że alantoina znosiła inhibujący wpływ Cd na wzrost roślin i zawartość barwników fotosyntetycznych. Wzrost stężenia alantoiny obniżał zawartość H₂O₂. Alantoina w stresie Cd wyraźnie podnosiła zawartość glutationu i kwasu askorbinowego w częściach nadziemnych.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P12:

P12. Dresler S., Hawrylak-Nowak B., Kováčik J., Pochwatka M., **Hanaka A.**, Strzemiński M., Sowa I., Wójciak-Kosior M. (2019) Allantoin attenuates cadmium-induced toxicity in cucumber plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170: 120–126 – IF₂₀₁₇ = 3,974; MNiSW = 30 pkt

Uczestniczyłam również w badaniach, które dotyczyły tematyki rolniczej. Poniżej przedstawiono główne zagadnienia realizowanych badań:

6. Wpływ warunków uprawy na plonowanie i jakość roślin

Badania dotyczyły optymalizacji zapotrzebowania na składniki odżywcze rukoli siewnej, *Eruca sativa* L. poprzez stosowanie nawożenia mineralnego N i K w różnych dawkach (0,3 i 0,6 g N dm⁻³; 0,3; 0,6 i 0,9 g K dm⁻³ w formie siarczanu i chlorku). Badano wybrane parametry biochemiczne i fizjologiczne, łącznie z parametrami fluorescencji chlorofilu *a*. Lepsze warunki żywieniowe były zapewnione roślinom w warunkach nawożenia wyższą dawką azotu i siarczanową formą potasu.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P8:

P8. **Hanaka A.**, Dresler, S., Nurzyńska-Wierdak R. (2016) Biochemical and physiological responses of *Eruca sativa* Mill. to selected nutrient conditions. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 15(4): 147-160 – IF₂₀₁₆ = 0,523; MNiSW = 20 pkt

7. Ocena wpływu czynników agrotechnicznych i środowiskowych na wybrane właściwości fizyko-chemiczne gleby

Badania skupiały się na ocenie jakości gleb uprawnych Lubelszczyzny poddanych zabiegom nawożenia organicznego i mineralnego NPK. Badano wybrane właściwości fizyko-chemiczne i chemiczne oraz właściwości sorpcyjne gleby. Stosowanie nawożenia powodowało podwyższenie zawartości biodostępnych form K i Mg.

Badania środowiskowe po klęsce powodzi w 2010 r. skupiały się na ocenie fizykochemicznych właściwości gleb pochodzących z plantacji ogrodniczych. Przeprowadzone analizy nie wykazały pogorszenia badanych parametrów.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacjach P3, P4, P5:

P3. Bednarek W., Dresler S., Tkaczyk P., **Hanaka A.** (2012) Available forms of nutrients in soil fertilized with liquid manure and NPK. *Journal of Elementology* 17(2): 169-180 – IF₂₀₁₂ = 0,281; MNiSW = 15 pkt

P4. Bednarek W., Dresler S., Tkaczyk P., **Hanaka A.** (2012) Influence of liquid manure and NPK on selected sorption properties of soil. *Journal of Elementology* 17(4): 547-557 – IF₂₀₁₂ = 0,281; MNiSW = 15 pkt

P5. Bednarek W., Dresler S., Tkaczyk P., **Hanaka A.** (2014) Physicochemical properties of surface soil layer after the flood in the middle Vistula River valley. *Journal of Elementology* 19(1): 17-29 – IF₂₀₁₄ = 0,779; MNiSW = 15 pkt

W ostatnich latach uczestniczyłam również w badaniach gleb, zarówno miejskich, jak i pochodzących ze Spitsbergenu. Dotyczyły one dwóch głównych zagadnień:

8. Porównanie zawartości metali ciężkich w glebach o różnym stopniu ekranowania

W badaniach gleb miejskich w różnym stopniu uszczelnienia (ekranowania) zastosowano kilka wskaźników, tj. indeks geoakumulacji, współczynnik wzbogacenia i zintegrowany ładunek zanieczyszczeń w celu porównania zawartości metali ciężkich i ładunku antropogenicznego tych zanieczyszczeń. Wykazano, że ekranowanie w obszarze miejskim w niewielkim stopniu wpływa na zawartość metali ciężkich.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P10:

P10. Charzyński P., Plak A., **Hanaka A.** (2017) Influence of the soil sealing on the geoaccumulation index of heavy metals and various pollution factors. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 4801-4811 – IF₂₀₁₇ = 2,800; MNiSW = 30 pkt

9. Promocja wzrostu roślin przez szczepy grzybowe wyizolowany z gleb Spitsbergenu

Dwa izolaty grzybowe pochodzące z gleb Spitsbergenu zidentyfikowane genetycznie jako *Mortierella verticillata* and *M. antarctica* były badane pod kątem syntezy hormonów, tj. IAA i kwasu giberelinowego (GA). Oba szczepy aplikowano na nasiona pszenicy ozimej, *Triticum aestivum* L. i potwierdzono ich potencjał jako składników bionawozów poprawiających wzrost roślin (siewek) w warunkach klimatu umiarkowanego.

Wyniki opisanych wyżej badań zostały przedstawione w publikacji P11:

P11. Ozimek E., Jaroszuk-Ściśel J., Bohacz J., Kornilłowicz-Kowalska T., Tyśkiewicz R., Słomka A., Nowak A., **Hanaka A.** (2018) Synthesis of indoleacetic acid, gibberellic acid and ACC-deaminase by *Mortierella* strains promote winter wheat seedlings growth under different conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 3218 – IF₂₀₁₇ = 3,687; MNiSW = 30 pkt

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości planuję kontynuować badania nad aplikacją izolatów bakteryjnych z gleb Spitsbergenu na rośliny rosnące w umiarkowanym klimacie Polski. Pozwoli mi to na zbadanie ich właściwości w kontekście ich potencjału w promocji wzrostu roślin oraz wpływu na modulowanie poziomu stresu biotycznego, bądź abiotycznego u roślin. Planuję dokonać szczegółowych oznaczeń genetycznych wybranych izolatów charakteryzujących się potencjalnie najbardziej poszukiwanymi cechami wśród PGPB. Zamierzam dokonać prób ich łączenia w konsorcja również ze znanymi grzybami pochodzącymi z gleb Spitsbergenu, np. *Mortirella*, w celu uzyskania szczepionek doglebowych, które mogłyby stymulować wzrost roślin, szczególnie w pierwszym, najtrudniejszym dla nich etapie wzrostu. Szczepionki takie mają bezpośrednie zastosowanie aplikacyjne, gdyż są przydatne w rolnictwie jako preparaty wpływające na zwiększenie plonów lub odporność roślin w niekorzystnych warunkach środowiska.

Moje doświadczenie w analizie bakterii glebowych zamierzam również wykorzystać w badaniach roślin zasiedlających hałdy metalonośne na Górnym Śląsku. Poprzez porównanie mikrobiomu ekotypów/populacji roślin hałdowych i ekotypów/populacji tych samych gatunków występujących na terenach niezanieczyszczonych metalami, być może uda się dokładniej zrozumieć mechanizmy adaptacji roślin hałdowych do wzrostu w środowiskach skażonych metalami i wytłumaczyć ich zwiększoną tolerancję na metale. Badania te poszerzą i ubogą tematyką badawczą prowadzoną od wielu lat w Zakładzie Fizjologii Roślin UMCS, dotyczącą fizjologicznych i biochemicznych mechanizmów adaptacji roślin do środowisk zanieczyszczonych metalami.

Ponadto, planuję kontynuować badania nad rolą cząsteczek sygnałowych w tolerancji roślin do abiotycznych (nadmiar metali) i biotycznych czynników stresowych. W najbliższej przyszłości planuję przeprowadzić analizy poziomu endogennych cząsteczek sygnałowych (kwasu jasmonowego, MJ, kwasu salicylowego, kwasu abscysynowego) w tkankach roślinnych. Te cząsteczki sygnałowe funkcjonują w oddzielnych szlakach sygnałowych, niemniej jednak w znaczącym stopniu łączą się i oddziałują ze sobą. Pogłębienie wiedzy na temat tych zależności pozwoli na lepsze zrozumienie skomplikowanych procesów zachodzących w roślinach.

Podsumowanie aktywności naukowej

Dane bibliometryczne	Liczba publikacji	IF ^a	Punkty MNiSW ^a
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	7	18,355	210
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego):			
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	1	3,654	24
B) po uzyskaniu stopnia doktora	11	18,787	260
Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie JCR:			
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	0		
B) po uzyskaniu stopnia doktora	4		40
Liczba streszczeń naukowych (wraz z referatami) prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:			
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	4		
B) po uzyskaniu stopnia doktora	61		
Łączna liczba publikacji	23	40,796	534
Ocena bibliometryczna			
Całkowita liczba cytowań wg Web of Science ^b			122
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg bazy Web of Science ^b			117
Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science)			7

^a – zgodnie z rokiem opublikowania^b – w dniu 20.04.2019 r.

Agnieszka Hanaka