

**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury

Krajobrazu

**Samodzielny Zakład Przyrodniczych Podstaw
Ogrodnictwa**

Dr MARZENA WIŃSKA-KRYSIK

AUTOREFERAT

Warszawa 2015

I. Imię i Nazwisko

Marzena Wińska-Krysiak

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- Magister inżynier rolnictwa, specjalność - biotechnologia roślin, Wydział Rolniczy, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego (obecnie Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie), 1996.
Tytuł pracy magisterskiej: „Zmiany w zawartości ABA w rozwijających się ziarniakach pszenżyta jarego (*X Triticosecale* Wittmack) odmiany Gabo”, promotor dr Mieczysław Włodkowski (Katedra Fizjologii Roślin).
- Doktor nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego (obecnie Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie), 2000.
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena na poziomie molekularnym reakcji na stres ołowiem wybranych genotypów roślin z rodziny *Brassicaceae*”, promotor prof. dr hab. Stanisław Waldemar Gawroński (Katedra Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, SGGW).

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

- **Od 2013 - do chwili obecnej:** kierownik w Samodzielnym Zakładzie Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
- **Od 2007:** adiunkt w Samodzielnym Zakładzie Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
- **2000-2006:** adiunkt w Katedrze Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
- **1996-2000:** stacjonarne studia doktoranckie, Katedra Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa (od 1997r. Samodzielny Zakład Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa), Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

IV. 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:

Wińska-Krysiak M. 2013. Wybrane aspekty transportu i akumulacji wapnia oraz aktywności lipoksygenazy u jabłoni odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’. Wyd. Wieś Jutra, Warszawa, 129 ss, ISBN: 978-83-62815-14-2 - dzieło opublikowane w całości.

Recenzenci:

Prof. dr hab. Małgorzata Korbin, Research Institute of Horticulture in Skierniewice

Prof. dr hab. Kazimierz Tomala, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

b) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WSTĘP I CEL BADAŃ

Wszechstronny postęp, jaki dokonał się zarówno w polskim sadownictwie od połowy XX wieku, obejmujący agrotechnikę, zagadnienia przechowalnictwa, a także prace hodowlane nad nowymi odmianami, wprowadził Polskę do grona trzech największych producentów jabłek na świecie po Chinach i USA z ilością 2 493 078 ton [FAO 2012, <http://faostat.fao.org>]. Wymogi rynkowe sprawiają, że owoce są dostępne w sprzedaży przez cały rok, a ich cechy muszą spełniać wymagania konsumentów preferujących przede wszystkim smakowość, jędrność i soczystość jabłek. W odpowiedzi na oczekiwania konsumentów, obecnie nawet niewielkie gospodarstwa sadownicze dysponują chłodniami do przechowywania owoców, a w dużych gospodarstwach i grupach producenckich powszechnie są chłodnie KA i ULO. Przydatność jabłek do długiego przechowywania zależy od ich składu chemicznego (zwłaszcza zawartości wapnia), na który wpływa wiele czynników. Już w 1936 roku de Long wysunął hipotezę, że występowanie gorzkiej plamistości podskórnej (GPP- bardzo ważnej choroby fizjologicznej) związane jest z niedoborem wapnia w owocach [Sadowski i in. 1967, Ferguson i Watkins 1992, White i Broadley 2003]. Zawartość wapnia w owocach zależy m.in. od odmiany. Do odmian podatnych na GPP należą m.in.: ‘Jonagold’, ‘Šampion’, ‘Ligol’, ‘Mutsu’, natomiast do odmian niepodatnych zaliczane są: ‘Gala’, ‘Idared’, ‘Gloster’. W 2012 roku wśród wyprodukowanych w polskich szkółkach drzewek jabłoni udział odmian, których owoce są podatne na GPP wynosił około 45%. W 2012 roku najwięcej wyprodukowano drzew odmian i ich sportów: ‘Šampion’ (21%), następnie ‘Idared’ (18%), ‘Jonagold’ (14%), ‘Gala’ (9%).

Ważnym czynnikiem wpływającym na zawartość wapnia w jabłkach jest wysokość plonowania drzew oraz rozmiary owoców [Sadowski i in. 1965, Ferguson i Watkins 1992, Szot 2010].

Przyjmuje się, że na wielkość plonu nowoczesnych odmian ma wpływ przede wszystkim intensywność fotosyntezy, której przebieg jest warunkowany szeregiem czynników wewnętrznych tj.: sprawność aparatu asymilacyjnego (intensywność fotosyntezy, zawartość chlorofilu, fluorescencja chlorofilu *a*), eksport asymilatów oraz zewnętrznych tj.: światło, temperatura powietrza, stężenie CO₂ wokół drzew, zasoby wody oraz związków mineralnych w glebie i atmosferze. Wapń jest kluczowym makroelementem wpływającym na stabilność struktur i funkcje chloroplastów i mitochondriów, tak więc jego właściwy poziom w roślinie warunkuje, pośrednio i bezpośrednio, efektywne wykorzystanie światła, CO₂, wody, składników pokarmowych [Terry i Huston 1975]. Jony Ca²⁺ pełnią ważną rolę w fotosystemie II (PSII), który odpowiada za adaptację do różnych warunków stresowych [Chen i in. 2007]. Przy niedostatecznym zaopatrzeniu roślin w wapń może dochodzić do większych strat energii i obniżenia wydajności fotochemicznej PSII. Wapń pobudza transport elektronów oraz bierze udział w fotosyntetycznej oksydacji wody [Hosann 2002].

Zawartość wapnia w roślinach zależy od stężenia składników mineralnych (w tym Ca) w glebie oraz wzajemnych ich proporcji, pH, a także dostępności wody.

W roślinie, zawartość wapnia jest wyższa w liściach w porównaniu z owocami. W przypadku jabłoni zawartość wapnia w liściach wynosi od 0,61 do 1,6% s.m. natomiast w jabłkach waha się od 0,020 do 0,101% s.m. [Pacholak i in. 2004, Ben i Koszorz 2005, Tomala 1995]. W dostępnej literaturze przedmiotu występują liczne informacje dotyczące zależności między zawartością pierwiastków w liściach a zawartością wapnia w owocach.

Akumulacja wapnia w tkankach roślin zależy od pobierania tego pierwiastka przez korzenie i transportu do części nadziemnej. Pobieranie wapnia jest regulowane przez intensywność transpiracji nadziemnych części roślin [Barber 1995]. Owoce odznaczają się niską transpiracją oraz niskim objętościowym przepływem ksylemowym [Marschner 1995]. W przypadku intensywnej transpiracji liści może nawet dochodzić do wycofywania wapnia z owoców.

Zawartość wapnia w jabłkach zależy też od transportu tego pierwiastka w obrębie rośliny. Wapń jest transportowany do owoców praktycznie przez cały okres wegetacji [Rogers i Batjer 1954, Tomala i in. 1989, Casero i in. 2002]. Zdarza się jednak, że bywa wycofywany z owoców do liści, np. podczas suszy. Dlatego przyjmuje się, że faza wzrostu owoców, w której następuje akumulacja Ca w jabłkach, ma większy wpływ na występowanie GPP niż zawartość tego składnika podczas zbioru owoców. W literaturze znajdują się liczne doniesienia dotyczące transportu wapnia i jego regulacji (z poziomem molekularnym włącznie) u różnych roślin [Tretyn

1994, White i in. 2002, White i Broadley 2003]. U jabłoni zagadnienie transportu wapnia nie jest jednak w pełni wyjaśnione. W 2004 roku w bazie EST NCBI zamieszczona została sekwencja fragmentu genu z komórek kwiatów jabłoni odmiany ‘Gold Rush’, który koduje kanał Mdfw2031j19.y1 wykazujący dużą homologię do białka- kanał wapniowego występującego u pszenicy. W 2006 roku obecność tego genu stwierdzono również w jabłkach odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’ [Wińska-Krysiak i Łata 2006]. W ostatnich latach w bazie EST NCBI zamieszczone zostały kolejne sekwencje nukleotydowe genów kodujących białka zaangażowane w transport składników mineralnych u *Malus domestica*. W badaniach nad mineralnym odżywieniem jabłek najbardziej interesujące są te geny, których ekspresję stwierdzono w takich organach, jak kwiaty lub owoce. Nie mniej cenne jest potwierdzenie u jabłoni ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w transport wapnia, które zostały już scharakteryzowane w innych organizmach. Potwierdzenie roli tychże genów w procesie transportu wapnia u jabłoni może być cenne i wykorzystane w praktyce. W oparciu o takie geny można opracować markery selekcyjne związane ze zwiększonym transportem wapnia do owoców i zwiększoną jędrnością jabłek [Gianfranceschi i Soglio 2004, Perini i in. 2009, Soglio i in. 2009].

Występowanie GPP związane jest nie tylko z zawartością wapnia, ale także z warunkami podczas przechowywania i aktywności szeregu enzymów w okresie przechowywania. W trakcie przechowywania zwłaszcza u owoców o wysokim stosunku K:Ca oraz Mg:Ca wzrasta aktywność lipoksygenazy (LOX) [Marcelle 1989, Wińska-Krysiak i Łata 2010, Sharma i in. 2012]. Lipoksygenazy są zaangażowane we wzrost i rozwój roślin, biosyntezę cząsteczek regulacyjnych, biosyntezę związków lotnych, starzenie, odpowiedź na stres biotyczny i abiotyczny, w tym stres związany z niedoborem składników pokarmowych [Feussner i Wasternack 2002, Troufflard i in. 2010].

Poprzez infiltrację do owoców roztworu chlorku magnezu można wywołać objawy podobne do gorzkiej plamistości podskórnej, za które również odpowiadają lipoksygenazy. Aktywność tego enzymu jest dodatnio skorelowana z zawartością magnezu w owocach oraz ujemnie z zawartością wapnia. Metoda infiltracji do owoców roztworu chlorku magnezu może stanowić pewną przesłankę do szacowania zawartości wapnia w miąższu, co wiąże się ze zdolnością przechowalniczą owoców, a także mogłaby posłużyć do oszacowania poziomu aktywności lipoksygenazy w czasie zbioru owoców, służącej określeniu długości sezonu przechowalniczego bez ryzyka wystąpienia GPP [Tomala 1995].

Celem pracy było poznanie wybranych, fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych podstaw transportu i akumulacji wapnia oraz aktywności lipoksygenazy, na tle uwarunkowań środowiskowych i agrotechnicznych, u dwóch ważnych gospodarczo odmian jabłoni ‘Gala’ i ‘Šampion’.

Cel ten realizowany był w następujących zadaniach badawczych:

- (i) Charakterystyka uwarunkowań środowiskowych i agrotechnicznych ze szczególnym uwzględnieniem zawartości składników pokarmowych w glebie
- (ii) Analiza zawartości wapnia w liściach, zawiązkach i owocach w trakcie dwóch sezonów wegetacyjnych i przechowalniczych
- (iii) Ocena wybranych elementów sprawności aparatu fotosyntetycznego i gospodarki wodnej
- (iv) Dynamika zmian aktywności lipoksygenazy podczas dojrzewania i przechowywania owoców
- (v) Analiza zmian ekspresji genów zaangażowanych w transport wapnia oraz genów kodujących lipoksygenazy wraz z określeniem ich sekwencji nukleotydowych
- (vi) Poszukiwanie zależności pomiędzy zawartością wapnia a aktywnością lipoksygenazy, zawartością wapnia a jędrnością owoców oraz aktywnością lipoksygenazy a jędrnością owoców jabłoni odmian 'Gala' i 'Šampion'.

Materiał do badań stanowiły liście i jabłka z czteroletnich i pięcioletnich drzew jabłoni rosnących na podkładce M.9, odmiany Gala' i 'Šampion' oraz gleba pobrana z warstw ornej i podornej z rzędów drzew i z międzyrzędzi. Materiał pobierano w latach 2008 i 2009 z sadu Doświadczalnego Katedry Sadownictwa SGGW w Wilanowie. Materiał pobierano w trzech terminach: ok. połowy czerwca (termin 1), przełom lipca i sierpnia (termin 3) i ok. połowy września (zbiór owoców – termin 5). W pobranych próbkach gleby oznaczano podstawowe właściwości fizyczne i chemiczne. W materiale roślinnym oznaczano zawartość P, K, Mg i Ca, aktywność lipoksygenazy (LOX) oraz ekspresję genów kodujących białka biorące udział w transporcie wapnia i genów kodujących lipoksygenazy. Określono sekwencje nukleotydowe badanych genów.

W sezonie wegetacyjnym od połowy czerwca do połowy września (co ok. 3 tygodnie, termin 1-5), oceniano wybrane wskaźniki opisujące sprawność aparatu fotosyntetycznego: intensywność fotosyntezy, zawartość chlorofilu i fluorescencję chlorofilu *a* oraz gospodarki wodnej: intensywność transpiracji i względną zawartość wody.

Masę owoców, zawartości składników mineralnych, zmiany jędrności miąższu owoców, aktywność LOX oraz ekspresję genów kodujących lipoksygenazy oznaczano także po 1,5 i 3 miesiącach przechowywania owoców w chłodni zwykłej lub w chłodni z kontrolowaną atmosferą oraz po symulowanym obrocie.

REZULTATY I DYSKUSJA

Charakterystyka uwarunkowań środowiskowych i agrotechnicznych ze szczególnym uwzględnieniem zawartości składników pokarmowych w glebie

Jabłonie badanych odmian rosły w kwaterach gdzie były średnie (dla fosforu) lub wysokie (dla potasu i magnezu) zawartości składników pokarmowych w glebie, a stosunek K:Mg był poprawny. Stężenie soli w glebie, zawartości przyswajalnego fosforu, potasu oraz magnezu w glebie były zbliżone niezależnie od kwatery sadu, w których rosły drzewa badanych odmian. Zawartość wapnia i pH gleby w kwaterze gdzie rosły drzewa odmiany 'Šampion' były wyższe (610-757 mg Ca·dm⁻³ gleby, pH 4,7-5,5) w porównaniu z kwaterą gdzie rosły drzewa odmiany 'Gala' (481-567 mg Ca·dm⁻³ gleby, pH 4,3-5,0). Odczyn gleby w badanych kwaterach był bardzo kwaśny i kwaśny.

Analiza zawartości wapnia i innych składników pokarmowych w liściach w trakcie dwóch sezonów wegetacyjnych

Mimo że odczyn gleby, na której rosły badane odmiany był zdecydowanie niższy od optymalnego dla jabłoni pH 5,7-6,2, nie wpłynęło to na zahamowanie pobierania składników mineralnych z roztworu glebowego.

W liściach obu odmian stwierdzono optymalną zawartość fosforu i magnezu oraz wysoką zawartość potasu. W roku 2008 nie odnotowano istotnej różnicy w zawartości fosforu w liściach między badanymi odmianami, natomiast w 2009 zawartość tego składnika była istotnie wyższa u odmiany 'Šampion'. Tak w roku 2008, jak i 2009, zawartość magnezu oraz wartość stosunku Mg:Ca były niższe, a w zawartość potasu oraz stosunek K:Ca istotnie wyższe w liściach odmiany 'Gala' niż u odmiany 'Šampion'.

Zawartości składników pokarmowych w liściach zmieniały się w trakcie sezonu wegetacyjnego. Stężenie fosforu w liściach malało, zapewne w wyniku rozcieńczenia i redystrybucji tego pierwiastka do innych organów, podobnie malały wartości stosunku K:Ca oraz Mg:Ca. W roku 2008 stężenie magnezu w liściach istotnie wzrosła między pierwszym a trzecim terminem pobierania prób, po czym utrzymywało się na stałym poziomie, natomiast w roku 2009 zmian takich nie obserwowano. Stężenie potasu w liściach utrzymywało się na tym samym poziomie we wszystkich terminach pobierania prób w obu latach badań.

Stężenie wapnia w liściach badanych odmian było na zbliżonym poziomie, natomiast w trakcie sezonu wegetacyjnego obserwowano istotne różnice. W kolejnych terminach pobierania prób, w obu latach badań, stwierdzano wzrost zawartość wapnia w liściach w trakcie sezonu wegetacyjnego. Najwyższe wzrosty, zwłaszcza w liściach odmiany 'Gala', odnotowano między terminami pierwszym a trzecim. Ponadto w sezonie 2008 u obu badanych odmian odnotowano

kolejny istotny wzrost zawartości wapnia w liściach, między terminami trzecim i piątym. Analogiczne zjawisko w 2009 obserwowano tylko w liściach odmiany 'Šampion'. Uważa się, że wapń nie jest transportowany z liści do innych organów, lecz kumulowany, a podobne obserwacje odnotowali Himelrick i Walker [1982], Andziak i in. [2004], Nachtigall i Dechen [2006] oraz Cheng i Rab [2009].

Ocena wybranych elementów sprawności aparatu fotosyntetycznego i gospodarki wodnej

Odmiany wykorzystane w badaniach cechuje stabilne plonowanie. Tak w obecnej pracy, jak i w badaniach prowadzonych w latach 2003-2006 (wyniki nieopublikowane) uzyskano zbliżone wyniki, wskazujące na wyższą masę owocu i plon z hektara odmiany 'Šampion' w porównaniu z odmianą 'Gala'. Należy zaznaczyć, masa owoców cv 'Šampion' przedstawiona w niniejszej pracy jest wyższa niż uzyskana przez Nachtigalla i Dechena [2006], ale nieznacznie niższa od tej uzyskanej przez Wińską-Krysiak i Łatę [2010].

W owocach odmiany 'Šampion' stwierdzono niższą zawartość wapnia niż w owocach cv 'Gala'. Podjęto próbę wyjaśnienia przyczyny tej różnicy.

Poza czynnikami odmianowymi i agrotechnicznymi, na wielkość plonu wpływa przede wszystkim intensywność fotosyntezy, której przebieg warunkowany jest czynnikami wewnętrznymi (sprawność aparatu fotosyntetycznego) oraz zewnętrznymi (światło, temperatura powietrza, stężenie dwutlenku węgla wokół drzew, zasoby wody w glebie i atmosferze oraz związków mineralnych) [Pilarski i Tokarz 2011]. Dwutlenek węgla przenika do przestrzeni międzykomórkowych głównie przez aparaty komórek szparkowych, a stopień ich rozwarcia decyduje o intensywności wymiany CO₂, O₂ i H₂O. Funkcjonowanie aparatów szparkowych powiązane jest ze zmianami poziomu ABA a także stężenia jonów, między innymi, wapnia, potasu i chloru [Mansfield i McAinsh 1995, Grabov i in. 1997]. Pod wpływem ABA następuje wzrost stężenia wapnia w cytozolu, pochodzącego częściowo z magazynów wewnątrzkomórkowych (wakuoli, ściany komórkowej i retikulum endoplazmatycznego). Mechanizm otwierania i zamykania aparatów szparkowych, na który wpływ ma także ABA, związany jest ze zmianami turgoru w komórkach szparkowych i epidermalnych, a te z kolejno zmieniającym się potencjałem wodnym. Dostępność wody jest, więc jednym z podstawowych czynników warunkujących intensywność fotosyntezy.

Ponieważ drzewa obu odmian rosły w porównywalnych warunkach agrotechnicznych i środowiskowych można przyjąć, że wyższe plonowanie odmiany 'Šampion' wynika, przynajmniej w części, z wyższej sprawności aparatu fotosyntetycznego. Jak wykazały przeprowadzone badania, wynika ona z wyższej intensywności fotosyntezy, zawartości chlorofilu

(powiązanej z lepszym odżywieniem liści w magnez) oraz wartości wskaźników fluorescencji chlorofilu *a*.

W badaniach własnych, wartość potencjalnej wydajności fotochemicznej systemu PS II, F_v/F_m , kształtowała się od 0,81 do 0,84, a współczynnik stopnia adaptacji do warunków stresowych, F_m/F_0 , od 5,2 do 6,2, co może sugerować, że jabłonie rosły w warunkach optymalnych. Według Björkman i Demmig [1987] F_v/F_m dla większości roślin rosnących w warunkach bezstresowych osiąga około 0,83, a według Liu i in. [2012b] w liściach jabłoni odmiany 'Gala' od 0,83 do 0,85. Shmidts-Eiberger i in. [2002] wskazują, że F_v/F_m może być wskaźnikiem stresu wywołanego niedoborem wapnia u pomidora i jabłoni. Wartość tego parametru w warunkach stresu spada wówczas poniżej 0,8. Wartość F_m/F_0 w zdrowych liściach wynosi około 4-5 i również obniża się pod wpływem czynników stresowych [Hansatech Instrument Ltd. 1996].

Kao i Tsai [1998] oraz Dąbrowska i in. [2011] zastosowali pomiar fluorescencji chlorofilu *a* do oszacowania dostępności wody dla roślin. Innym parametrem obrazującym poziom stresu suszy był wskaźnik funkcjonowania, P.I. Według Viljevac i in. [2013] oraz Martinazzo i in. [2012] spadek wartości tego wskaźnika poniżej 2,0 u wiśni i brzoskwini była wynikiem stresu suszy. Parametr ten w badaniach własnych osiągał wartości w zakresie od około 2,0 do 3,2, co pozwala sądzić, że drzewa przez większą część obu sezonów wegetacyjnych nie znajdowały się w warunkach stresowych. Jedynie w czwartym terminie pomiaru w 2009 roku, w okresie bardzo małych ilości opadów atmosferycznych jego wartość wynosiła ok. 1,7, co świadczy o tym, że w tym okresie rośliny rosły w warunkach stresu.

Gospodarka wodna rośliny a w szczególności intensywność transpiracji jest w oczywisty sposób związana z dostępnością wody. W warunkach jej niedoboru następuje zamykanie aparatów szparkowych i ograniczenie intensywność transpiracji, a jednocześnie także i absorpcji dwutlenku węgla [Pilarski i Tokarz 2011]. W niniejszych badaniach aktualna wilgotność wagowa gleby, AWWG, mierzona w trzecim terminie 2008r. była wyższa w kwaterze gdzie rosły drzewa odmiany 'Gala', niż odmiany 'Šampion'. Jednocześnie liście odmiany 'Gala' wykazywały wyższą intensywność transpiracji oraz zawartość wapnia. Podobnie wyższą intensywność transpiracji oraz zawartość wapnia zaobserwowano u tej odmiany w analogicznym terminie w roku 2009, mimo niższej AWWG. Zjawisko to związane jest zapewne z ogólnie znanym mechanizmem transportu wapnia do liści wraz z prądem transpiracyjnym.

Proces transpiracji pozwala zarówno pobierać wodę z roztworu glebowego, ale także usuwa ją z roślin, chroniąc je przed przegrzaniem spowodowanych nagromadzeniem energii cieplnej zaabsorbowanej wraz z promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym. W warunkach dobrego zaopatrzenia w wodę oba te procesy przebiegają sprawnie. Jednak przy ujemnym bilansie

wodnym, gdy intensywność transpiracji przeważa nad pobieraniem wody, aparaty szparkowe zamykają się, co z kolei ogranicza intensywność fotosyntezy. W niniejszych badaniach średnie wartości intensywności fotosyntezy i transpiracji z całego sezonu wegetacyjnego były wyższe, a opory dyfuzyjne niższe w liściach odmiany 'Šampion'. Odmiana 'Gala', oprócz wyższych oporów dyfuzyjnych charakteryzowała się także wyższą (2008r.) lub porównywalną (2009r.) względną zawartością wody w liściach. Sugeruje to, że odmiana 'Gala' niż 'Šampion' lepiej gospodaruje wodą. Wartości RWC były porównywalne do tych, jakie uzyskali Liu i in. [2012a] dla liści 'Gala'.

Analiza zawartości wapnia i innych składników pokarmowych w zawiązkach i owocach w trakcie dwóch sezonów wegetacyjnych

Badane odmiany nie różniły się zawartością fosforu i magnezu oraz stosunkiem K:Ca w owocach. W jabłkach odmiany 'Šampion' odnotowano wyższą wartość stosunku Mg:Ca, natomiast w owocach odmiany 'Gala' istotnie wyższą zawartość potasu i wapnia. W obu latach badań odnotowano w jabłkach badanych odmian wzrost stosunku K:Ca i Mg:Ca w trakcie sezonu wegetacyjnego, natomiast zawartość fosforu, magnezu i wapnia była najwyższa w pierwszym terminie pobierania prób (w zawiązkach), a w kolejnych terminach pobierania prób obserwowano ich spadki, szczególnie w zawartości Ca w jabłkach odmiany 'Šampion', która charakteryzuje się większą masą owoców. Na zawartość wapnia wpływały również prawdopodobnie warunki atmosferyczne w sezonie wegetacji. W roku 2009, przy wysokich temperaturach latem i obfitych opadach deszczu od połowy maja do połowy lipca, zawartość wapnia była wyższa niż w roku 2008.

Zawartość wapnia w poszczególnych częściach jabłek w badaniach własnych była bardzo zróżnicowana. Niezależnie od odmiany, najwyższą zawartość wapnia stwierdzono w gniazdach nasiennych, następnie niższą w skórce i najniższą w miąższu jabłek. Zawartości wapnia w roku 2009 były istotnie wyższe niż w 2008 (z wyjątkiem gniazd nasiennych jabłek odmiany 'Gala'). W obu latach badań w skórce odmiany 'Šampion' i 'Gala' stwierdzono, odpowiednio, 2,5- i 2,6-krotnie wyższą niż w miąższu zawartość wapnia. Wyniki te były porównywalne z tymi przedstawionymi przez Perringa i Wilkinsona [1968].

W fazie dojrzałości zbiorczej zaopatrzenie jabłek badanych odmian w wapń było stosunkowo wysokie, owoce odmiany 'Šampion' zawierały powyżej $280 \mu\text{g Ca} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m., owoce 'Gala' powyżej $480 \mu\text{g Ca} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. Zarówno podczas zbioru jak i po 3 miesiącach przechowywania nie zaobserwowano owoców z objawami GPP. Według Haynesa [1990] gorzka plamistość podskórna występowała na jabłkach zawierających w miąższu poniżej $250 \mu\text{g Ca} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. Wartość krytyczna w jabłkach odmiany 'Šampion' według Lanauskas i Kviklienė [2005] to poniżej 380

mg Ca · kg⁻¹ s.m. W owocach odmiany ‘Gala’ objawy choroby występowały przy stężeniu wapnia poniżej 36 mg · kg⁻¹ s.m. [Amarante i in. 2012]. Zawartość wapnia w miąższu jabłek powyżej 500 μg Ca · g⁻¹ s.m. (Schouten [1982], Nielsen [1990]) i/lub powyżej 700 mg Ca · kg⁻¹ s.m. w skórce (Drake i in. [1974]) ma ograniczać występowanie GPP.

W niniejszych badaniach zawartość wapnia w owocach odmian ‘Šampion’ i ‘Gala’ była ujemnie skorelowana z wartościami K:Ca i Mg:Ca, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Szot [2010]. Stosunek K:Ca w owocach badanych odmian był wysoki, w fazie dojrzałości zbiorczej, odpowiednio w roku 2008 i 2009, miał on wartość 29 i 25,4 dla jabłek odmiany ‘Šampion’, oraz 21,6 i 20 dla odmiany ‘Gala’. Wysoka wartość stosunku K:Ca w owocach wpływa na występowanie GPP [Marcelle 1989, Łysiak 2013]. Piestrzeniewicz [1999] podaje, że krytyczna wartość K:Ca dla odmiany ‘Šampion’ wynosi 18, zaś dla ‘Jonagold’- 28. Wzrost stosunku K:Ca w owocach powoduje, zdaniem Marcelle [1989], wzrost aktywności enzymatycznej lipoksygenazy, co również ma istotny związek z powstawaniem objawów gorzkiej plamistości podskórnej.

Zależność między zawartością wapnia w owocach, a zawartością wapnia w glebie zależała od odmiany. Średnia zawartość wapnia w glebie w kwaterze gdzie rosły drzewa odmiany ‘Šampion’ była wyższa, natomiast kwasowość wymienna niższa, niż w glebie, na której rosły drzewa odmiany ‘Gala’. Pomimo to, stężenie wapnia w owocach odmiany ‘Šampion’ było niższe niż w owocach ‘Gala’, nie było ono też istotnie skorelowane z zawartością wapnia w glebie, natomiast wykazano taką korelację dla kwasowości wymiennej w glebie zadarnionych międzyrzędzi. Zawartość wapnia w jabłkach odmiany ‘Gala’ była dodatkowo skorelowana z zawartością wapnia w glebie rzędów (utrzymanych w ugorze herbicydowym), natomiast nie wykazano korelacji między zawartością wapnia w owocach a kwasowością wymienną. Pozwala to wnioskować, że zawartość wapnia w jabłkach odmiany ‘Šampion’ w większym stopniu była uzależniona od czynników genetycznych niż od zawartości wapnia w glebie i jej odczynu, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [Tomala 1995].

Zawartość wapnia w owocach odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’ była istotnie ujemnie skorelowana z zawartością potasu w glebie zadarnionych międzyrzędzi. Natomiast nie wykazano istotnej zależności między zawartością wapnia w jabłkach a zawartością potasu w owocach, aczkolwiek tendencja spadku zawartości wapnia ze wzrostem zawartości potasu była zauważalna.

Analiza zmian ekspresji genów kodujących białka transportujące wapń wraz z określeniem ich sekwencji nukleotydowych

Prowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że zawartość Ca wewnątrz organelli komórkowych podlega ścisłej regulacji, w której szczególną rolę odgrywają białka transportujące

wapń przez błony cytoplazmatyczne. Zaburzenia w ich funkcjonowaniu może narazić tkanki owoców na niedobór wapnia [Park i in. 2005, De Freitas i in. 2011]. W transgenicznym pomidorze zawierającym zmodyfikowany gen kodujący zlokalizowany w tonoplazmie transporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (sCAX1) jako białko nieaktywne, objawy niedoboru wapnia w owocach wystąpiły przy niskim poziomie wapnia w cytozolu i apoplazmie. W owocach tych wykazano dwukrotnie wyższe stężenie wapnia w tkankach oraz wyższą jego akumulację wewnątrz wakuoli w porównaniu z owocami roślin typu dzikiego. W pomidorach transgenicznym wykazano również niższą koncentrację wapnia w cytozolu i apoplazmie, wzrost przepuszczalności błon, plazmolizę komórek oraz 100% owoców z objawami niedoboru wapnia. Ten mechanizm regulacji potwierdziły również badania Conn i in. [2011], którzy dowiedli, że stężenie wolnego Ca^{2+} w komórkach mezofilu mutantów *A. thaliana* z nieaktywnymi genami *CAX1* i *CAX3* (kodującymi tonoplastowe transportery pomocnicze $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$) było trzykrotnie wyższe w porównaniu z roślinami typu dzikiego.

W niniejszych badaniach potwierdzono u jabłoni ekspresję szeregu genów kodujących białka transportujące wapń: *MdCaChan1*, *MdCaPom1*, *MdCaPom2*. Nie zaobserwowano natomiast ekspresji genów kodujących pomocnicze transportery – CAX (zwłaszcza *CAX1*), aczkolwiek obecność tych genów u jabłoni potwierdzono analizą PCR. W dostępnej literaturze brak jest jednak doniesień dotyczących CAX u jabłoni. Również w bazach TCDB [<http://www.tcdb.org>] i NCBI w tym EST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] brak jest sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych CAX wyizolowanych z jabłoni. Sekwencje starterów dla powielenia fragmentów genów transporterów pomocniczych zostały zaprojektowane w oparciu o opublikowane sekwencje nukleotydowe genów *A. thaliana*. Bardzo prawdopodobne jest wytłumaczenie, że obszary przy projektowaniu starterów, różnią się istotnie między rzodkiewnikiem a jabłonią. Niewykluczone też, że geny te występują u jabłoni, jednak w badanych terminach nie ulegają ekspresji.

Ekspresja genów *MdCaChan1*, *MdCaPom1*, *MdCaPom2* w liściach obu odmian była wyższa niż w owocach, co korespondowało z ilością wapnia w tych organach. Poziom badanych transkryptów był zróżnicowany. Ekspresja występowała prawie we wszystkich badanych fazach wzrostu i dojrzewania owoców, co wskazuje na udział kodowanych przez nie białek w transporcie i regulacji zawartości wapnia przez cały okres rozwoju owocu. Wyniki badań potwierdzają wcześniejsze doniesienia Rogersa i Batjera [1954], Tomali i Sadowskiego [1989] oraz Casero i in. [2002]. Według Jansena i wsp. [2008] geny kodujące białka związane z transportem w obrębie jabłek odmiany ‘Royal Gala’ wykazują zwiększoną ekspresję między 60 a 87 dniem po kwitnieniu, tj. gdy do owoców transportowane są największe ilości składników pokarmowych i wody. Autorzy ci nie opisują jednak ekspresji genów związanych z transportem wapnia.

Ekspresja *MdCaChan1* była wyższa zarówno w liściach, jak i owocach odmiany ‘Gala’ (*MdCaChan1_2*) niż w organach ‘Šampion’ (*MdCaChan1_1*). Wyższa ekspresja *MdCaChan1_2* w liściach może tłumaczyć wyższą zawartość wody w tkankach liści tej odmiany, gdyż gen ten koduje domniemany kanał wapniowy, regulujący zamykanie aparatów szparkowych.

Wyższy poziom transkryptu *MdCaChan1_2* był szczególnie widoczny we wszystkich fazach rozwoju owoców w czasie badań prowadzonych w 2009 roku. Wyższa ekspresja genu *MdCaChan1_2* może przekładać się na wyższą ilość białka, a tym samym intensywność transportu wapnia do/i w obrębie owoców odmiany ‘Gala’. Podobne zmiany w ekspresji genu *MdCaChan* obserwowane były przez Wińską-Krysiak i Łatę [2006]. Na podstawie tych badań Perini i wsp. [2009] opracowali marker *MdCaChannel*, który może być zastosowany w selekcji odmian jabłoni odznaczających się wydajnym transportem wapnia do owoców.

Ekspresja *MdCaChan1* zależała od organu i jego części. Najniższa ekspresja tego genu, wyrażona w ilości transkryptu RNA, wystąpiła w skórcie obu odmian, natomiast w mięszu i gniazdach nasiennych była wyższa. Sugeruje to, że gen *MdCaChan1* koduje kanał wapniowy, który zaangażowany jest w transport wapnia raczej w mięszu i gniazdach nasiennych niż w skórcie.

Podobieństwo sekwencji nukleotydowej fragmentu genu *MdCaChan1_1* (cv ‘Šampion’) i odpowiadającej jej sekwencji aminokwasowej z sekwencjami zebranymi w bazie GenBank pozwala wnioskować, że gen ten koduje kanał wapniowy. Sekwencja nukleotydowa w największym stopniu (87%) była podobna do sekwencji cDNA *Mdfw2031j19.y1* u *Malus x domestica* odmiany ‘Gold Rush’, klonu *Mdfw2031j19*, kodującego domniemany kanał wapniowy Q9ZT83 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Ekspresja genu *Mdfw2031j19.y1* wystąpiła podczas kwitnienia, natomiast w niniejszych badaniach ekspresję *MdCaChan1* odnotowano także w owocach, jak i w liściach. Kanał wapniowy Q9ZT83 (AtTPC) występujący w rzodkiewniku jest białkiem zależnym od napięcia (VDCC), zlokalizowanym głównie w membranie wakuoli w komórkach liści [Pottosin i Schonknecht 2007] lub w plazmalemmie w komórkach korzeni [White i in. 2002]. AtTPC uaktywnia się podczas stresu wywołanego obecnością wolnych rodników (ROS), bierze udział w regulacji kiełkowania pyłku oraz zamykaniu aparatów szparkowych.

Sekwencja *MdCaChan1_1* była także podobna do sekwencji genów kodujących kanały wapniowe u *Glycine max* (LOC100806160), u *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* (AtTPC1) oraz *Vitis vinifera* (TPC1).

Sekwencja nukleotydowa genu *MdCaChan1_2* z cv ‘Gala’ była w jeszcze wyższym stopniu niż *MdCaChan1_1* podobna do sekwencji cDNA *Mdfw2031j19.y1* z *Malus x domestica* klonu *Mdfw2031j19* (92% podobieństwa), a także do genów kodujących kanały u *Glycine max*

(LOC100806160), *Vitis vinifera* (TPC1) oraz *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* (AtTPC1) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Obecna praca jest pierwszym doniesieniem o ekspresji genu *MdCaPom1*, kodującego białko Ca-ATP 9 w liściach i owocach *Malus x domestica* odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’. Ekspresja genu *MdCaPom1* była zdecydowanie niższa niż genu *MdCaChan1*. Poziom transkryptu *MdCaPom1* w owocach generalnie był bardzo niski, poza trzecim terminem pobierania prób u odmiany ‘Šampion’. W owocach w dojrzałości zbiorczej najwyższą ekspresję *MdCaPom1* obserwowano w miększu, a następnie w gniazdach nasiennych, podczas gdy w skórce obu odmian ekspresji nie odnotowano. U obu odmian jabłoni gen *MdCaPom1* (570 pz) wykazał identyczną sekwencję nukleotydową i był homologiczny w 99,8% (569 pz/570 pz) do sekwencji mRNA fragmentu genu *Mdfrs3135B13.g1* z *Malus x domestica*, kodującego białko podobne do NP_188755.2, potencjalnej pompy transportującej wapń, ATP-azy 9 z *Arabidopsis thaliana*. ATP-aza 9 z rzodkiewnika jest to P-ATP-aza typu IIB, występuje w plazmalemmie i bierze udział w transporcie wapnia do apoplastu. Jest ona również zaangażowana w procesy kiełkowania pyłku [Schiott i in. 2004]. Gen *MdCaPom1* wykazał podobieństwo również do transkryptów kodujących ATP-azę 9 u innych roślin: soi (XM_003546856.1), (XM_003542093.1), winorośli (XM_002275038.2), topoli (CT029497.1), rzodkiewnika (NM_113013.4), (XM_002883245.1). Podobieństwo to było duże i wynosiło od 83% do 87% na długości 567 pz [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

W sekwencji aminokwasowej fragmentu białka *MdCaPom1* występują elementy charakterystyczne dla nadrodziny COG4087 oraz nadrodziny Kation_ATPazy_C. Wykazuje ona bardzo dużą homologię do białek typu ATPazy IIB_Ca, ATPazy IIA1_Ca, ATPazy IIA2_Ca [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Białko *MdCaPom1* jest potencjalnym transporterem wapnia również w badanych odmianach jabłoni.

Ekspresja genu *MdCaPom2* u badanych jabłoni była wyższa od ekspresji *MdCaPom1*, ale znacznie niższa od *MdCaChan1*. Poziom transkryptu *MdCaPom2* w liściach odmiany ‘Gala’ był wyższy niż u odmiany ‘Šampion’. W owocach poziomy transkryptu był podobny u obu odmian w próbach pobranych w pierwszym terminie, natomiast w owocach odmiany ‘Šampion’ w trzecim terminie w roku 2008 był znacząco wyższy, a w fazie dojrzałości zbiorczej w obu latach badań ekspresji tego genu nie odnotowano. Ten profil ekspresji może tłumaczyć większą zawartość wapnia w owocach odmiany ‘Gala’ w fazie dojrzałości zbiorczej. Sekwencja tak nukleotydowa, jak i aminokwasowa wskazuje, że gen *MdCaPom2* koduje prawdopodobnie białko biorące udział w transporcie wapnia. Sekwencja nukleotydowa w 99,8% (523 pz/524 pz) była podobna do sekwencji mRNA fragmentu genu *Mdfrs3135B13.g1* z *Malus x domestica*, kodującego białko podobne do NP_188755.2, potencjalnej pompy transportującej wapń ATP-azy 9 u *Arabidopsis*

thaliana. Sekwencja *MdCaPom2* była także podobna do sekwencji genów kodujących ATP-azę 9 również u *Glycine max* (XM_003546856.1), (XM_003542093.1), *Ricinus communis* (XM_002514329.1), *Populus* (CT029497.1) oraz *Vitis vinifera* (XM_002275038.2). W sekwencji aminokwasowej *MdCaPom_2* posiadała fragmenty charakterystyczne dla nadrodzin COG4087 i Kation_ATPazy_C. Podobnie jak *MdCaPom1*, również sekwencja *MdCaPom2* wykazywała bardzo dużą homologię do białek typu ATPazy IIB_Ca, ATPazy IIA1_Ca, ATPazy IIA2_Ca [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Udział *MdCaChan1*, *MdCaPom1*, *MdCaPom2* w transporcie wapnia w jabłkach odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’ wydaje się być bezsprzecznym, jednak ich możliwe inne funkcje nie zostały jeszcze zbadane. Nie jest też wiadomo, w jakim stopniu aktywność tych genów zaspokaja zaopatrzenie liści i owoców w wapń i jak jest regulowana, czy też jak geny te i kodowane przez nie białka funkcjonują na tle innych możliwych genów i białek transporterów wapnia. Wyjaśnienie pełnej roli tych genów mogą przynieść dalsze badania, prowadzone na wielu poziomach. Szczególnie interesujące wydają się wykorzystanie technik antysensowego DNA w transgenicznym kulturach tkankowych. Należy również oczekiwać, że dzięki nowym narzędziom bioinformatycznym, szerokim możliwościom badania właściwości białek *in silico*, dynamicznie rozwijająca się proteomika pozwoli wypełnić luki w wiedzy na temat transportu wapnia.

Prowadzone prace miały, w założeniu, charakter tak poznawczy jak i, w dalszej perspektywie, aplikacyjny. Na podstawie sekwencji *MdCaChan1* już obecnie opracowano marker [Perini i in. 2009], który może znaleźć zastosowanie w selekcji i hodowli nowych odmian jabłoni o wysokiej zawartości wapnia w owocach, podwyższonej jędrności oraz mniej podatnych na GPP.

Dynamika zmian aktywności lipoksygenazy podczas dojrzewania i przechowywania owoców. Analiza zmian ekspresji genów kodujących lipoksygenazy wraz z określeniem ich sekwencji nukleotydowych.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że aktywność lipoksygenazy była wyższa w liściach w porównaniu z owocami, podobnie jak we wcześniejszej pracy Domínguez i in. [2010]. Aktywność LOX w liściach jabłoni stopniowo wzrastała w sezonie wegetacyjnym. Ponadto w piątym terminie pobierania prób w roku 2009, przy bardzo małej ilości opadów w okresie od sierpnia do połowy września, aktywność LOX w liściach odmiany ‘Šampion’ była znacząco wyższa niż w analogicznym terminie w roku 2008. Wyższa aktywność enzymu najprawdopodobniej związana była z reakcją odmiany ‘Šampion’ na stres suszy. Reakcja taka została opisana uprzednio w liściach drzew oliwnych przez Sofó i in. [2004].

Aktywność LOX zmieniała się w trakcie sezonu wegetacyjnego także w zawiązkach owoców i owocach, jednak w ostatnim terminie pobierania prób była na niższym poziomie. Podobne

zmiany aktywności LOX w truskawce zostały opisane przez Leone i in. [2003]: aktywność LOX była niższa w rozwijających się owocach niż w owocach w fazie początku dojrzewania, a następnie zmniejszała się w owocach dojrzałych.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają wcześniejsze doniesienia o różnej aktywności LOX w poszczególnych częściach owoców [Leone i in. 2003, Sofo i in. 2004]. W jabłkach obu odmian najwyższą aktywność LOX odnotowano w gniazdach nasiennych, aktywność tego enzymu w skórce i miąższu jabłek zależała od odmiany.

Aktywność LOX w owocach obu odmian w fazie dojrzałości zbiorczej była dodatnio skorelowana ze stosunkiem K:Ca w owocach. Taką zależność, jak też i wzrost występowania chorób fizjologicznych wraz z wzrostem aktywności LOX, odnotowali uprzednio Marcelle [1989], Sharma i in. [2006] oraz Wińska-Krysiak i Łata [2010].

W prezentowanych badaniach wykazano, że aktywność LOX w dojrzałych owocach jest dodatnio skorelowana z zawartością potasu, zaś ujemnie skorelowana z zawartością wapnia w jabłkach. W przypadku odmiany ‘Gala’, dodatkowo zaobserwowano pozytywną korelację względem średniej masy owocu, a negatywną w stosunku do jędrności miąższu.

Lipoksygenazy są zaangażowane zarówno w proces dojrzewania, jak i starzenia się owoców [Marcell 1989, Leone i in. 2003, Sharma i in. 2006, Sharma i Singh 2008, Domínguez i in. 2010, Sharma i in. 2012]. W niniejszej pracy, w czasie długiego przechowywania jabłek obu odmian wzrastała w nich aktywność lipoksygenazy, zaś spadała ich jędrność. Wzrost ten był niższy u jabłek przechowywanych w chłodni z kontrolowaną atmosferą. Aktywność LOX w jabłkach zawsze wzrastała po okresie symulowanego obrotu, jednak po trzech miesiącach przechowywania nie odnotowano jabłek z objawami GPP, prawdopodobnie dzięki dobremu zaopatrzeniu w wapń. Marcelle [1989] zaobserwował w przechowywanych jabłkach nadaktywność lipoksygenazy, wysoki stosunek K:Ca (> 36) i niższą zawartość wapnia, oraz występowanie zaburzeń fizjologicznych w postaci gorzkiej plamistości podskórnej. W badaniach Wińskiej-Krysiak i Łaty [2010], prowadzonych na 8 odmianach jabłoni, wykazano ujemną zależność między aktywnością LOX a zawartością wapnia, a dodatnią względem stosunku K:Ca. Masa owoców z objawami GPP była istotnie wyższa w porównaniu z jabłkami tych samych odmian, ale bez oznak GPP. W badaniach Sharma i współpracowników [2012], obok wzrostu aktywności LOX podczas przechowywania jabłek odmiany ‘Royal Delicious’, zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy zawartością wapnia w owocach, a występowaniem zaburzeń fizjologicznych, w tym gorzkiej plamistości podskórnej.

W przeprowadzonych badaniach obserwowano ekspresję tylko dwóch genów kodujących lipoksygenazy: *MdLOX2*, *MdLOX5*, podczas gdy Schaffer i in. [2007] uzyskali ekspresję aż 11 genów kodujących lipoksygenazy. *MdLOX2*, *MdLOX5* były eksprymowane tak w liściach, jak i w

owocach, w tych ostatnich zarówno podczas sezonu wegetacyjnego jak i w trakcie przechowywania, przy czym poziom transkrypty i, w konsekwencji, aktywność enzymów, były wyższe w liściach niż w owocach w większości prób i terminów pobierania. Poziom transkrypty *LOX2* w liściach odmiany ‘Gala’ był zwykle wyższy niż w liściach odmiany ‘Šampion’. Ekspresję *LOX2* w owocach stwierdzono w miąższu i gniazdach nasiennych obu odmian, natomiast w skórce owoców w fazie dojrzałości zbiorczej jedynie u odmiany ‘Gala’.

Poziom badanego transkrypty *MdLOX5* (fragmenty *MdLOX5_1* i *MdLOX5_2*, odpowiednio dla cv ‘Šampion’ i ‘Gala’), u obu odmian był wyrównany w liściach (z wyjątkiem odmiany ‘Gala’, w fazie dojrzałości zbiorczej w sezonie 2009, kiedy był wyższy), natomiast w zawiązkach obserwowano jego zróżnicowanie. U odmiany ‘Šampion’, w sezonie 2008, w pierwszym i trzecim terminie pobierania prób, ekspresja genu *MdLOX5_1* była na zbliżonym poziomie, po czym w piątym terminie uległa obniżeniu, a w 2009 roku u obu odmian odnotowano spadek poziomu transkrypty w kolejnych terminach dojrzewania owoców. U odmiany ‘Gala’ w 2008 roku odnotowano natomiast wzrost ekspresji *MdLOX5_2* w czasie trwania sezonu wegetacyjnego.

W badaniach Schaffer i wsp. [2007] prowadzonych na jabłkach odmiany ‘Royal Gala’, ekspresja genów *LOX2*, *LOX4* i *LOX5*, aczkolwiek istotnie wyższa w skórce niż w miąższu znajdującym się bezpośrednio pod nią, nie ulegała zmianie pod wpływem etylenu. Autorzy sugerują, że prawdopodobnie geny te kodują enzymy zaangażowane w uwalnianie substancji lotnych, alkoholi i estrów. Janssen i wsp. [2008] wykorzystali matryce zawierające cDNA z RNA wyizolowanego z miąższu znajdującego się pod skórką, do badania zmian ekspresji genów kodujących białka biorące udział w procesach zachodzących podczas wzrostu i dojrzewania owoców jabłoni odmiany ‘Royal Gala’. Spośród 13 000 genów, których ekspresję obserwowano w ośmiu terminach, od pełni kwitnienia po dojrzałość zbiorczą, po 132 dniach od pełni kwitnienia zmiany w poziomie transkrypcji odnotowano dla 106 genów. Wśród nich znalazł się również gen EB141282, kodujący lipoksygenazę, którego ekspresja zależała od poziomu etylenu. Ekspresji tego genu nie odnotowano we wcześniejszych terminach rozwoju owoców.

Po przechowywaniu, a zwłaszcza po symulowanym obrocie, w większości badanych próbek odnotowano znaczący wzrost ekspresji *MdLOX5* i *MdLOX2*. Sekwencje nukleotydowe *MdLOX2* były praktycznie identyczne (98% podobieństwa) do mRNA *Mdftr3095j17.y2* z *Malus x domestica*, kodującego białko podobne do lipoksygenazy Q9ZS80, wyizolowanej z *Solanum lycopersicum*, natomiast *MLOX5_1* i *MLOX5_2* identyczne (odpowiednio, 99% i 100% podobieństwa) z cDNA *Mdftr3091h01.y1* z *Malus x domestica* klonu *Mdftr3091h01*, kodującego białko podobne do tej samej lipoksygenazy Q9ZS80. Ekspresję *Mdftr3095j17.y2*, jak i *Mdftr3091h01.y1* obserwowano w różnych stadiach rozwoju owoców odmiany ‘Gold Rush’.

Sekwencja *MdLOX2* była też podobna, aczkolwiek w mniejszym stopniu, do sekwencji genów kodujących lipoksygenazy również u *Vitis vinifera* (XM_002283087.1), *Ricinus communis* (XM_002520598.1), *Solanum lycopersicum* (NM_001247330.1), *Solanum tuberosum* (X96405.1), *Prunus dulcis* (EF640667.1). Sekwencje *MLOX5_1* i *MLOX5_2* wykazały również homologię od 75 do 88% do genów kodujących lipoksygenazy w takich roślinach, jak: *Prunus dulcis* (EF640667.1), *Vitis vinifera* (XM_002283087.1 i AM441788.2), *Ricinus communis* (XM_002520598.1), *Camellia sinensis* (FJ794853.1 i HM440161.1) i *Populus deltoides* (DQ131178.1) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Podczas dojrzewania i przechowywania zmienia się jędrność owoców [Tomala 1995, Lanauskas i Kviklienė 2005, Skrzyński 2007]. W niniejszych badaniach również odnotowano spadki jędrności jabłek po ich przechowywaniu. Po 3 miesiącach przechowywania jabłek w chłodni zwykłej, spadki te dochodziły do 50% u odmiany ‘Šampion’ i 47% u ‘Gala’, natomiast w warunkach kontrolowanej atmosfery obniżenie jędrności było niższe i wyniosło odpowiednio około 20 i 38%. Niezależnie od warunków przechowywania, po okresie symulowanego obrotu, odnotowywano kolejne znaczące spadki jędrności owoców. W badaniach Tomali [1995] nie stwierdzono zależności między jędrnością po przechowywaniu a zawartością wapnia w liściach, zawiązkach czy owocach odmian: ‘Gloster’, ‘Cortland’, ‘Spartan’ i ‘Lobo’, jednak jędrność owoców odmiany ‘Gloster’ i ‘Cortland’ po przechowywaniu zależała od ich jędrności po zbiorze. W niniejszej pracy u obu odmian wykazano dodatnią korelację między jędrnością owoców a zawartością wapnia w jabłkach w fazie dojrzałości zbiorczej. We wcześniejszych badaniach Sadowski i in. [1967], Sams i Conway [1984] oraz Abbott i in. [1989], obserwowali wyższą jędrność owoców zawierających w miąższu więcej wapnia.

Możliwe jest prognozowanie przydatności jabłek do długiego przechowywania przy wykorzystaniu prostego testu, polegającego na infiltracji owoców roztworem chlorku magnezu [Tomala 1995, Piestrzeniewicz 1999, Amarante i in. 2005, 2012]. Amarante i wsp. [2005] wykazali, że występowaniem objawów podobnych do GPP w jabłkach odmiany ‘Gala’ poddanych infiltracji jest dobrym odzwierciedleniem objawów występujących po 4 miesiącach przechowywania w chłodni zwykłej. Ryzyko wystąpienia gorzkiej plamistości podskórnej zmniejszało się, gdy zawartość wapnia w miąższu owoców odmiany ‘Gala’ wynosiła powyżej 55 mg · kg⁻¹ św.m., a w skórce powyżej 192 mg · kg⁻¹ św.m. Również we wcześniejszych doniesieniach Tomali [1995] oraz Piestrzeniewicza i Tomali [2001], stwierdzono ujemną korelację między zawartością wapnia w owocach a liczbą plam wywołanych infiltracją roztworem chlorku magnezu.

W dostępnej literaturze nie ma jednak doniesień na temat zmian aktywności lipoksygenazy w jabłkach poddanych infiltracji roztworem chlorku magnezu. W niniejszej pracy po raz pierwszy

przedstawiono zmiany zarówno aktywności LOX, jak ekspresji kodujących ją genów w jabłkach infiltrowanych roztworem chlorku magnezu. Aktywność LOX był wyższa u odmiany ‘Šampion’, bardziej podatnej na gorzką plamistość podskórną. W obrębie owocu, na ogół była wyższa w skórce niż w całych owocach. Wystąpieniu w owocach traktowanych chlorkiem magnezu objawów przypominających GPP towarzyszył znaczący wzrost aktywności LOX w skórce, o co najmniej 139% u odmiany ‘Šampion’ i 82% u odmiany ‘Gala’. Wyniki te wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań, na większej liczbie odmian, dla określenia krytycznej wartości aktywności lipoksygenazy, przy której jabłka danej odmiany nie byłyby podatne na rozwój GPP. Uzyskane wyniki wskazują, że ocena aktywności LOX, zarówno w całych jabłkach, jak i w skórce (bardziej wskazane ze względu na wyższą aktywność lipoksygenazy), może być wykorzystana bądź jako samodzielne narzędzie, bądź łącznie z innymi dostępnymi testami, w prognozowaniu możliwości długiego przechowywania owoców.

W owocach infiltrowanych roztworem chlorku magnezu zaobserwowano ekspresję zarówno genu *MdLOX2*, jak i *MdLOX5*. Ekspresja *MdLOX5* była u obu odmian stabilna, w owocach traktowanych chlorkiem magnezu nieznacznie odbiegała od prób kontrolnych. Znaczący wzrost *MdLOX2* odnotowano w jabłkach odmiany ‘Šampion’ infiltrowanych roztworem chlorku magnezu. Uwzględniając wystąpienie objawów GPP jabłkach odmiany ‘Šampion’ po ich przechowywaniu przez 6 miesięcy (na jabłkach odmiany ‘Gala’ objawy GPP nie wystąpiły, dane nie prezentowane), można przypuszczać, że wzrost aktywności enzymu kodowanego przez *MdLOX2* jest związany z wystąpieniem gorzkiej plamistości podskórnej.

Z punktu widzenia konsumentów istotne znaczenie zawartości wapnia w owocach sprowadza się do powierzchownej wiedzy, uwzględniającej często jedynie aspekty zdrowotne, natomiast wpływ wapnia na jakość owoców nie bywa przez konsumentów uwzględniany. Jest on natomiast uwzględniany przez producentów. Zwiększenie zawartości jonów wapnia w roztworze glebowym może zwiększyć plon, nie zawsze jednak przekłada się to na jego zawartość wapnia w owocach.

Tymczasem oprócz czynników agrotechnicznych, na zawartość wapnia w owocach bardzo istotny wpływ wywiera czynnik genetyczny. Odmiany różnią się pod względem tak zawartości wapnia, jak i wydajności jego transportu do owoców. W pracach hodowlanych nad uzyskaniem linii i odmian charakteryzujących się dużą ilością wapnia w owocach korzysta się obecnie z narzędzi biologii molekularnej i szeroko pojmowanej biotechnologii. Techniki te, jakkolwiek niezwykle wydajne i precyzyjne, wymagają jednak równie precyzyjnych danych i szczegółowej wiedzy. Z tego też względu istotne jest poznanie genów kodujących białka biorące udział w pobieraniu i transporcie wapnia, a które mogłyby być użyte w selekcji nowych odmian jabłoni, o owocach o wysokiej jędrności i mniej podatnych na wystąpienie gorzkiej plamistości podskórnej. Szczegółowe poznanie biologii molekularnej dojrzewania owoców oraz przemian

fizjologicznych, biochemicznych, i molekularnym, zachodzących w jabłkach w trakcie ich przechowywania oraz po wprowadzeniu do obrotu pozwoliłoby na sterowanie nimi i ograniczenie strat w trakcie przechowywania i dostarczenie konsumentom owoców najwyższej jakości.

WNIOSKI

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Zawartość wapnia w owocach jabłoni obu odmian jest w większym stopniu zależna od czynników genetycznych niż agrotechnicznych. Zawartość składników mineralnych w glebie w niewielkim stopniu wpływa na zawartość wapnia w jabłkach.
2. Owoce odmiany ‘Gala’ cechują się wyższą zawartością wapnia aniżeli odmiany ‘Šampion’ nawet gdy drzewa rosną w glebie o niższej zawartości tego pierwiastka i wyższej kwasowości wymiennej.
3. Akumulacja wapnia jest wyraźnie wyższa w liściach jabłoni niż w owocach.
4. Wyższa aktualna zawartość wody w glebie oraz intensywniejsza transpiracja w fazie szybkiego wzrostu owoców sprzyjają lepszemu odżywieniu liści w wapń, który do pewnego stopnia warunkuje sprawność przebiegu procesu fotosyntezy.
5. Wyższa sprawność aparatu fotosyntetycznego (wyższe: intensywność fotosyntezy, zawartość chlorofilu, wartości parametrów fluorescencji chlorofilu *a*) stwierdzona u odmiany ‘Šampion’ m.in. leży u podstaw wyższego plonowania tej odmiany.
6. Sekwencje nukleotydowe fragmentów genów *MdCaChan1*, *MdCaPom1*, *MdCaPom2* są podobne do wcześniej opisanych sekwencji genów kodujących białka transportujące wapń, co pozwala wnosić, iż geny te również kodują białka transportujące wapń do owoców jabłoni badanych odmian.
7. Ekspresja genów kodujących białka transportujące wapń *MdCaChan1*, *MdCaPom1*, *MdCaPom2* jest u obu badanych odmian wyższa w liściach niż w owocach.
8. Geny kodujące pomocnicze transportery wapniowe (CAX) nie wykazują ekspresji w liściach i owocach odmian ‘Šampion’ i ‘Gala’.
9. Aktywność lipoksygenazy w owocach po zbiorze u obu odmian zależy od stosunku zawartości potasu do wapnia.
10. O jędrność jabłek w pełnej dojrzałości zbiorczej decyduje m.in. wielkość owoców, zawartości magnezu, stosunek K:Ca i Mg:Ca w owocach, przy czym badane odmiany różnią się w tym względzie.
11. W miarę wydłużania czasu przechowywania jabłek ma miejsce wzrost aktywności lipoksygenazy w owocach z jednoczesnym spadkiem ich jędrności.

12. Po przechowywaniu i symulowanym obrocie wzrasta ekspresja genów *MdLOX2* i *MdLOX5*. Jest ona wyższa w jabłkach odmiany ‘Šampion’ niż u odmiany ‘Gala’.
13. Podobieństwo sekwencji nukleotydowych *MdLOX2* i *MdLOX5* do opisanych wcześniej sekwencji genów kodujących lipoksygenazy oraz wzrost ich ekspresji po przechowywaniu i symulowanym obrocie wskazuje na zaangażowanie ich produktów w proces starzenia się owoców.
14. U jabłek, na których występują plamy przypominające gorzką plamistość podskórną powstające po infiltracji do owoców roztworu chlorku magnezowego ma miejsce wzrost aktywności lipoksygenazy, za który odpowiada lipoksygenaza kodowana przez *MdLOX2*.
15. Po infiltracji do jabłek roztworu chlorku magnezowego u odmiany ‘Šampion’ następuje wzrost aktywności lipoksygenazy głównie w skórce owocu natomiast u odmiany ‘Gala’ w miąższu owocu. Plamy przypominające gorzką plamistość podskórną powstają gdy aktywność LOX wzrasta ponad dwukrotnie w skórce odmiany ‘Šampion’ i miąższu odmiany ‘Gala’.

PIŚMIENNICTWO

1. Abbott J.A., Conway W.S., Sams C.E. 1989. Postharvest calcium chloride infiltration affects textural attributes of apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 114: 932-936.
2. Amarante C.V.T., Ernani P.R., Chaves D.V. 2005. Fruit infiltration with magnesium is a feasible way to predict bitter pit susceptibility in ‘Gala’ apples grown in southern Brazil. *Acta Hort.*, 682(2): 1271-1274.
3. Amarante C.V.T., Steffens C.A., Ernani P.R., Argenta L.C. 2012. Assessment of bitter pit risk in ‘Gala’ apples by fruit infiltration with magnesium. *Acta Hort.*, 934: 855-859.
4. Andziak J., Tomala K., Sadowski A., Dziuban R. 2004. Stan odżywienia składnikami mineralnymi i zdolność przechowalnicza jabłek ‘Šampion’ w zależności od podkładki. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 3(2): 179-187.
5. Barber S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. John Wiley and Sons, INC, 415.
6. Ben J.M., Koszorz M. 2005. Effect of rootstock on Ca concentration in different parts of apples. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 4(1): 3-10.
7. Björkman O., Demmig B. 1987 Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at ⁷⁷K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
8. Casero T., Benavides A., Recasens I., Rufa J. 2002. Preharvest calcium sprays and fruit calcium absorption in ‘Golden Delicious’ apples. *Acta Hort.*, 594: 467-473.
9. Chen H.X., Li P.M., Gao H.Y. 2007. Alleviation of photoinhibition by calcium supplement in salt-treated *Rumex* leaves. *Physiol. Plant.*, 129 (2): 386-396.
10. Cheng L., Raba R. 2009. Accumulation of macro- and micronutrients and nitrogen demand-supply relationship of ‘Gala’/‘Malling 26’ apple trees grown in sand culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 134(1): 3-13.
11. Conn S.J., Gilham M., Athman A., Schreiber A.W., Bauman U., Moller I., Cheng N-H., Stancombe M.A., Hirschi K.D., Webb A.A.R., Burton R., Kaiser B.N., Tyerman S.D., Leigh R.A. 2011. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 240-257.
12. Dąbrowska J., Ropek M., Kołton A. 2011. Fluorescencja chlorofilu *a* i jej zastosowanie w ocenie kondycji roślin. VI Krakowska Konferencja Młodych Uczonych. 559-565.
13. De Freitas S.T., Padda M., Wu Q., Park S., Mitcham E. 2011. Dynamic alternations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing *sCAX1*, a constitutively active Ca²⁺/H⁺ antiporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 156(2): 844-855.
14. De Long W.A. 1936. Variations in the chief ash constituents of apples affected with blotchy cork. *Plant Physiol.*, 11: 453-456.

15. Defilippi B.G., Dandekar A.M., Kader A.A. 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 3133-3141.
16. Domínguez T., Hernández M.L., Pennycooke J.C., Jiménez P., Martínez-Rivas J.M., Sanz C., Stockinger E.J., Sánchez-Serrano J.J., Sanmartín M., 2010. Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiol.*, 153: 655-665.
17. Drake M., Bramlage W.J., Baker J.H. 1974. Correlations of calcium content of 'Baldwin' apples with leaf calcium, tree yield and occurrences of physiological disorders and decay. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 99(4): 379-380.
18. Faust M. 1989. *Physiology of temperature zone fruit trees*. John Wiley & Sons New York.
19. Ferguson I.B., Watkins C.B. 1992. Crop load affects mineral concentration and incidence of bitter pit in 'Cox's Orange Pippin' apple fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117: 373-376.
20. Feussner I., Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 275-297.
21. Gianfranceschi L., Soglio V. 2004. The European Project HIDRAS: innovative multidisciplinary approaches to breeding high quality disease resistant apples. *Acta Hort.*, 663: 327-330.
22. Grabov A., Leung J., Giraudat J., Blatt M. 1997. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J.*, 12: 203-213.
23. Hansatech Instrument Ltd. 1996. *An introduction to fluorescence measurements with the plant efficiency analyser (PEA)*. Pentney, Norfolk, England: Hansatech.
24. Himelrick D.G., Walker C.E. 1982. Seasonal trends of calcium, magnesium and potassium factors in apple leaf and fruit tissues. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 107: 1078-1080.
25. Hosann P.H. 2002. Chloride and calcium in Photosystem II: from effects to enigma. *Photosynth. Res.*, 73(1-3): 169-175.
26. Janssen B.J., Thodey K., Schaffer R.J., Alba R., Balakrishnan L., Bishop R., Bowen J.H., Crowhurst R.N., Gleave A.P., Ledger S., McArtney S., Pichler F.B., Snowden K.C., Ward S. 2008. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *Plant Biology*, 8: 16. doi: 10.1186/1471-2229-8-16.
27. Kao W.Y., Tsai T.T. 1998. Tropic leaf movements, photosynthetic gas exchange, leaf $\delta^{13}C$ and chlorophyll fluorescence of three soybean species in response to water availability. *Plant Cell Environ.*, 21: 1055-1082.
28. Lanauskas J., Kviklienė N. 2005. Effect of calcium fertilizer sprays on storage quality of 'Shampion' apples. *Sodininkystė ir Daržininkystė*, 24(2): 20-28.
29. Leone A., Gerardi C., Leo L., Laddomada B., Conti A., Bisson C., Valentini S., Zacheo G. 2003. Analysis of protein expression and the production of aroma compounds during strawberry ripening. *Acta Hort.*, 626: 359-365.
30. Liu B.H., Cheng L., Liang D., Zou Y.J., Ma F.W. 2012a. Growth, gas exchange, water-use efficiency, and carbon isotope composition of 'Gale Gala' apple trees grafted onto 9 wild Chinese rootstock in response to drought stress. *Photosynthetica*, 50(30): 401-410.
31. Liu B.H., Cheng L., Ma F.W., Liang D., Zou Y.J. 2012b. Influence of rootstock on drought response in young 'Gale Gala' apple (*Malus domestica* Borkh.) trees response to drought stress. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 2421-2427.
32. Łysiak G. 2013. The influence of harvest maturity and basic macroelement content in fruit on the incidence of diseases and disorders after storage of the 'Ligol' apple cultivar. *Folia Hort.*, 25(1): 31-39.
33. Mansfield T.A., McAinsh M.R. 1995. Hormones as regulators of water balance. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. Davies P.J. Kluwer, Dordrecht, Netherlands. 598-616.
34. Marcelle R.D. 1989. Ethylene formation, lipoxygenase activity and calcium content in apple cv. Jonagold. *Acta Hort.*, 258: 61-68.
35. Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edn. London: Academic Press.
36. Martinazzo E.G., Ramm A., Bacarin M.A. 2012. The chlorophyll *a* fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of *Prunus persica*. *Braz. J. Plant Physiol.*, 24(4): 237-246.
37. Nachtigall G.R., Dechen A.R. 2006. Seasonality of nutrients in leaves and fruits of apple trees. *Sci. Agric. (Piracicaba Braz.)*. 63(5): 493-501.
38. Nielsen M. 1990. Metoder til bestemmelse af rette plukketidspunkt og lagringsevne for æbler. *Frugtavleren*, 19(9): 268-271.
39. Pacholak E., Zachwieja M., Zydlik Z. 2004. Wpływ nawożenia azotem na zawartość składników mineralnych w glebie, liściach i owocach jabłoni odmiany 'Śampion'. II Ogólnopolskie Sympozjum Mineralnego Odżywienia Roślin Sadowniczych. SGGW Warszawa: 20-21.
40. Park S., Cheng N.H., Pittman J.K., Yoo K.S., Park J., Smith R.H., Hirschi K.D. 2005. Increasing calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing Arabidopsis H^+/Ca^{2+} transporters. *Plant Physiol.*, 139(3): 1194-1206.

41. Perini D., Cova V., Keller-Przybyłkiewicz S., Stankiewicz-Kosyl M., Soglio V., Komjanc M., Gianfranceschi L. 2009. New polymorphic EST-based molecular markers in three *Malus x domestica* (Borkh.) cultivars (Fiesta, Prima, Discovery). *Acta Hort.*, 814: 651-657.
42. Perring M.A., Wilkinson B.G. 1968. Genetic variation in bitter pit and fruit calcium concentrations. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Sci. Hort.*, 109(1): 65-89.
43. Piestrzeniewicz C. 1999. Niektóre czynniki wpływające na przechowywanie jabłek odmiany 'Jonagold' i 'Šampion'. Praca doktorska SGGW, Warszawa.
44. Piestrzeniewicz C., Tomala K. 2001. Suitability of infiltration with magnesium chloride in prognosis storage ability of apples. *Folia Hort.*, 13(2): 103-110.
45. Pilarski J., Tokarz K. 2011. Ekologiczne czynniki fotosyntezy. Fizjologia roślin sadowniczych strefy umiarkowanej. T.I. Red. L.S. Jankiewicz, J. Lipecki. PWN Warszawa: 251-275.
46. Pottosin I.I., Schönknecht G. 2007. Vacuolar calcium channels. *J. Exp. Bot.*, 58: 1559-1569.
47. Rogers B.L., Batjer L.P. 1954. Seasonal trends of six nutrient elements in the flesh of vine sap and 'Delicious' apple fruit. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 63: 67-73.
48. Rogers S.O., Bendich A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.*, 5: 69-76.
49. Sadowski A., Kurowska-Lipniewska M., Ulejczyk M. 1967. Studia nad gorzką plamistością jabłek. II. Występowanie choroby na odmianie Piękna z Boskoop w zależności od niektórych cech indywidualnych jabłek. *Zesz. Nauk. SGGW - Ogrodnictwo*, 4: 55-76.
50. Sadowski A., Szymborska E., Wieczorek A. 1965. Studia nad gorzką plamistością podskórną jabłek. *Zesz. Nauk. SGGW - Ogrodnictwo*, 3: 41-62.
51. Sams C.E., Conway W.S. 1984. Effect of calcium infiltration on ethylene production, respiration rate, soluble polyuronide content, and quality of 'Golden Delicious' apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109: 53-57.
52. Schaffer R.J., Friel E.N., Souleyere E.J.F., Bolitho K., Thodej K., Ledger S., Bowen J.H., Ma J-H., Nain B., Cohen D., Gleave A.P., Crowhurst R.S., Janssen B.J., Yao J-L., Newcomb R.D. 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final tep in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol.*, 144: 1899-1912.
53. Schouten S.P. 1982. Vruchtanalyse en bewaarmogelijkheden. *Groenten Fruit* 37(47): 57.
54. Sharma R.R., Krishna H., Patel V.B., Dahuja A., Singh R. 2006. Fruit calcium content and lipoxygenase activity in relation to albinism disorder in strawberry. *Sci. Hort.*, 107: 150-154.
55. Sharma R.R., Pal R.K., Singh D., Singh J., Dhiman M.R., Rana M.R. 2012. Relationship between storage disorders and fruit calcium content, lipoxygenase activity, and rates of ethylene evolution and respiration in 'Royal Delicious' apple (*Malus x domestica* Borkh.). *J. Hort. Sci. Biotech.*, 87(4): 367-373.
56. Sharma R.R., Singh R. 2008. Fruit nutrient content and LOX activity in relation to the production of malformed and button berries in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Sci. Hort.*, 119: 28-31.
57. Schmidts-Eiberger M., Haefs R., Noga G. 2002. Enhancing biological efficacy and rainfastness of foliar applied calcium chloride solutions by addition of rape seed oil surfactants. *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 165(5): 634-639.
58. Skrzyński J. 2007. Wpływ traktowania inhibitorem działania etylenu na wybrane cechy przechowywanych jabłek. *Rocz. AR Pozn. Ogrodn.*, 41: 377-382.
59. Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. 2004. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiol. Plant.*, 121: 58-65.
60. Soglio V., Costa F., Molthoff J.W., Weemen-Hendriks W.M.J., Schouten H.J., Gianfranceschi L. 2009. Transcription analysis of apple fruit development using cDNA microarrays. *Tree Genet. Genomes*, 5: 685-698.
61. Szot I. 2010. Flower and fruit thinning effects on the development and quality of 'Šampion' apple fruits. *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 18(2): 129-138.
62. Terry N., Huston R.P. 1975. Effects of calcium on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. *Plant Physiol.*, 55: 923-927.
63. Tomala K. 1995. Prognozowanie zdolności przechowalniczej i wyznaczanie terminu zbioru jabłek. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa.
64. Tomala K., Araucz M., Żaczek B. 1989. Growth dynamics and content in McIntosh and Spartan apples. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 20(5-6): 529-537.
65. Tomala K., Sadowski A. 1989. Some factors determining quality and storage ability of 'Spartan' apples. Variation of different characteristics due to the season. *Fruit Sci. Rep.*, 162: 59-66.
66. Tretyń A. 1994. Wapń w komórkach eukariotycznych. PWN, Warszawa.
67. Troufflard S., Mullen W., Larson T.R., Graham I.A., Crozier A., Amtmann A., Armengaud P., 2010. Potassium deficiency induced the biosynthesis of oxylipin and glucosinolates *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 10: 172. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/172>.

68. Viljevac M., Dugali K., Mihaljevi I., Rezicasudar D., Jurkovi Z., Lepedu H. 2013. Chlorophyll content, photosynthetic efficiency and genetic markers in two sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes under drought stress. *Acta Bot. Croat.*, 72 (2): 221-235.
69. White P.J., Broadley M.R. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot.*, 92: 487-511.
70. White P.J., Whiting S.N., Baker A.J.M., Broadley M.R. 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytologist*, 153: 199-211.
71. Wińska-Krysiak M., Łata B. 2006. Changes of Ca²⁺ level and transporter gene expression in apples. *Fruit Growing*, 18(2): 72-77.
72. Wińska-Krysiak M., Łata B. 2010. Influence of lipoxygenase activity on bitter pit occurrence in commercial apple cultivars. *Folia Hort.*, 22(1): 13-18.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

nowe dla wiedzy:

- stwierdzenie, że wzrost aktywności enzymu kodowanego przez *MdLOX2* wpływa na możliwość wystąpienia gorzkiej plamistości podskórnej
- odnotowanie ekspresji genu *MdCaPom1*, który koduje białko Ca-ATP 9 w liściach i owocach *Malus x domestica* odmiany 'Šampion' i 'Gala'.

Wykorzystanie w praktyce:

- Geny *MdCaPom1*, *MdCaPom2* u jabłoni odmiany 'Šampion' i 'Gala' nie mogą (w obszarze sekwencji, która była badana) – natomiast *MdCaChan1* może być przydatny, jako marker selekcyjny związany ze zwiększonym transportem wapnia do owoców i zwiększoną jędrnością jabłek.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo –badawczych (artystycznych)

Kierunki mojej pracy badawczej wynikają z własnych zainteresowań naukowych i wpisują się w tematykę badań jak i przedmiotów akademickich prowadzonych w Samodzielnym Zakładzie Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, SGGW w Warszawie. Można w niej wyróżnić trzy główne nurty badawcze:

- **mechanizmy unikania i odporności na ołów, uruchamiane u roślin w odpowiedzi na obecność tego metalu ciężkiego w środowisku**
- **molekularna identyfikacja grzybów powodujących choroby roślin sadowniczych oraz zbóż**
- **wpływ nawożenia, właściwości odmianowych oraz zmienności warunków w sezonie wegetacyjnym na jakość plonu i kondycję roślin ogrodniczych**

Studia rolnicze na Wydziale Rolniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie rozpoczęłam w 1991 roku, 11 czerwca 1996 roku uzyskałam dyplom magistra inżyniera rolnictwa, specjalność - biotechnologia roślin. Pracę magisterską na temat „Zmiany w zawartości ABA w rozwijających się ziarniakach pszenżyta jarego (*X Triticosecale* Wittmack)

odmiany Gabo” wykonałam pod kierunkiem dr Mieczysława Włodkowskiego w Katedrze Fizjologii Roślin. Praca wyróżniona została w roku akademickim 1995/96 w kategorii prac o wybitnych wartościach wdrożeniowych w konkursie JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego.

1 lipca 1996 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Katedrze Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa (przekształconej w 1997r. w Samodzielny Zakład Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, a w 1999 w Katedrę Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa). Pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Stanisława Waldemara Gawrońskiego w latach 1996-2000 wykonałam pracę doktorską pt. „Ocena na poziomie molekularnym reakcji na stres ołowiem wybranych genotypów roślin z rodziny *Brassicaceae*”. Wyniki przedstawione w pracy wskazują, że tolerancja komórek roślinnych na ołów nie jest wynikiem działania jednego mechanizmu, ale wielu procesów fizjologicznych decydujących łącznie o zwiększonej odporności roślin na ten pierwiastek. Do głównych mechanizmów tolerancji u badanych gorzyc zaliczyć można zmiany w poziomie glutationu (prekursora fitochelatyn), fitochelatyn i metalotionein. Wykazano spadek zawartości glutationu w korzeniach po potraktowaniu roślin jonami Pb, jednocześnie odnotowano w tym organie znaczący wzrost ekspresji genu kodującego syntetazę γ – glutamylcysteinową (*gsh1*), co wskazuje, że glutation był wykorzystywany do syntezy fitochelatyn. Wykazano również, że w łodygach i liściach badanych roślin poziom transkrypty *gsh1* był niższy od transkryptów genów metalotionein *SaMT2bwew* i *BjMT2bwew*. Sugeruje to, że w organach nadziemnych roślin istotną rolę w detoksykacji ołowiu mogą odgrywać metalotioneiny.

Rośliny wykorzystywane w fitoremediacji zanieczyszczonych stanowisk muszą charakteryzować się określonymi cechami: efektywnym pobieraniem i transportem metali ciężkich do części nadziemnych, wytwarzaniem dużej masy oraz łatwą i niskonakładową uprawą. Efektywność akumulacji metali ciężkich wynika z cech genetycznych, a jak wykazały zawarte w pracy wyniki, duże zróżnicowanie występuje nawet pomiędzy zbliżonymi genotypami. Z badanych gorzyc do procesu fitoremediacji jako najlepszą wytypowano *Brassica juncea* linię firmy Phytotech.

W trakcie studiów doktoranckich realizowałam w 1996 roku grant uczelniany pt. „Ekspresja genów metalotionein (MT) u gorzycy jasnej (*Sinapis alba*) pod wpływem metali ciężkich”, a w 1998 roku grant uczelniany (którego byłam kierownikiem) pt. „Molekularne podstawy odporności roślin na metale ciężkie”. Praca nad „Molekularnymi podstawami odporności roślin na metale ciężkie” została wyróżniona przez JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w 1998 roku. Część uzyskanych wyników opublikowałam w artykule w 1998 roku w recenzowanych materiałach z konferencji (Załącznik 5; II E, nr 2), a część zaprezentowałam na I Kongresie

Biotechnologicznym we Wrocławiu (Załącznik 6; I B, nr 4) oraz na warsztatach grupy roboczej COST Action 837 w Lozannie i na Krecie (Załącznik 6; I B, nr 2 i 4).

W roku 2001 uzyskałam fundusze w ramach grantu uczelnianego (finansowanego przez SGGW w Warszawie) na badania dotyczące zmian ekspresji genów białek transportowych metali ciężkich u gorczycy białej (*Sinapis alba* L.) pod wpływem ołowiu. Obiektem badań oprócz *Sinapis alba* L. były również rośliny *Brassica juncea* (L.) odmiany 'Małopolska' i linia firmy Phytotech. Genotypy różniły się pod względem akumulacji ołowiu jak również w ekspresji genów kodujących białka transportujące metale ciężkie. Ekspresja genu kodującego transporter Pb wystąpiła tylko w łodygach roślin linii firmy Phytotech. Poziom transkryptu był wyższy w roślinach traktowanych wyższymi dawkami ołowiu w porównaniu z roślinami traktowanymi niższymi dawkami. Wyniki były prezentowane podczas sesji sprawozdawczej z realizacji grantów (Załącznik 6; I B, nr 9).

Badania dotyczące fitoremediacji obszarów zanieczyszczonych metalami ciężkimi kontynuowałam także po uzyskaniu stopnia doktora. Moje prace koncentrowały się głównie na poznaniu **mechanizmów unikania i odporności na ołów**, jakie wykształciły się u roślin w odpowiedzi na obecność tego metalu w środowisku. Obiektem badań były rośliny z rodziny *Brassicaceae* (Załącznik 5; II D, nr 9 i 10), *Robinia pseudoacacia* (L.) (Załącznik 5; II D, nr 2) oraz *Helianthus annuus* (L.) (Załącznik 5; II A, nr 5). Badane rośliny najwięcej ołowiu akumulowały w korzeniach, następnie łodygach a najmniej w liściach. Traktowanie Pb wpłynęło na wzrost pH pożywki w obrębie korzeni w warunkach uprawy hydroponicznej roślin z rodziny *Brassicaceae* (Załącznik 5; II D, nr 10). Stwierdzone zmiany pH wskazują, że w warunkach stresu rośliny wyraźnie sprawniej zmieniają pH w obrębie strefy korzeniowej niż w przypadku roślin nie traktowanych. Wzrost z pH 4,5 (5,0 lub 5,5) do pH około 6,0 lub powyżej może powodować spowolnienie pobierania ołowiu przez korzenie. Jest to niezmiernie ważne z punktu strategii unikania stresu metali ciężkich. Zgodnie z zaleceniami Komisji Toksykologicznej Rady Sanitarno – Epidemiologicznej przy Głównym Inspektorze Sanitarnym, w celu zmniejszenia skażenia żywności należy utrzymywać kwasowość gleby w przedziale, w którym następuje maksymalne blokowanie ołowiu w glebie (pH 6,5 – 7,2).

W pracy odnotowano również wpływ ołowiu na indukcję ekspresji genu kodującego enzym liazę *O*-acetylserynową. Enzym ten bierze udział w syntezie cysteiny. Ekspresja genu *OAS-TL6* była organospecyficzna i miała miejsce tylko w liściach badanych roślin *Brassica juncea*.

Przydatność robinii akacyjowej do procesów fitoekstrakcji oraz określenie u niej strategii tolerancji w stosunku do jonów ołowiu oceniono w pracy Załącznik 5; II D, nr 2. *Robinia pseudoacacia* (L.) okazała się dobrym kandydatem do fitoremediacji. Do części nadziemnej transportowała od 0,88 do 1,35% pobranego Pb w przeliczeniu na suchą masę roślin, a akumulacji

ołowiu nie towarzyszyły widoczne objawy fitotoksyczności. Efektem tej pracy było wykazanie udziału glutationu w detoksyfikacji jonów ołowiu w korzeniach oraz wpływu światła na zmiany koncentracji glutationu w łodygach i liściach roślin. W korzeniach roślin odnotowano również ekspresję genu kodującego syntazę fitochelatynową, co wskazuje na powstawanie fitochelatyn.

Widocznych objawów fitotoksyczności po traktowaniu ołowiem nie odnotowano również u słonecznika *Helianthus annuus* L. odmiany 'Ogrodowy' (Załącznik 5; II A, nr 5), co więcej zaobserwowano nawet stymulujący efekt niskich dawek ołowiu na wzrost i masę roślin (hormeza). Rośliny transportowały ołów z korzeni do części nadziemnych. Niezależnie od zastosowanej dawki ołowiu, jego akumulacja w całej roślinie była na zbliżonym poziomie (w przeliczeniu na mg Pb kg⁻¹ suchej masy rośliny), aczkolwiek przy wyższych dawkach ołowiu stężenie w łodygach i liściach było wyższe. Zastosowane dawki ołowiu nie wpłynęły istotnie na intensywność fotosyntezy, jednak spowodowały spadek intensywności transpiracji i względnej zawartości wody. Odnotowano także spadki zawartości cysteiny oraz glutationu całkowitego (GSH+GSSG) w korzeniach, a ich wzrost w liściach roślin. Jednocześnie stwierdzono wzrost koncentracji formy utlenionej glutationu (GSSG) zarówno w korzeniach jak i w liściach. Podobnie jak u roślin z rodziny *Brassicace* i robinii, także i w przypadku słonecznika zawartość cysteiny i glutationu zależała więc od badanego organu i dawki ołowiu. Obserwacje te pozwalają przypuszczać, że zmiany zawartości glutationu mogą być spowodowane zarówno syntezą fitochelatyn, jak i niedostępnością cysteiny, prekursora glutationu, ale także koniecznością inaktywacji wolnych rodników powstających podczas stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością ołowiu.

U słonecznika stwierdzono obecność jeszcze jednego mechanizmu tolerancji na ołów, a mianowicie syntezę metalotionein, kodowanych przez gen *HaMT1*. Ekspresję genu *HaMT1* zaobserwowano jedynie w łodygach, przy krótkotrwałym traktowaniu niskimi dawkami ołowiu.

Badania z zakresu fitoremediacji zaowocowały powstaniem pracy doktorskiej, 5 publikacji (Załącznik 5; II A nr 5; II D nr 2, 9-10; II E nr 2) oraz 10 doniesień konferencyjnych (Załącznik 6 I B nr 2-10, 17). W każdym przypadku jestem ich pierwszą i główną autorką. Jedna z publikacji była artykułem przeglądowym (Załącznik 5; II D, nr 9).

Tematyka fitoremediacji była zagadnieniem szczególnie mi bliskim przez cały okres pracy. W obecnym roku otrzymałam propozycję uczestniczenia w planowanym projekcie naukowo-badawczym, w którym zamierzam badać efektywność mikroorganizmów w procesie oczyszczania gleb z substancji szkodliwych, w tym także neutralizacji szkodliwości metali ciężkich. Jak oceniam, zagadnienia te będą moim priorytetem badawczym na najbliższe lata.

Drugi nurt moich badań dotyczy molekularnej identyfikacji grzybów powodujących choroby zbóż oraz roślin sadowniczych

W 2003 roku rozpoczęłam współpracę z dr Ewą Mirzwą-Mróż (Katedra Fitopatologii, SGGW). Współuczestniczyłam w badaniach pt. „Wybrane zagadnienia z biologii grzyba *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter”, które były prowadzone w ramach grantu wewnętrznego na Wydziale Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu. Celem badań było, między innymi, poznanie etiologii septoriozy gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media* L.) chwastu typowego dla zasiewów zbóż w Polsce. Na podstawie morfologii, patogeniczności izolatów grzyba oraz wyników badań molekularnych wykazano, że w warunkach Polski sprawcą septoriozy gwiazdnicy pospolitej nie jest grzyb *M. graminicola*, a *Septoria stellariae* Westend., który nie poraża pszenicy, a chore rośliny nie są źródłem infekcji dla tego zboża. Badania te w Polsce miały charakter nowatorski, a mój udział w nich dotyczył badań molekularnych, analizy i interpretacji wyników (Załącznik 5; II D nr 1).

W 2008 roku kontynuowałam współpracę w zakresie identyfikacji grzybów prowadzoną technikami biologii molekularnej, badając mało znaną chorobę roślin sadowniczych - brudną plamistość jabłek. Badania były finansowane z grantu MNiSW (nr N N310 303834, 2008-2012, „Bрудna plamistość jabłek zagrożeniem dla ekologicznej uprawy jabłoni”), którego byłam głównym wykonawcą.

Efektom tej współpracy była publikacja, w której przedstawiono wyniki dotyczące identyfikacji po raz pierwszy w Polsce sprawcy brudnej plamistości na śliwkach- gatunku *Microcyclosporella mali* (Załącznik 5; IIA nr 1).

Kolejnym obiektem badań był grzyb *Aureobasidium pullulans* (de Bary et Löwenthal) G. Arnaud, zaliczany do tzw. grzybów sadzakowych. W Polsce grzyb ten był często izolowany z jabłek i gruszek z objawami brudnej plamistości (Załącznik 5; IIA nr 2). Całościowe badania obejmujące analizy morfologiczne i posiewy izolatów na różnych podłożach oraz analizę sekwencji nukleotydów pozwoliły na precyzyjną identyfikację gatunku grzyba. Stwierdzono, że objawy przez niego wywoływane w warunkach laboratoryjnych nie były typowe dla pozostałych grzybów sadzakowych, w związku z czym *Aureobasidium pullulans* nie powinien być zaliczany do kompleksu typowych sprawców brudnej plamistości jabłek (Załącznik 5; IIA nr 4). Do bazy GenBank zgłoszono 6 sekwencji nukleotydowych tego grzyba (FJ533153, HQ267769-HQ267773) (Załącznik 5; IID nr 26, 29-33). Były to pierwsze w świecie sekwencje nukleotydowe izolatów *Aureobasidium pullulans* uzyskane z jabłek.

Zidentyfikowano ponadto sprawców brudnej plamistości na owocach jabłoni, grusz i śliw: *Peltaster fructicola*, *Phialophora sessilis*, *Microcyclosporella mali*, *Microcyclospora malicola*, *M. pomicola*, *Peltaster fructicola* i jeden nieoznaczony dotychczas, nowy gatunek z rodzaju

Peltaster. Przy użyciu zarówno metod tradycyjnych jak i technik biologii molekularnej scharakteryzowano łącznie 228 izolatów (189 z jabłek, 29 z gruszek i 10 ze śliwek). W bazie GenBank zamieszczono łącznie 21 sekwencji (2 - *Peltaster* sp., 1 *P. fructicola*, 2 - *P. sessilis*, 12 - *M. mali* [wcześniej *Pseudocercospora* sp.], 2 - *M. malicola*, 2 - *M. pomicola* (Załącznik 5; IID nr 27-28, 34-53). Powyżej przedstawione badania, w Polsce miały nowatorski charakter.

Od 2011 roku z dr Ewą Mirzwą-Mróż, dr Ryszardem Dzięciołem i prof. dr hab. Wojciechem Wakulińskim (Katedra Fitopatologii, SGGW) współuczestniczę w badaniach nad nowym patogenem *Valdensinia heterodoxa* Peyr., sprawcą plamistości liści borówki wysokiej. Silnie porażone krzewy tracą liście, nie zawiązują pąków kwiatowych, co skutkuje spadkiem plonu w następnym sezonie. W Polsce, grzyb został po raz pierwszy odnotowany w 2011 rok na krzewach borówki wysokiej odm. 'Bluecrop' na plantacji zlokalizowanej na terenie województwa mazowieckiego. Identyfikację patogena przeprowadzono przy użyciu tradycyjnych metod oraz techniki PCR (Załącznik 5; IIA nr 3). Sekwencję nukleotydów tego grzyba (KF212190) zdeponowano w bazie GenBank (Załącznik 5; II D nr 54).

Badania z zakresu molekularnej identyfikacji mikroorganizmów zaowocowały powstaniem 5 publikacji, 31 sekwencji nukleotydowych zgłoszonych do bazy GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oraz 8 doniesieniami konferencyjnymi. W większości publikacji byłam ich drugą autorką (Załącznik 5; II A nr 1-4 oraz II D, nr 1, 26-56; Załącznik 6 B I 11, 24, 27, 29, 30, 35, 37, 40, 43). Mój wkład w powstanie poszczególnych publikacji dotyczył współuczestnictwa w wykonaniu badań molekularnych, analizie wyników, a także opracowania końcowego doniesienia i/lub artykułu.

Trzeci nurt moich badań dotyczył wpływu nawożenia, odmiany oraz warunków w sezonie wegetacyjnym na jakość roślin ogrodnich.

W ramach prowadzonych przeze mnie badań z tego obszaru, najwięcej uwagi poświęcałam nawożeniu jabłoni i pomidora różnymi nawozami wapniowymi, oraz wpływowi tego nawożenia na parametry fizjologiczne i biochemiczne, transport wapnia w roślinach i występowanie chorób fizjologicznych: gorzkiej plamistości podskórnej jabłek (GPP) oraz suchej zgnilizny wierzchołkowej pomidora (BER). Badania te zaowocowały opublikowaniem 6 prac, gdzie jestem pierwszym lub jedynym autorem. Badałam także wpływ zróżnicowania odmianowego oraz zmienności sezonowej na zawartość antyoksydantów u jabłek oraz borówki wysokiej. Zajmowałam się również zmianami całkowitej pojemności przeciwutleniającej w jabłkach po ich przechowywaniu w warunkach kontrolowanej atmosfery (5 prac).

W roku 2004 kierowałam projektem pt. „Molekularne i fizjologiczne podstawy odporności pomidora na suchą zgniliznę wierzchołkową”. Celem pracy była ocena plonowania i

występowania suchej zgnilizny wierzchołkowej, w zależności od formy i poziomu nawożenia wapniem, na owocach dwóch odmian pomidora szklarniowego ('Cunero F₁' i 'Geronimo F₁') w uprawie w wełnie mineralnej. Efektem była publikacja, w której wykazano, że plon ogólny i handlowy, masa owoców (wyższy/a u odmiany 'Geronimo F₁') oraz tolerancja pomidora wobec chlorków zależą od badanej odmiany (Załącznik 5; II D nr 14). Z punktu widzenia praktycznego zastosowania w ogrodnictwie stwierdzono, że zastosowanie nawozu wapniowego w formie Ca(NO₃)₂ z 30% dodatkiem CaCl₂ powodowało zwiększenie plonu oraz zmniejszenie występowania BER u badanych odmian pomidorów. Wykazano również wysoce istotną, ujemną korelację między masą owoców a BER.

Uzyskane wyniki skłoniły mnie do sprawdzenia wpływu zróżnicowanego nawożenia wapniem, w podłożu organicznym, włóknie kokosowym, które w przeciwieństwie do wełny mineralnej może zawierać chlorki, jednocześnie jest podłożem, w którym występuje kompleks sorpcyjny a także w pełni biodegradowalny. Efektem pracy była publikacja, w której wykazano, że stosowanie wapnia w dawce 100 mg·dm⁻³ pożywki w postaci Ca(NO₃)₂ wpływa na nasilenie występowania suchej zgnilizny wierzchołkowej (Załącznik 5; II D nr 5). W warunkach przeprowadzanych doświadczeń okazało się że, odmiana 'Salinero F₁' dała wyższe plony i była mniej podatna na suchą zgniliznę wierzchołkową niż odmiana 'Alvaro F₁'. Również sprawność aparatu fotosyntetycznego (F_v/F_m, F_v/F_o, F_m/F_o) była wyższa w przypadku 'Salinero F₁'. Istotne z praktycznego punktu widzenia jest stosowanie formy CaCl₂ w pożywce, powoduje to około dwutygodniowe przyspieszenie kwitnienia, bez- wbrew częstemu przekonaniu- negatywnych konsekwencji dla kondycji roślin w uprawie pod osłonami.

W doświadczeniu badano również wpływ zróżnicowanego nawożenia nawozami wapniowymi na aktywność lipoksygenazy. Wzrost aktywności LOX odnotowano u roślin żywionych Ca w postaci CaCl₂ oraz przy jego niższym poziomie (100 mg Ca·dm⁻³) w pożywce w porównaniu z 200 mg Ca·dm⁻³ w pożywce. Aktywność tego enzymu może być wskaźnikiem stanu odżywienia liści wapniem. Były to pierwsze w świecie badania wpływu stresu wywołanego niedoborem wapnia na aktywnością lipoksygenazy.

W tym samym okresie (lata 2003-2006) byłam wykonawcą projektu pt. "High – quality resistant apples for sustainable agriculture", w ramach Program Unijnego nr kontraktu QLKS-CT-2002-01492. Realizowałam temat "Changes of lipoxygenase activity in differed cultivars apple". Efektem wykonania projektu była publikacja (Załącznik 5; II D nr 4). Materiałem do badań były owoce 8 odmian jabłoni, 4 podatne na występowanie gorzkiej plamistości podskórnej jabłek: 'Šampion', 'Ligoł', 'Musu', 'Cortland' i 4, u których objawy tej choroby nie występują: 'Gala', 'Idared', 'Alwa', 'Gloster'. Owoce były zbierane i analizowane po zbiorach i ponownie po czterech miesiącach przechowywania w chłodni zwykłej. Głównym celem badań było

wyjaśnienie związku między aktywnością LOX i stosunkiem K:Ca oraz występowaniem gorzkiej plamistości podskórnej jabłek podczas przechowywania. Największe różnice pomiędzy badanymi odmianami odnotowano w aktywności LOX i zawartości Ca, a następnie stosunku K:Ca i zawartość potasu. Odmiany, które były odporne i wrażliwe, ale bez objawów gorzkiej plamistości podskórnej jabłek wykazywały wyższą zawartość wapnia w owocach w porównaniu z odmianami z objawami tej choroby. Odmiany te wykazały również niższą aktywności LOX po przechowywaniu. W owocach wykazano ujemną korelację między aktywnością LOX i zawartości Ca oraz dodatnią korelację między aktywnością LOX a stosunkiem K:Ca. W jabłkach odnotowano zróżnicowaną ekspresję genu kodującego lipoksygenazę. Stwierdzono wzrost ekspresji *LOX* w owocach u odmiany ‘Šampion’, ‘Ligol’, ‘Musu’, ‘Cortland’, u których wystąpiły objawy GPP w porównaniu z tymi samymi odmianami, ale bez symptomów choroby.

Uzyskane powyżej wyniki skłoniły mnie do wybrania do dalszych badań odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’. Badania te prowadziłam w ramach grantu towarzyszącego (2004-2006) SPUB „Wysokiej jakości odporne jabłonie dla rolnictwa zrównoważonego” zadania: „Dynamika zmian (na poziomie molekularnym) w akumulacji wapnia u dwóch odmian jabłoni”. Projekt był finansowanym przez Komitet Badań Naukowych i stanowił uzupełnienie badań zaplanowanych w projekcie HiDRAS. Efektem tego projektu były 2 publikacje (*Załącznik 5; II D nr 6 i E nr 1*). Przedstawiono w nich zróżnicowanie zawartości wapnia w poszczególnych organach. Najwyższą zawartość Ca notowano w liściach, niższą w owocach, przy czym zależało to od terminu pobierania prób materiału roślinnego. Po raz pierwszy odnotowano ekspresję genu *MdCaChan* w jabłkach badanych odmian.

Moje kolejne prace badawcze wpisują się w nurt wcześniejszych badań. W roku 2008 rozpoczęłam badania w ramach autorskiego projektu „Molekularne podstawy wybranych mechanizmów różnicujących transport wapnia u jabłoni”. W tym samym roku uzyskałam również finansowanie z Komitetu Badań Naukowych w formie grantu habilitacyjnego NN 310 148935 pt. „Zależność pomiędzy transportem wapnia, aktywnością lipoksygenazy a przechowaniem jabłek odmiany ‘Šampion’ i ‘Gala’”. Badania realizowane były w latach 2008-2011.

Podsumowaniem badań dotyczących zawartości wapnia w roślinach i jego wpływu na jakość owoców była publikacja przeglądowa (*Załącznik 5; II D nr 13*) oraz praca habilitacyjna (*Załącznik 5; I A*). W pracy przeglądowej przedstawiono aspekty roli wapnia w roślinie. Omówiono pobieranie i transport wapnia w obrębie rośliny. Szczególną uwagę poświęcono roli i budowie białek (białka ATP- zależne, kanałowe, transportery pomocnicze) zaangażowanych w ten proces oraz kodujących je genom. Celem pracy habilitacyjnej było natomiast poznanie wybranych, fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych podstaw transportu i akumulacji wapnia oraz aktywności lipoksygenazy, na tle uwarunkowań środowiskowych i agrotechnicznych,

u dwóch ważnych gospodarczo odmian jabłoni ‘Gala’ i ‘Šampion’. Uzyskane w tej pracy efekty zostały szczegółowo opisane w części IV niniejszego opracowania.

Równolegle z tematyką dotyczącą wybranych aspektów zróżnicowanego transportu i akumulacji wapnia w jabłoniach współuczestniczyłam w badaniach związanych z:

- 1) Zróżnicowaniem odmianowym oraz zmiennością sezonową w zawartości antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych u jabłek (*Załącznik 5; II D nr 7*) oraz borówki wysokiej (*Załącznik 5; II D nr 3 i 15*)
- 2) Monitorowaniem zmian całkowitej pojemności przeciwutleniającej oraz jej elementów składowych po przechowywaniu jabłek w kontrolowanej atmosferze, które przeprowadzono na wybranych odmianach jabłek o zróżnicowanej przydatności do długotrwałego przechowywania (*Załącznik 5; II D nr 8*).

W badaniach jabłek wykazano istotny wpływ odmiany na 9 z 12 badanych parametrów (z wyjątkiem zawartości cysteiny, γ -glutamylcysteiny i fenoli). Po długim 7- miesięcznym przechowywaniu odnotowano istotne spadki aktywności większości enzymów antyoksydacyjnych, zawartości glutationu, witaminy C, wartości całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (oznaczonej testem FRAP) oraz wzrost zawartości polifenoli i prekursorów glutationu. Odmiana ‘Šampion’, charakteryzowała się wysoką zawartością związków tiolowych oraz antyoksydantów enzymatycznych, natomiast odmiana ‘Topaz’, cechowała się znaczną zawartością witaminy C, polifenoli i wysokim całkowitym potencjałem antyoksydacyjnym.

W badaniach 6 odmian borówki wysokiej, uprawianych w centralnej Polsce wykazano, że potencjał przeciwutleniający tej rośliny jest warunkowany genetycznie, ale wpływ ten może być modyfikowany czynnikami środowiskowymi (*Załącznik 5; II D nr 15*). Jagody borówki wysokiej są dobrym źródłem związków polifenolowych oraz tiolowych, są natomiast mało zasobne w askorbinian. Udowodniono, że największym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowała się odmiana ‘Earliblue’, a najmniejszym najbardziej popularna w uprawie odmiana ‘Bluecrop’. Najmniejsze wahania sezonowe w stężeniu związków fenolowych, aktywności enzymów oksydacyjnych oraz całkowitej aktywności antyoksydacyjnej, przy jednoczesnej wysokiej wartości tych wskaźników stwierdzono u odmiany ‘Duke’. Wysoka aktywność antyoksydacyjna wiązała się na ogół z wysokim stężeniem flawonoidów lub też sumy naturalnych fenoli. Kontynuując badania nad borówką wysoką (*Załącznik 5; II D nr 3*) wykazano ponadto, że warunki wegetacji w największym stopniu wpłynęły na aktywność reduktazy glutationowej oraz zawartość L-cysteiny i glutationu, a w najmniejszym na stężenia kwasu chlorogenowego oraz (-)-epikatechin należących do naturalnych związków fenolowych, askorbinianu oraz aktywności

katalazy. Wydaje się, że związki te odgrywają istotną rolę w reakcji borówki wysokiej na stres środowiskowy.

Podobne oznaczenia przeprowadzono również dla jarmużu, roślinie warzywnej powszechnie uważanej za szczególnie cenne źródło antyoksydantów, i opublikowano w pracy, której byłam współautorką (Załącznik 5; II D nr 12). Stwierdzono istotne różnice w składzie chemicznym ocenianych odmian jarmużu o zróżnicowanym wybarwieniu liści. Rodzaj gleby różnicował w sposób istotny skład chemiczny roślin, ale wpływ ten zależał od roku badań i najsilniej zaznaczył się w przypadku askorbinianu oraz glutationu.

Badania dotyczące potencjału antyoksydacyjnego zaowocowały powstaniem 5 publikacji oraz 2 doniesieniami konferencyjnymi. We wszystkich publikacjach byłam ich drugą autorką (Załącznik 5; II D, nr 3, 7-8, 12 i 15 oraz Załącznik 6; B I, nr 19 i 36).

Z tematyką nawożenia związane są jeszcze prace: Załącznik 5; II D nr 11, Załącznik 5; II A nr 6 oraz Załącznik 5; II D nr 16-25.

Pierwsza z nich, powstała we współpracy z dr Ewą Mirzwą-Mróż (Katedra Fitopatologii, SGGW), miała charakter aplikacyjny i dotyczyła wpływu nawożenia dolistnego preparatami handlowymi Wuxal® Zn, Wuxal® Cu, Wuxal® Mn oraz solami technicznymi ZnSO₄·7 H₂O, CuSO₄·5 H₂O, MnSO₄·H₂O) na porażenie przez *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary oraz na wybrane parametry gospodarki wodnej pomidora (Załącznik 5; II D nr 11). Wuxal® Zn i MnSO₄·H₂O w znacznym stopniu (odpowiednio o 71,2% i 59%) ograniczały rozwój tego patogena na liściach, przy czym zaobserwowano też różnice w podatności odmian na porażenie: w przypadku 'Geronimo F₁' porażenie (10,7% powierzchni liści) było istotnie mniejsze w porównaniu z odmianą 'Cunero F₁' (12,6% powierzchni liści). Nawożenie dolistne pomidora badanymi nawozami nie wpłynęło natomiast na zmniejszenie uszkodzeń błon komórkowych, jakkolwiek siarczan miedzi istotnie (o 9,3%) zwiększył względną zawartość wody w liściach pomidora.

W badaniach tych byłam inicjatorem tematu, jestem pierwszym autorem powstałej publikacji.

Od 2011 roku prowadzę, we współpracy z prof. dr hab. Iwoną Kowalską, badania nad wpływem mikoryzy i zawartości fosforu w pożywce na stan odżywienia roślin pomidora z uwzględnieniem genetycznej regulacji transportu fosforu. Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt NN 310 725040, w którym byłam głównym wykonawcą. Efektem współpracy jest publikacja (Załącznik 5; II A nr 6) oraz 4 doniesienia konferencyjne (Załącznik 6; B I, nr 32-33, 38 i 42).

Badania wykazały, że poziom fosforu w pożywce, rodzaj podłoża i faza wzrostu miały wpływ na zawartość fosforu, żelaza, boru, miedzi w korzeniach oraz fosforu w liściach pomidora.

Zawartość fosforu w korzeniach roślin uprawianych w pożywce z zawartością tego składnika trzykrotnie niższą niż zalecana dla pomidora była istotnie niższa. Jednak w tych samych roślinach geny białek transportujących fosfor, *LePT1*, *LePT2*, *LePT3* ulegały ekspresji na poziomie wyższym wpływając na zaopatrzenia w fosfor. Faza wzrostu roślin miała istotny wpływ na skład mineralny korzeni oraz zawartość P w liściach pomidorów. Zawartość makro- i mikroelementów w korzeniach roślin oraz ekspresja genów *LePT2*, *LePT3* były wyższe w roślinach uprawianych w wełnie mineralnej niż we włóknie kokosowym. Może to świadczyć o zaangażowaniu białek kodowanych przez te geny w proces pobierania fosforu z pożywki.

Mój wkład w powstanie powyższej publikacji dotyczył wykonania badań molekularnych, analizy wyników a także przygotowaniu maszynopisu.

Grant NN 310 725040 został zakończony w listopadzie 2014 roku. Obecnie powstają kolejne prace naukowe w oparciu o uzyskane wyniki.

Podsumowaniem zarówno zainteresowań badawczych, oraz działalności dydaktycznej, dotyczących w znacznej mierze wpływu nawożenia, odmiany oraz warunków agroekologicznych w sezonie wegetacyjnym na jakość roślin ogrodniczych, były opracowania rozdziałów w 2 książkach (*Załączniki 5; II D nr 16-25*).

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

a) nowe dla wiedzy:

- aktywność lipoksygenazy może być wskaźnikiem stanu odżywienia liści w wapń
- ocenienie szeregu czynników egzo- i endogennych determinujących jakość prozdrowotną badanych warzyw i owoców oraz ich potencjalne znaczenie jako metabolitów stresu u roślin
- identyfikacja czynników sprawczych choroby brudnej plamistości jabłek na gruszkach (*Phialophora sessilis*, *Microcyclosporella mali*, *Microcyclospora malicola* i *Microcyclospora pomicola*)

b) nowatorskie w Polsce

- udokumentowanie, że grzyb *Mycosphaerella graminicola* nie poraża gwiazdnicy pospolitej, i że roślina ta nie jest źródłem infekcji dla zasiewów pszenicy w Polsce
- identyfikacja trzech sprawców brudnej plamistości jabłek: *Microcyclosporella mali*, *Microcyclospora malicola* i *Microcyclospora pomicola*, śliw: *M. mali*
- molekularna charakterystyka grzybów powodujących brudną plamistość jabłek, ustalenie i zdeponowanie w Baku Genów sekwencji nukleotydowych sprawców choroby
- identyfikacja grzyba *Aureobasidium pullulans* uzyskanych z jabłek i gruszek

- identyfikacja grzyba *Valdensinia heterodoxa* - nowego patogena borówki wysokiej powodującego plamistość liści tej rośliny.

Wykorzystanie w praktyce:

- zastosowanie nawozu wapniowego w formie $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ z 30% dodatkiem CaCl_2 zwiększa plon oraz zmniejsza występowania BER u pomidora
- stosowanie formy CaCl_2 w pożywce, powoduje około dwutygodniowe przyśpieszenie kwitnienia, bez negatywnych konsekwencji dla kondycji roślin w uprawie pod osłonami
- Uzyskane wyniki dotyczące etiologii i epidemiologii chorób zbóż i roślin sadowniczych oraz biologii ich sprawców mogą być pomocne w opracowywaniu programów ochrony tych roślin.

Sumaryczne zestawienie dorobku

Mój dorobek naukowy obejmuje 112 pozycji, w tym monografię - rozprawę habilitacyjną. Po otrzymaniu stopnia doktora opublikowałam 106 prac. Spośród wymienionych, 32 to oryginalne artykuły naukowe, w tym 11 w języku angielskim (sześć z nich znajduje się w bazie Journal Citation Reports (JCR)). Jestem autorką 10 rozdziałów w monografii i współautorką 1 skryptu. Na konferencjach i seminariach przedstawiłam 45 doniesień (7 komunikatów, 25 posterów, 13 referatów, w tym 4 zamawiane), z czego 5 przed uzyskaniem stopnia doktora. Na mój dorobek naukowy składają się również artykuł popularnonaukowy, dwa artykuły w materiałach pokonferencyjnych oraz 31 sekwencji nukleotydowych zgłoszonych i opublikowanych w Bazie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). W przypadku 54 pozycji składających się na mój dorobek publikacyjny, występuję jako pierwszy lub jedyny autor (Tab. 1). Większość oryginalnych prac badawczych oraz materiały z konferencji publikowane były w języku angielskim w takich czasopismach jak: *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, *Journal of Elementology*, *Acta Physiologiae Plantarum*, *Folia Horticulturae*, *Plant Disease*, *Phytopathologia Polonica* (obecnie *Phytopathologia*), *Annals of Warsaw University of Life Science–SGGW Horticulture and Landscape Architecture*. Artykuły w języku polskim opublikowano w takich czasopismach jak: *Acta Agrophysica*, *Biotechnologia*, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu seria Ogrodnictwo*.

Przyjmując rok opublikowania oraz system punktowy wg MNiSW jako kryterium oceny, mój dorobek naukowy można wycenić na 277 punktów. Łączna dostępna liczba cytowań to 37. Liczbę cytowań wg Publish or Perish 4.0 oszacowałam na 22, a Indeks Hirscha wynosi 3, w bazie Web of Science znajdują się odpowiednio 4 cytowania, Indeks Hirscha wynosi 2. Sumaryczny Impact

Factor dla wszystkich publikacji wynosi 7,392, na osiągnięcie naukowe przypada 20 punktów (dzieło opublikowane w całości).

Pełny wykaz prac zamieściłam w załączniku nr 5 oraz nr 6.

Tabela 1. Zestawienie dorobku publikacyjnego wg kolejności autorów

Dorobek naukowy	Jako pierwszy autor	Jako drugi autor	Jako trzeci lub dalszy autor	Razem
Czasopisma z listy JCR	2	3	1	6
Inne czasopisma anglojęzyczne	3	2		5
Czasopisma polskojęzyczne	5	2		7
Rozdziały w monografiach w języku angielski	1	2		3
Monografia w języku polskim (dzieło)	1			1
Rozdziały w monografiach w języku polskim	10			10
Łącznie publikacje oryginalne	22	9	1	32
Skrypty			1	1
Inne artykuły	2			2
Artykuły popularno-naukowe i popularyzatorskie	1			1
Referaty i postery na konferencjach międzynarodowych	9	10		19
Referaty i postery na konferencjach krajowych i seminariach wygłoszonych poza jednostką macierzystą	20	5	1	26
Sekwencje nukleotydowe opublikowane w internecie		29	2	31
Zestawienie łącznie	54	53	5	112

Podczas pracy naukowej **kierowałam** jednym projektem (habilitacyjnym) finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz byłam **głównym wykonawcą** w trzech innych projektach badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, byłam **wykonawcą** w dwóch projektach współfinansowanych przez Unię Europejską. Pełniłam funkcję **kierownika** czterech projektów oraz byłam **wykonawcą** jednego projektu wewnętrznego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (*Załącznik nr 5; I*).

Wykonałam **recenzje**: 8 artykułów w czasopismach międzynarodowych i krajowych, 2 projektów naukowych - uczelnianych kierowanych do młodych pracowników naukowo-dydaktycznych i doktorantów (SGGW, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu w Warszawie) oraz 45 prac magisterskich i 10 inżynierskich.

Odbyłam też 4 staże zawodowe oraz liczne **szkolenia**.

Zostałam trzykrotnie wyróżniona przez JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za działalność naukowo-badawczą.

Przez cały okres mojej pracy akademickiej prowadzę **zajęcia dydaktyczne**, głównie **ćwiczenia laboratoryjne** z: uprawy i nawożenia roślin ogrodniczych, bilansu składników mineralnych i diagnostyki stanu odżywienia roślin oraz konwersatorium ze statystyki i doświadczalnictwa dla studentów różnych wydziałów oraz kierunków, a od 2003 roku również **wykłady** z uprawy roli i nawożenia roślin ogrodniczych, uprawy roślin rolniczych, bilansu składników mineralnych i diagnostyki stanu odżywienia roślin (do których opracowałam **programy dydaktyczne**) oraz fitoremediacji. Byłam **promotorem** 12 prac dyplomowych ukończonych na Wydziale Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Wydziale Rolnictwa i Biologii oraz Międzywydziałowym Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Jako **popularyzator nauki** opublikowałam również artykuł popularno-naukowy. Upowszechniałam wiedzę z gleboznawstwa i nawożenia roślin w Warszawskiej Szkole Bonsai, dla zorganizowanych grup młodzieży licealnej (w ramach Dni SGGW) oraz wśród uczniów (edukacja wczesnoszkolna) Szkoły Podstawowej z Oddziałami Integracyjnymi. Przeprowadziłam szkolenie z zakresu pracy metodami biologii molekularnej.

Pełniłam i /lub pełnię liczne funkcje organizacyjne.

Szczegółowe zestawienie moich osiągnięć, w tym dydaktycznych i organizacyjnych, znajduje się w załącznikach nr 5 i 6.

08.03.2015

data

M Wińska-Krysiak

podpis habilitanta