

*Załącznik 3*

**AUTOREFERAT**

**Dr Alexander Betekhtin**

**Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin  
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Wydział Nauk Przyrodniczych,**

**Uniwersytet Śląski w Katowicach**

**KATOWICE 2020**

### **1. Imię i nazwisko.**

**Alexander Betekhtin**

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

**Doktor nauk biologicznych** – nadany przez Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska (2013).

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Brachypodium genome evolution studied by comparative chromosome painting*; promotor: prof. dr hab. Robert Hasterok. Recenzenci w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Barbara Naganowska oraz prof. dr hab. Andrzej Joachimiak

**Magister fizjologii roślin i biotechnologii** – nadany przez Kazański Uniwersytet Państwowy, Kazań, Rosja, obecnie Kazański Uniwersytet Federalny, Kazań, Rosja (2008).

Tytuł pracy magisterskiej: *Differentiation and dedifferentiation in morphogenic calli of Tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.)*; promotor: dr Natalia Rumyantseva.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

01.01.2014 – obecnie                      Adiunkt; Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk, Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach (dawniej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska).

1.11.2013 – 31.12.2013                      Asystent; Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

### **4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy:**

**tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

***Zróżnicowanie potencjału embriogennego i jego molekularne uwarunkowania na przykładzie kalusa *Brachypodium distachyon* i *Fagopyrum tataricum****

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl pięciu prac, których sumaryczny **IF wynosi 16,148**;  
łączna wartość **punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 240**.

\*autor korespondencyjny

**P1: BETEKHTIN A\***, ROJEK M, MILEWSKA-HENDEL A, GAWECKI R, KAR CZ J, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2016) Spatial distribution of selected chemical cell wall components in embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. PLoS One 11: e0167426, DOI: 10.1371/journal.pone.0167426

IF<sub>2016</sub> = 2,806 / MNiSW<sub>2016</sub> = 40

**P2: BETEKHTIN A\***, ROJEK M, JASKOWIAK J, MILEWSKA-HENDEL A, KWASNIEWSKA J, KOSTYUKOVA J, KURCZYNSKA E, RUMYANTSEVA N, HASTEROK R (2017) Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. PLoS One 12: e0173537, DOI: 10.1371/journal.pone.0173537

IF<sub>2017</sub> = 2,776 / MNiSW<sub>2017</sub> = 40

**P3: BETEKHTIN A\***, ROJEK M, NOWAK K, PINSKI A, MILEWSKA-HENDEL A, KURCZYNSKA E, DOONAN JH, HASTEROK R (2018) Cell wall epitopes and endoploidy as reporters of embryogenic potential in *Brachypodium distachyon* callus culture. International Journal of Molecular Sciences 19: 3811, DOI 10.3390/ijms19123811

IF<sub>2018</sub> = 4,183 / MNiSW<sub>2018</sub> = 30

**P4: BETEKHTIN A\***, MILEWSKA-HENDEL A, CHAJEC L, ROJEK M, NOWAK K, KWASNIEWSKA J, WOLNY E, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2018) 5-azacitidine induces cell death in a tissue culture of *Brachypodium distachyon*. International Journal of Molecular Sciences 19: 1806, DOI 10.3390/ijms19061806

IF<sub>2019</sub> = 4,183 / MNiSW<sub>2018</sub> = 30

**P5: BETEKHTIN A\***, PINSKI A, MILEWSKA-HENDEL A, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2019) Stability and instability processes in the calli of *Fagopyrum tataricum* that have different morphogenic potentials. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 137: 343-357, DOI: 10.3390/ijms19123811

IF<sub>2019</sub> = 2,2 / MNiSW<sub>2019</sub> = 100

## **Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Embriogeneza somatyczna, zaliczana do form rozmnażania wegetatywnego, to specyficzne dla roślin formowanie zarodków z komórek somatycznych w odpowiedzi na sygnały egzogenne i / lub endogenne *in vivo* lub *in vivo* (Malepszy, 2009 , Winkelmann, 2016). Szczególnie często wykorzystywany do uzyskiwania zarodków somatycznych, jest kalus, który jako eksplantat, jest doskonałym obiektem badawczym do analizy procesów morfogenetycznych zachodzących w warunkach *in vitro* i prowadzących do tworzenia zarodków somatycznych. Wykorzystanie hodowli kalusa do indukcji i rozwoju zarodków somatycznych stanowi dogodny model pozwalający badać mechanizmy regulujące proces embriogenezy, w tym zygotycznej (De Smet *i inni*, 2010, Wang *i inni*, 2010, Terletsкая *i inni*, 2013). Wykorzystanie kultur kalusa jako eksplantatu do pozyskiwania zarodków somatycznych ma jednak pewne ograniczenia wynikające z wpływu stresu, który jest niezbędny do indukcji kalusa oraz zmian szeregu cech morfologicznych, biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych uzyskanych regenerantów, spowodowanych zmiennością somaklonalną (Freitag *i inni*, 1989, Wang i Wang, 2012, Weckx *i inni*, 2019). W tym przypadku dużą rolę odgrywa zarówno zmienność genomu roślinnego podczas tworzenia kalusa *in vitro*, jak i heterogeniczność hodowanych komórek, co wiąże się głównie z określonymi cechami epigenetycznymi eksplantatu (Smulders i Klerk, 2011, Bobadilla Landey *i inni*, 2015).

Przejście komórek ze stanu zróżnicowanego do odróżnicowanego i podziałów komórkowych spowodowane jest zmianą aktywności genów. U roślin dwuliściennych proces represji i derepresji genów *in vitro*, który leży u podstaw odróżnicowania, jest łatwiejszy do uzyskania niż u roślin jednoliściennych. Najlepszymi eksplantatami do hodowli kalusa są te, które zawierają słabo zróżnicowane komórki, na przykład, niedojrzałe zarodki zygotyczne. Warto podkreślić, że zastosowanie inżynierii genetycznej w celu uzyskania cennych form hodowlanych roślin jednoliściennych okazało się bardziej problematyczne niż w przypadku roślin dwuliściennych (Torres, 1989). Na przykład kultura jęczmienia *in vitro* szybko traci zdolność do regeneracji lub rozwijają się rośliny albinotyczne (Wan i Lemaux, 1994). Z powodu wysokiej specjalizacji komórkowej, wiele roślin jednoliściennych zatraciło zdolność do rozmnażania wegetatywnego (Hofmann, 2016).

Dynamiczna reorganizacja czasowo-przestrzenna struktury ściany komórkowej jest niezbędna podczas somatycznej embriogenezy (Seifert i Blaukopf, 2010). Komórki embriogenne kalusa różnią się znacznie od komórek nieembriogennych w kilku znaczących

aspektach strukturalnych i biochemicznych, takich jak rozmiar komórki, charakterystyczna ultrastruktura, zdolność do syntezy określonych białek i składników ściany komórkowej (Šamaj *i inni*, 2006, Yang i Zhang, 2010b). Modyfikacje te są zwykle związane z degradacją, odkładaniem i syntezą nowych makrocząsteczek, takich jak hemicelulozy, białka arabinogalaktanowe (*ang. AGP; arabinogalactan proteins*) i pektyny (Kurczynska *i inni*, 2012a). AGP są makrocząsteczkami specyficznymi dla roślin, które należą do podrodziny glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę (*ang. HRGP; hydroxyproline-rich glycoproteins*). AGP mogą funkcjonować jako cząsteczki sygnałowe i regulować różnicowanie komórek, a także rozwój organów wegetatywnych i generatywnych (Showalter, 2001, Ellis *i inni*, 2010). Z kolei pektyny są kwaśnymi polisacharydami i stanowią główną klasę cząsteczek strukturalnych pierwotnych ścian komórkowych w roślinach lądowych i są odpowiedzialne za określenie ich właściwości mechanicznych (Harholt *i inni*, 2010). Wykazano, że zarówno AGP, jak i pektyny odgrywają kluczową rolę w regulacji inicjacji somatycznej embriogenezy i dalszego rozwoju zarodków somatycznych. Sugeruje się, że mogą być one związane z adhezją komórek, sygnalizacją międzykomórkową i rozpoznawaniem się komórek (Toonen *i inni*, 1997, Šamaj *i inni*, 2006). Ponadto te dwie kategorie polisacharydów ściany komórkowej są wykrywalne w matriks zewnątrzkomórkowej (*ang. ECMSN; the extracellular matrix surface network*), charakterystycznej dla embriogenezy somatycznej (Chapman *i inni*, 2000, Šamaj *i inni*, 2006). Rola tej zewnątrzkomórkowej sieci jest wciąż badana, ale sugeruje się, że uczestniczy ona w adhezji komórek, sygnalizacji komórkowej oraz w regulacji i koordynacji rozwoju zarodków somatycznych (Popielarska-Konieczna *i inni*, 2008). Hemicelulozy są polisacharydami składającymi się z różnych monosacharydów, takich jak glukoza, galaktoza mannozowa, arabinoza i ksyloza, które wraz z celulozą stanowią główny składnik ściany komórkowej roślin. Podstawową funkcją hemiceluloz jest utrzymanie struktury ściany komórkowej i regulacja wzrostu komórek (Chen, 2014).

W badaniach wykorzystałem dwa gatunki: modelową roślinę jednoliścienną *Brachypodium distachyon* (kłosownica dwukłoskowa) oraz przedstawiciela roślin dwuliściennych, jakim jest *Fagopyrum tataricum* (gryka tatarska). Wybór tych obiektów podyktowany był możliwością badania procesów pojawienia się oraz utraty potencjału embriogenego w kalusie, co z punktu widzenia nauk podstawowych i aplikacyjnych ma istotne znaczenie. *B. distachyon* charakteryzuje się bardzo szybkim starzeniem kultury i już po 90 dniach jej trwania całkowicie traci swój potencjał embriogeny. Mocno to kontrastuje z sytuacją obserwowaną u *F. tataricum*, która jest rośliną charakteryzującą się wyjątkową

stabilnością w warunkach *in vitro* – kultury tego gatunku są stabilne i nie tracą potencjału embriogenego nawet po 10 latach od momentu otrzymania kalusa morfogenego.

*B. distachyon* należy do rodziny Poaceae, podrodziny Pooideae i jest dzikim gatunkiem jednorocznej trawy, charakteryzującym się dość szerokim zasięgiem występowania. Chociaż jego naturalne siedliska zasadniczo występują w basenie Morza Śródziemnego, na Bliskim Wschodzie, w południowo-zachodniej Azji i północno-wschodniej Afryce, w wyniku działalności człowieka gatunek ten został zawleczony do Ameryki Północnej i Południowej, Australii i Europy Zachodniej (Garvin *i inni*, 2008). *B. distachyon* jest blisko spokrewniony z wieloma kluczowymi zbożami strefy klimatu umiarkowanego, takimi jak pszenica, jęczmień, żyto i owies, a także z ważnymi pod względem gospodarczym trawami pastewnymi. Ma wiele przydatnych cech biologicznych, takich jak niewielki genom jądrowy, krótki cykl życiowy, zdolność do samozapylenia i proste wymagania troficzne, co czyni ten gatunek doskonałym systemem modelowym w badaniach mających na celu lepsze zrozumienie biologii traw, a także ulepszanie właściwości użytkowych roślin uprawnych (IBI, 2010, Catalan *i inni*, 2014).

*F. tataricum* należy do rodzaju *Fagopyrum* (rodzina Polygonaceae). Rodzaj ten obejmuje 26 gatunków jednorocznych i wieloletnich występujących głównie na wyżynach Eurazji (Zhang *i inni*, 2015). Spośród nich szeroko uprawiane są tylko dwa gatunki: gryka zwyczajna (*F. esculentum*) i gryka tatarska (*F. tataricum*) (Zhou *i inni*, 2018). Pierwszy z nich jest powszechnie uprawiany i wykorzystywany w celach spożywczych w Polsce (Zarzecka *i inni*, 2014). Organizacja Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) zalicza grykę zwyczajną do zbóż. Jednak, w porównaniu do zbóż należących do rodziny traw, zawartość białka w kaszy gryczanej jest wyższa a nasiona gryki zwyczajnej pozbawione są glutenu (Syta *i inni*, 2018). Co więcej, obfitują one w różne związki fenolowe, w szczególności rutynę, kwercetynę i C-glikozyloflawony takie jak orientyna, izoorientyna i witeksyna, które mają cenne właściwości terapeutyczne i dietetyczne. W porównaniu do *F. esculentum*, *F. tataricum* zawiera więcej związków fenolowych nie tylko w każdym organie, ale także na różnych etapach rozwoju rośliny (Gupta *i inni*, 2011). Nasiona *F. tataricum* zawierają wielokrotnie większą ilość rutyny (0,8-1,7% suchej masy), niż *F. esculentum* (0,01%). Z punktu widzenia rozwoju roślin flawonoidy obniżają stres wywołany zmianami środowiska, na przykład poprzez ochronę przed promieniowaniem UV-B, aktywność przeciwutleniającą i warunkowanie odporności na choroby (Suzuki *i inni*, 2015). U *F. tataricum* wysoki poziom rutyny i rutynozydazy powoduje silną gorycz nasion, która może skutecznie je chronić przed zjadaniem przez zwierzęta. Produkcja rutyny z kultur *in vitro* gryki może być obiecująca z użytkowego punktu widzenia.

Głównym przedmiotem moich zainteresowań naukowych było przeanalizowanie procesów utrzymania oraz utraty potencjału embriogenego w kulturach *B. distachyon* oraz *F. tataricum*. Szczegółowa problematyka naukowa obejmowała następujące aspekty badawcze: (i) charakterystykę reorganizacji komponentów ściany komórkowej w kulturach embriogenych i nieembriogenych (**publikacje P1 i P2**) oraz (ii) poznanie molekularnych mechanizmów utraty potencjału embriogenego (**publikacje P3, P4 i P5**). Uzyskane wyniki są nowe dla tej grupy roślin, a dodatkowo mogą stanowić bazę do dalszych badań cennych w różnych obszarach nauk podstawowych i aplikacyjnych.

Zmieniające się warunki klimatyczne i kurczące się zasoby naturalne stanowią jedno z najważniejszych wyzwań stojących obecnie przed ludzkością. Uprawa ograniczonej liczby gatunków roślin zwiększa ich podatność na negatywne efekty zmian klimatycznych, dlatego też tak ważne jest zwiększenie dywersyfikacji uprawianych gatunków. Zanim jednak potencjał takich roślin, zarówno modelowych, jak i uprawnych zostanie w pełni wykorzystany, niezbędne jest prowadzenie wielokierunkowych badań mających na celu poznanie różnych kluczowych aspektów ich szeroko rozumianej biologii.

**P1: BETEKHTIN A, ROJEK M, MILEWSKA-HENDEL A, GAWECKI R, KARCZ J, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2016) Spatial distribution of selected chemical cell wall components in embryogenic callus of *Brachypodium distachyon*. PLoS One 11: e0167426, DOI: 10.1371/journal.pone.0167426**

Badania realizowano w ramach projektu HARMONIA pt. „CDKG/Ph1: czy istnieje uniwersalny mechanizm regulujący stabilność genomu u traw?”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) - projekt we współpracy międzynarodowej 2014/14/M/NZ2/00519 (2015-2019). Projekt kierowany był przez prof. dr. hab. Roberta Hasteroka. Byłem głównym wykonawcą w tym projekcie.

**Badania podjęto, aby odpowiedzieć na intrygujące pytanie dotyczące składu chemicznego komórek kalusa i ustalić, czy ECMSN (*ang. the extracellular matrix surface network*) jest obecna w kalusie *B. distachyon* i czy jest powiązana z procesem somatycznej embriogenezy. W badaniach wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (SEM), różne techniki mikroskopii świetlnej oraz techniki histologiczne i immunocytochemiczne celem przeanalizowania rozmieszczenia wybranych epitopów pektyn, AGP, ekstensyn i**

## **hemiceluloz w ścianach komórkowych, wewnętrznych przedziałach komórkowych i na powierzchni kalusa.**

U roślin jednoliściennych jedynie komórki merystematyczne mają potencjał do wytworzenia kalusa embriogenego. Chociaż kalus u traw można uzyskać z zarodków, hipokotyli, wierzchołka korzenia i łodygi, segmentów młodych liści i młodych kwiatostanów, skuteczna regeneracja roślin jest zasadniczo ograniczona do kalusa indukowanego z młodych zarodków i młodych kwiatostanów (Šamaj *i inni*, 1995, Šamaj *i inni*, 2006). Kalus embriogeny musi zawierać komórki embriogenne. Według Verdeil *i inni* (2007) komórki embriogenne *Cocos nucifera* są fizycznie izolowane od innych grubymi ścianami komórkowymi. Charakteryzują się obecnością jądra z jednym jąderkiem, a większość chromatyny w nich zawartej jest zorganizowana w postaci euchromatyny. Co więcej, komórki embriogenne charakteryzują się obecnością ECMSN na powierzchni kalusa embriogenego i całkowitym jej brakiem na powierzchni kalusa nieembriogenego. Obecność ECMSN wykazano dla wielu gatunków dwuliściennych, takich jak *Drosera rotundifolia* (Šamaj *i inni*, 1995), *Papaver somniferum* (Ovečka i Bobák, 1999), *Fagopyrum tataricum* (Rumyantseva *i inni*, 2003) i *Actinidia deliciosa* (Popielarska-Konieczna *i inni*, 2010). W jednym przypadku, obecność ECMSN zaobserwowano także na powierzchni kalusa niemorfogenego u *Helianthus tuberosus*, który otrzymany został z różnych rodzajów eksplantatów (Pilarska *i inni*, 2013). Autorzy postawili hipotezę, że tworzenie sieci pozakomórkowej może być związane z reakcją na stres i ochroną przed czynnikami zewnętrznymi specyficznymi dla warunków hodowli. W przypadku roślin jednoliściennych obecność ECMSN wykazano na powierzchni kalusa morfogenego *Zea mays* (Šamaj *i inni*, 1995) i *Oryza sativa* (Mohd Din *i inni*, 2016) oraz w zawieszynie komórkowej *Panicum virgatum* (Mazarei *i inni*, 2011). Chociaż skład chemiczny ECMSN może się znacząco różnić między roślinami jednoliściennymi i dwuliściennymi, szczegółowe badania nad białkowymi składnikami ECMSN podczas kalo- i embriogenezy u roślin jednoliściennych są wciąż bardzo rzadkie.

Przeprowadzone badania **po raz pierwszy wykazały**, że AGP i pektyny są składnikami ECMSN w kalusie embriogenym *B. distachyon*. Stwierdzono, że głównym składnikiem ściany komórkowej komórek kalusa embriogenego tej rośliny są epitopy AGP, rozpoznawane przez przeciwciała JIM16 i LM2 oraz epitop ekstensyn rozpoznawany przez przeciwciało JIM11 i epitop pektyn rozpoznawany przez przeciwciało LM6. **Potencjalnie znaczenie praktyczne** uzyskanych wyników polega na fakcie, że przeprowadzone analizy składu



chemicznego ściany komórkowej w *B. distachyon* wykazały obecność związków podobnych do tych, które występują u ważnych gatunków traw pastewnych i bioenergetycznych (Rancour i inni, 2012). **Warto podkreślić**, że embriogeny kalus *B. distachyon* stanowi dobry system modelowy do poznania funkcji HRGP i pektyn podczas tworzenia kalusa embriogenego i embriogenezy somatycznej u traw.

#### **Główne osiągnięcia:**

- **Ujawnienie, że charakterystycznymi składnikami ściany komórkowej embriogenych kalusów *B. distachyon* są epitopy AGP, które są rozpoznawane przez przeciwciała JIM16 i LM2, epitop ekstensyn rozpoznawany przez przeciwciało JIM11 oraz epitop pektyn rozpoznawany przez przeciwciało LM6**
- **Wykazanie, że komórki embriogenne kalusa *B. distachyon* zawierają na swej powierzchni ECSMN zbudowaną z AGP, które są rozpoznawane przez przeciwciało LM2 oraz pektyn, które są rozpoznawane przez przeciwciało LM19**

**P2: BETEKHTIN A, ROJEK M, JASKOWIAK J, MILEWSKA-HENDEL A, KWASNIEWSKA J, KOSTYUKOVA J, KURCZYNSKA E, RUMYANTSEVA N, HASTEROK R (2017) Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. PLoS One 12: e0173537, DOI: 10.1371/journal.pone.0173537**

Badania realizowano w ramach współpracy międzynarodowej z z dr Natalią Rumuantsewą z Kazańskiego Instytutu Biochemii i Biofizyki, Kazańskiego Centrum Naukowego Rosyjskiej Akademii Nauk.

**Celem badań była analiza porównawcza zmian DNA w długoterminowych kulturach kalusa *F. tataricum* w liniach kalusa morfogenego i niemorfogenego w różnym wieku. W relacji do typu i wieku kalusa analiza objęła morfologię jądra komórkowego, pomiary względnej zawartości DNA oraz uszkodzeń DNA.**

Materiał roślinny *in vitro* może być genetycznie stabilny, wówczas uzyskane klony są identyczne z rośliną rodzicielską, z której wyprowadzono kulturę. Jednakże w przypadku roślin regenerowanych *in vitro* często można zaobserwować występowanie, w porównaniu do roślin

rodzicielskich, różnych zmian fenotypowych. Zjawisko to jest znane jako zmienność somaklonalna. Zmiany takie mogą obejmować różne rearanżacje na poziomie genetycznym i epigenetycznym, które zachodzą podczas kalogenezy i regeneracji roślin (Karp, 1994, Mohan Jain, 2001). Obejmują one mutacje punktowe, strukturalne i liczbowe zmiany chromosomowe, zmiany liczby kopii genów, zmiany aktywności elementów ruchomych oraz zmiany poziomu i wzoru metylacji DNA (Phillips *i inni*, 1994, Brar i Jain, 1998, Fras *i inni*, 2007). Mutacje genetyczne mogą prowadzić do znacznych trudności w utrzymaniu kultury kalusa i regeneracji roślin, a w konsekwencji mogą w znacznym stopniu ograniczać wydajność mikropropagacji lub transformacji genetycznej (Bairu *i inni*, 2011).

Częstotliwość występowania zmienności somaklonalnej zależy od danego genotypu, rodzaju eksplantatu, wieku rośliny oraz doboru warunków hodowli (Mohan Jain, 2001). Dokładne mechanizmy zmienności somaklonalnej są nadal nie do końca poznane. Wspólną cechą komórek kalusa jest ich poliploidyzacja, która jest wynikiem różnych procesów, takich jak endoreduplikacja, endomitoza, fuzja jąder i aberracje chromosomowe podczas anafazy mitozy (Mohan Jain, 2001). Wzrost liczby chromosomów w trakcie hodowli *in vitro* zaobserwowano nie tylko u różnych gatunków roślin uprawnych, m. in. przedstawicieli rodzaju *Allium* (*A. cepa*, *A. festulosum*) (Roy, 1980, Joachimiak i Ilnicki, 2003), *Solanum tuberosum* (Pijnacker i Ferwerda, 1990), *Cucumis sativus* (Filipecki *i inni*, 2006) i *Agapanthus praecox* (Nakano *i inni*, 2003), ale także u rośliny modelowej kwiatowej, jaką jest *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (Fras i Maluszynska, 2003). W kulturach *in vitro* *Elaeis guineensis* (Jaligot *i inni*, 2004), *Vitis vinifera* (Baránek *i inni*, 2010) i *Malus × domestica* (Li *i inni*, 2002) wykazano znaczne zmiany w globalnych poziomach metylacji DNA. Krioprezewacja, którą zastosowano dla genotypów *Ribes* nieodpornych na ten proces, spowodowała znaczny spadek metylacji DNA, a w efekcie aktywację wyciszonych wcześniej ruchomych elementów genetycznych. W przypadku roślin tytoniu, które zostały zregenerowane z kultury tkankowej, a także w roślinach transgenicznym tego gatunku odnotowano aż dziesięciokrotny wzrost liczby kopii retrotransponu *Tto1* (Hirochika, 1993). Zaburzenia metylacji DNA przyczyniają się do niestabilności genomu, co dodatkowo utrudnia prawidłowy rozwój roślin (Johnston *i inni*, 2009). Dla odmiany, spektakularnym przykładem stabilności potencjału regeneracyjnego jest kalus morfogeny *F. tataricum*. Kultury te zachowują zdolność do embriogenezy somatycznej oraz niską zmienność chromosomową nawet do 10 lat (Rumyantseva *i inni*, 1989, Kamalova *i inni*, 2009).

W opisywanej pracy przedstawiono szczegółową charakterystykę morfologiczno-cytologiczną kalusa morfogenego oraz niemorfogenego *F. tataricum*. Wykazano, że kalus

morfogeny składa się z proembriogennych kompleksów komórkowych (PEKK) i kalusa „miękkiego”, który pojawia się cyklicznie w trakcie rozwoju kalusa i dezintegracji PEKK. Komórki kalusa „miękkiego” (KKM) pojawiają się podczas rozluźnienia obszarów PEKK i porównaniu do komórek z obszarów embriogennych są stosunkowo dużych rozmiarach, parenchymatyczne i silnie zwakuolizowane. Wykazano ponadto, że komórki embriogenne oraz KKM zawierają związki fenolowe, zaś kalus niemorfogeny takich związków nie zawiera. Kalus niemorfogeny powstaje z komórek KKM, w których dochodzi do procesów endoreplikacji, a komórki te różnią się od komórek kalusa morfogenego kruchą strukturą, szybką intensywnością podziałów, a także całkowitą utratą zdolności do embriogenezy.

**Po raz pierwszy w tej pracy wykazano**, że komórki embriogenne kalusa morfogenego mają okrągłe jądra o regularnym kształcie, które nie zawierają heterochromatyny w przeciwieństwie do niemorfogennych komórek kalusa, w których zaobserwowano jądra, o charakterystycznych dla tej grupy komórek płatowatych uwypukleniach powierzchni tego organellum (*ang. lobes*). Analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazały **znaczące różnice** we względnej zawartości DNA między analizowanymi kalusami. Wykazano, że kalus niemorfogeny ma charakter aneuploidalny. Test TUNEL umożliwił fluorescencyjną wizualizację jąder komórkowych charakteryzujących się fragmentacją DNA zarówno w przypadku linii morfogennych, jak i niemorfogennych. Jednakże częstotliwości TUNEL-pozytywnych jąder w liniach niemorfogennych były znacznie wyższe, niż w liniach morfogennych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na **większą stabilność genomu** w liniach kalusa morfogenego oraz wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmów utraty potencjału embriogenego. Z kolei fakt lokalizacji związków fenolowych w komórkach embriogennych może mieć praktyczne zastosowanie w biotechnologii roślin.

#### **Główne osiągnięcia:**

- **Dokonanie szczegółowej i kompleksowej analizy zmian w genomie długoterminowych kultur *F. tataricum*;**
- **Wykazanie, że stabilność kalusa morfogenego powiązana jest ze stabilną naturą genomu jądrowego;**
- **Odkrycie aneuploidalnej natury komórek kalusa nieembriogenego, powstałych w wyniku endoreduplikacji na powierzchni obszarów kalusa embriogenego**
- **Wykazanie całkowitego braku obecności związków fenolowych w kalusie nieembriogenym.**

**P3: BETEKHTIN A, ROJEK M, NOWAK K, PINSKI A, MILEWSKA-HENDEL A, KURCZYNSKA E, DOONAN JH, HASTEROK R (2018) Cell wall epitopes and endoploidy as reporters of embryogenic potential in *Brachypodium distachyon* callus culture. International Journal of Molecular Sciences 19: 3811, DOI 10.3390/ijms19123811**

Badania realizowano w ramach projektu HARMONIA pt. „CDKG/Ph1: czy istnieje uniwersalny mechanizm regulujący stabilność genomu u traw?”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) - projekt we współpracy międzynarodowej 2014/14/M/NZ2/00519 (2015-2019). Projekt kierowany był przez prof. dr. hab. Roberta Hasteroka. Byłem głównym wykonawcą w tym projekcie.

**W tych badaniach analizowano takie procesy jak: rozmieszczenie kluczowych składników ściany komórkowej, zawartość DNA jądrowego, zawartość związków indolowych, ekspresja wybranych genów związanych z somatyczną embriogenezą w kulturach kalusa *B. distachyon*.**

Wysoka zdolność do regeneracji (potencjał embiogenny) komórek jest powszechnie wykorzystywana w biotechnologii. Jednak utrata tego potencjału jest zjawiskiem powszechnym i może nastąpić wkrótce po rozpoczęciu hodowli kalusa lub dopiero po wielu latach hodowli (Cai i Butler, 1990, Brisibe *i inni*, 1994, Lambé *i inni*, 1998, Betekhtin *i inni*, 2017). Niewątpliwie, słaba regeneracja jest powszechnym problemem, który ogranicza możliwość stosowania manipulacji biotechnologicznych u wielu gatunków. Mechanizmy, przez które tkanka traci zdolność do regeneracji, są zatem przedmiotem powszechnego zainteresowania.

Proces somatycznej embriogenezy jest kontrolowany przez dużą grupę czynników transkrypcyjnych, np. *BABY BOOM (BBM)*, *WUSHEL (WUS)*, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* i *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)*, *FUSCA3 (FUS3)*, białka związane z transdukcją sygnału, wśród których głównymi są *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* (białka *SERK*) i *CLAVATA (CLV1, 2 i 3)*, a także białka zaangażowane w regulację biosyntezy hormonów, na przykład *YUCCA1 (YUC1)*. Białka te biorą udział w odróżnicowaniu i utrzymaniu potencjału embriogennego komórek i tworzeniu komórek embriogennych (Roja-Herrera *i inni*, 2002, Gaj *i inni*, 2005, Yang i Zhang, 2010a). Rozwój zarodka somatycznego może wymagać również czasoprzestrzennej zmiany komponentów ściany komórkowej (Fehér

*i inni*, 2003). Cykl komórkowy eukariontów kontrolowany jest przez dużą rodzinę kinaz cyklinozależnych (CDK). Aktywność tych kinaz jest pozytywnie regulowana przez wiązanie z cyklinami, z których niektóre pojawiają się i znikają okresowo podczas cyklu komórkowego, a ekspresja genów je kodujących jest często modulowana podczas somatycznej embriogenezy (Footitt *i inni*, 2003, Montero-Cortés *i inni*, 2010).

**Przeprowadzone badania przyczyniły się do wykazania**, że utrata potencjału embriogennego w kulturach kalusa *B. distachyon* postępuje z czasem. Analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazały wzrost poziomu endoploidii po 60 i 90 dniach hodowli kalusa. W 90 dniu zachodziła utrata zawartości 2C DNA. Analiza zawartości związków indolowych wykazała spadek poziomu tych substancji po 60 i 90 dniach hodowli kalusa w porównaniu ze świeżo izolowanymi eksplantami lub kalusami 30-dniowymi. Analiza immunohistochemiczna ujawniła, że wraz z wydłużaniem hodowli następuje spadek intensywności sygnałów pochodzących od epitopów AGP wykrywanych przeciwciałem JIM13, JIM 16 i LM2, co można interpretować jako zmniejszenie ilości tych epitopów w ścianie. W przypadku ekstensyn ich ilość wzrosła w przypadku epitopów wykrywanych przeciwciałem JIM12, albo malała w przypadku ekstensyn wykrywanych przeciwciałem JIM11, co wskazuje na zróżnicowany udział ekstensyn, w zależności od ich właściwości, w kontroli embriogenezy somatycznej. Wyniki te zostały potwierdzone przez analizy ekspresji genów kodujących AGP i ekstensyny, przy czym wykazano, że ekspresja większości tych genów wraz ze starzeniem się kultury stopniowo maleje. Ekspresja ekstensyn chimerycznych znacznie wzrosła w 30 dniu hodowli, co może być spowodowane zwiększeniem potencjału embriogennego. Począwszy od 30 dnia kultury, związane z embriogenezą somatyczną geny *YUC*, *AIL*, *BBM* i *CLV3* wykazywały stopniowy spadek ekspresji; podobnie miała się sytuacja w odniesieniu do genów kodujących większość cyklin. Warto zauważyć, że ekspresja genu *WUS* była wykrywalna tylko w 30 i 60 dniu, a nie była wykrywalna w zarodkach zygotycznych i w komórkach 90-dniowego kalusa.

#### **Główne osiągnięcia:**

- **Wykazanie, że czasowo-przestrzenne zmiany w składzie chemicznym ściany komórkowej są skorelowane z utratą potencjału embriogennego komórek;**
- **Wykazanie, że utrata potencjału embriogennego wiąże się ze zmianą ekspresji genów uczestniczących w syntezie składników ściany komórkowej oraz genów związanych z rozwojem merystemu i cyklem komórkowym;**

- Odkrycie, że poziom endoreduplikacji wzrasta wraz ze starzeniem się kultur *B. distachyon*.

**P4: BETEKHTIN A, MILEWSKA-HENDEL A, CHAJEC L, ROJEK M, NOWAK K, KWASNIEWSKA J, WOLNY E, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2018) 5-azacitidine induces cell death in a tissue culture of *Brachypodium distachyon*, DOI 10.3390/ijms19061806**

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu 5-azacytydyny (5-azaC), będącej silnym związkiem hipometylującym DNA, na proces formowania się mas embriogennych, a także scharakteryzowanie morfologii, histologii, ultrastruktury oraz składu chemicznego wybranych składników ściany komórkowej. Określono także ekspresję wybranych genów, związanych, z programowaną śmiercią komórkową i odpowiedzią na stres w eksplantatach traktowanych 5-azaC i kontrolnych w embriogennych kulturach *B. distachyon*.

Wprowadzane do kultur *in vitro* komórki roślinne podlegają zmianom, które obejmują odróżnicowanie, nabycie pluripotencji lub totipotencji, proliferację, różnicowanie, a na koniec tworzenie zarodków (Kurczynska *i inni*, 2012b). Metylacja DNA odgrywa kluczową rolę podczas procesów odróżnicowania i różnicowania oraz tworzenia mas embriogenicznych (Ji *i inni*, 2019). Ta modyfikacja chemiczna DNA reguluje aktywność genów w sposób pozytywny lub negatywny (Vanyushin i Ashapkin, 2011). Chociaż w większości przypadków powoduje inaktywację genów (Matzke *i inni*, 1989, Saze *i inni*, 2012), wykazano również, że metylacja poszczególnych genów może także indukować ich ekspresję (Shibuya *i inni*, 2009). 5-azaC jest często stosowana do analizy zmian poziomu metylacji DNA. Yamamoto *i inni* (2005) wykazali, że hamowanie metylacji DNA przez 5-azaC w kulturach *in vitro* marchwi utrudnia formowanie mas embriogennych z komórek epidermalnych. Eksperymentalne zmiany w globalnym poziomie metylacji DNA mogą odgrywać kluczową rolę w różnych procesach rozwoju roślin. Na przykład traktowanie za pomocą 5-azaC wrażliwych na chłód roślin *Arabidopsis* sprawia, że proces ich wernalizacji nie jest konieczny (Finnegan *i inni*, 1998). W przypadku koleoptyli jęczmienia wykazano, że 5-azaC w stężeniu 100 µg/ml wpływa na stymulację fragmentacji DNA (Vanyushin *i inni*, 2002). Analizy transkryptomu sadzonek *Arabidopsis* traktowanych 5-azaC lub zebulariną wykazały znaczną liczbę genów o podwyższonej ekspresji, szczególnie

związanych z elementami ruchomymi. To pokazało, że te dwa czynniki mają nieproporcjonalnie duży wpływ na loci wyciszone przez metylację DNA (Griffin *i inni*, 2016).

Cięcie DNA i ekspresja określonych genów, na przykład kodujących metakaspazę, S-transferazę glutationową i protein executor 1 to cechy specyficzne programowanej śmierci komórki (Salinas i Wong, 1999, Ning *i inni*, 2002, Lee *i inni*, 2007, Sharma *i inni*, 2014). Proces ten charakteryzuje się także aktywacją endonukleaz, które powodują pęknięcia jednoniciowe i powstawanie fragmentów DNA o niskiej masie cząsteczkowej (mono- i oligonukleosomów) (Ning *i inni*, 2002).

W badaniach, których wyniki opublikowano w pracy P4 wykazano, że 5-azaC w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  hamuje całkowicie indukcję mas embriogennych, podczas gdy hodowla eksplantatów (zarodków zygotycznych) w obecności 5-azaC o stężeniu 5  $\mu\text{M}$  doprowadziła do powstania kalusa zawierającego masy embriogenne w 10% eksplantatów. Analizy z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) ujawniły obecność cech ultrastrukturalnych typowych dla śmierci komórkowej typu wakuolarnego w kalusie traktowanym 5-azaC. Test TUNEL potwierdził obecność dwuniciowych pęknięć DNA dla komórek kalusa, które były traktowane 5-azaC o stężeniu zarówno 5  $\mu\text{M}$ , jak i 50  $\mu\text{M}$ . Analiza ekspresji wybranych genów, które są markerami śmierci komórkowej, w traktowanych czynnikiem hypometylującym komórkach kalusa wykazała zmniejszoną ekspresję metakaspaz, protein executor 1 i tioredoksyny. Najsilniejszy wzrost aktywności stwierdzono dla genu S-transferazy glutationowej. Analizę rozmieszczenia niektórych białek arabinogalaktanowych i ekstensyn, wykazała, że można je wykorzystać jako markery komórek, które ulegają programowanej śmierci w kulturach *in vitro* *B. distachyon*.

#### **Główne osiągnięcia:**

- **Wykazanie, że metylacja DNA jest ważnym czynnikiem warunkującym powstawanie mas embriogennych w kulturach *in vitro* *B. distachyon*;**
- **Odkrycie, że w trakcie śmierci komórkowej następuje reorganizacja składników ściany komórkowej. Wykazanie, że JIM8 i JIM13, które rozpoznają epitopy AGP, mają najsilniejsze sygnały w kalusie, który był traktowany 5-azaC. Sygnał tych przeciwciał był praktycznie nieobecny w kalusie kontrolnym.**

**P5: BETEKHTIN A, PINSKI A, MILEWSKA-HENDEL A, KURCZYNSKA E, HASTEROK R (2019) Stability and instability processes in the calli of *Fagopyrum***

*tataricum* that have different morphogenic potentials. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137: 343-357, DOI: 10.3390/ijms19123811

Celem badań przedstawionych w tej pracy było wykonanie kompleksowej analizy stabilności / niestabilności w kalusach *F. tataricum* o różnym potencjale embriogennym. Wykorzystana została technika immunolokalizacji określonych (epitopy AGP i ekstensyn) składników ściany komórkowej, której celem było sprawdzenie czy mogą być one markerami diagnostycznymi dla kalusa morfogenego i niemorfogenego. Ponadto, ze względu na różnice w szybkości wzrostu (bardzo szybkie starzenie w kalusie niemorfogennym), postawiona została hipoteza o nadekspresji genów biosyntezy etylenu w kalusie niemorfogennym *F. tataricum*. W związku z powyższym wykorzystana została metoda RT-qPCR do oceny poziomu ekspresji genów związanych z biosyntezą etylenu, funkcją telomerów (geny kodujące telomerazę oraz białko chroniące telomery), metylotransferaz oraz demetylaz DNA w różnych typach kalusa. Trichostatyna A (TSA) została użyta do sprawdzenia wpływu hamowania deacetylazy histonowej (HDAC) na metylotransferazy oraz demetylasy DNA.

Jak wcześniej wspomniano, kalus niemorfogeny może się pojawić na powierzchni kalusa morfogenego po 2-3 latach hodowli i charakteryzuje się obecnością komórek o bardzo wysokim poziomie stresu oksydacyjnego. Wyjaśnienie tła molekularnego tej niestabilności jest niezbędne dla lepszego zrozumienia mechanizmów zmienności somaklonalnej w kulturach *in vitro* o różnym potencjale embriogennym. W przeprowadzonych analizach **po raz pierwszy** wykazano, że ciągły stres oksydacyjny w komórkach kalusa niemorfogenego może być powodem szybkiego procesu starzenia, a w rezultacie nadekspresji genów związanych z funkcją telomerów, biosyntezą etylenu i ekspresją metylotransferaz DNA. Ponadto przeanalizowano czasowo-przestrzenne rozmieszczenie wybranych epitopów AGP oraz ekstensyn w komórkach kalusa i stwierdzono różnice pomiędzy komórkami kalusa morfogenego i niemorfogenego. Wykazano, że przeciwciało LM2 może być przydatne jako **marker komórek** embriogennych w morfogennym kalusie. Natomiast przeciwciało MAC207 wydaje się być **markerem kalusa morfogenego**, ponieważ ten epitop AGP nie występował w kalusie niemorfogennym. Badania te dostarczają również oryginalnych wyników na temat wpływu trichostatyny A na metylotransferazy DNA i demetylasy w kalusie morfogennym demonstrując, że trichostatyna A w stężeniu 2,5  $\mu$ M zwiększa ekspresję genów kodujących metylazy i demetylasy DNA.



### Główne osiągnięcie:

- Wykazanie, że takie epitopy jak AGP jak LM2 i MAC207 mogą być markerami kalusa morfogennego;
- Wykrycie, że ciągły stres oksydacyjny w kalusie nieembriogennym jest skorelowany z szybkim starzeniem kultury oraz nadekspresją genów związanych z telomerami oraz biosyntezą etylenu;
- Wykazanie, że trichostatyna A może być używana jako czynnik warunkujący zwiększenie ekspresji genów kodujących metylazy i demetylazy DNA.

**Podsumowując**, najważniejszym wynikiem wzbogacającym dotychczasową wiedzę o różnych czynnikach uczestniczących w regulacji potencjału embriogennego jest stwierdzenie wyjątkowej stabilności genomu morfogenicznego kalusa *F. tataricum*. Z kolei *B. distachyon* może być wykorzystany jako gatunek modelowy do badań *in vitro* innych gatunków traw, charakteryzujących się szybką utratą potencjału embriogennego.

### Plany naukowe

Warto podkreślić, że wyniki omówionych prac wyznaczyły kolejne kierunki badawcze, które mogą przyczynić się w przyszłości do postępu zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Kilkumiesięczne staże naukowe w National Plant Phenomics Centre, IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth, UK, kierowanym przez profesora Johna Doonana oraz w John Innes Centre, Norwich, UK pozwoliły na opracowanie techniki ukierunkowanej mutagenazy CRISPR/Cas9 (*ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) oraz CRISPR/Cpf na potrzeby edycji genomów *B. distachyon* i *B. hybridum*. W chwili obecnej, w recenzji we **Frontiers in Plant Science** (IF<sub>2019</sub> = 4,298 / MNiSW<sub>2019</sub> = 100) znajduje się publikacja pt. **A CRISPR/Cas9-based mutagenesis protocol for *Brachypodium distachyon* and its allopolyploid relative, *Brachypodium hybridum***. W pracy tej jestem równorzędnym pierwszym oraz korespondencyjnym autorem. Opracowana dla gatunków *Brachypodium* metodyka otwiera duże możliwości badawcze i zostanie wykorzystana w trakcie realizacji projektu OPUS pt. **Analiza cytogenomiczna istotnych zagadnień organizacji genomu jądrowego poliploidalnej trawy modelowej *Brachypodium hybridum* oraz gatunków rodzicielskich**, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanego przez profesora Roberta Hasteroka. W projekcie tym jestem głównym wykonawcą. Jednym z ważnych zadań podejmowanych w w/w projekcie będzie próba wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych

za przestrzenną organizację jądra komórkowego u modelowego gatunku allopoliploidalnej trawy, jakim jest *Brachypodium hybridum*. Badania będą prowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych metod cytomolekularnych, które pozwalają na wizualizację określonych domen chromosomowych (np. centromerowej i telomerowej) oraz całych genomów rodzicielskich w obrębie utrwalonych jąder komórkowych. Interesującym będzie także porównanie rozmieszczenia domen centromerowej i telomerowej w jądrach komórkowych stabilnego ewolucyjnie naturalnego allopoliploida oraz jego „młodego” resyntetyzowanego odpowiednika.

Warto też podkreślić, że dwutygodniowa wizyta w laboratorium Cell Wall Proteins and Development, kierowanego przez Dr Elisabeth Jamet w Paul Sabatier-Toulouse 3 University, Toulouse, France pozwoliła na nawiązanie nowej współpracy naukowej oraz otworzyła możliwość złożenia do Narodowego Centrum Nauki wspólnego projektu typu Sonata, pt. **Od stanu nieembriogenego do embriogenego - kompleksowa analiza losów komórek u gryki tatarskiej**. Wniosek projektowy jest obecnie w trakcie oceny merytorycznej. Głównym celem tego projektu jest przeprowadzenie kompleksowej analizy cytomolekularnej komórek kalusa od stanu nieembriogenego do embriogenego na przykładzie *F. tataricum*. W ramach projektu planowane są między innymi: (1) analizy komunikacji symplastowej między komórkami przed i w trakcie zmiany kierunku ich różnicowania w kulturze embriogennej i nieembriogennej; (2) badania pozwalające prześledzić na poziomie epigenetycznym proces przeprogramowania komórki ze stanu nieembriogenego do embriogenego. Ponadto, techniki izolacji białek ze ściany komórkowej zostaną zoptymalizowane i wykorzystane w moim obecnym miejscu pracy na potrzeby kontynuacji badań związanych z utratą/utrzymaniem potencjału embriogenego w kulturach *B. distachyon* oraz *F. tataricum*.

Nawiązanie kontaktu z profesorem Meiliang Zhou, Chinese Academy of Science, Beijing, China, który jest szczególnie zainteresowany współpracą naukową w aspekcie analiz gryki, pozwoliło na złożenie wspólnego wniosku do Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) pt. **Analiza jakościowa zasobów genetycznych w populacji gatunków gryki w Polsce i Chinach**. Jeśli otrzyma finansowanie, projekt ten pozwoli na wymianę akademicką pomiędzy Uniwersytetem Śląskim w Katowicach a Chińską Akademią Nauk oraz złożenie wspólnego wniosku projektowego w konkursie Sheng 2, finansowanego przez NCN oraz National Natural Science Foundation of China (NSFC). Projekt ten pozwoli na większe zacieśnienie współpracy naukowej w kontekście badań ważnych gatunków użytkowych *F. tataricum* oraz *F. esculentum*.

Warto podkreślić, że wiedza otrzymana z badań podstawowych opisanych w tym autoreferacie pozwoliły na złożenie projektu aplikacyjnego Lider XI pt. **Otrzymanie unikatowych linii kalusowych *Fagopyrum esculentum* i *Fagopyrum tataricum* oraz mieszańców somatycznych *F. esculentum* (+) *F. tataricum* z wysoką zawartością związków prozdrowotnych** do Narodowego Centrum Badan i Rozwoju. Projekt jest w trakcie oceny.

### **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Moje zainteresowania badawcze obejmują dwa główne nurty. Pierwszy z nich dotyczy badań ewolucji roślinnego genomu jądrowego na poziomie cytomolekularnym. Drugim kierunkiem badawczym jest analiza składu ściany komórkowej w roślinach *in vivo* i *in vitro*.

### **Tematyka badawcza związana z badaniem ewolucją roślinnego genomu jądrowego na poziomie cytomolekularnym**

Podczas pracy doktorskiej rozpocząłem badania związane z ewolucją genomów *Brachypodium* na poziomie chromosomowym. Anglojęzyczne studia doktoranckie podjąłem na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach. Badania realizowałem w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin (obecnie Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego).

Badania związane z realizacją projektu doktorskiego prowadziłem w ramach finansowanego przez NCN projektu Maestro pt. **Struktura, dynamika i ewolucja roślinnego genomu jądrowego z perspektywy badań cytomolekularnych**, kierowanego przez prof. dr. hab. Roberta Hasteroka. Zasadniczą częścią doktoratu była analiza cytomolekularna spokrewnionych ze sobą gatunków należących do rodzaju *Brachypodium* za pomocą zaawansowanej techniki cytomolekularnej - porównawczego malowania chromosomów. W pracy doktorskiej **po raz pierwszy wykazano**, że genomy gatunków *Brachypodium* mogą pochodzić z genomu zbliżonego do lub identycznego z obserwowanym u *B. mexicanum*. Niewykluczone też, że gatunki *Brachypodium* o liczbie chromosomów  $2n=18$  mogą stanowić formy pośrednie w ewolucji pomiędzy *B. mexicanum* i *B. distachyon*. Porównawcze malowanie chromosomów potwierdziło allotetraploidalne pochodzenie *B. pinnatum* ( $2n=28$ ), *B. phoenicoides* oraz *B. hybridum*, a także, że jednym z ich filogenetycznych przodków mógł być *B. distachyon*. Wyniki malowania z użyciem sond pochodzących z chromosomów *B. distachyon* Bd2, Bd4 i Bd5 w *B. pinnatum* ( $2n=28$ ) i *B. phoenicoides* jednoznacznie wykazały, że pomalowane u tych gatunków biwalenty stanowią sumę pomalowanych biwalentów

obserwowanych u *B. distachyon* oraz u *B. pinnatum* ( $2n=16$ ;  $2n=18$ ) czy *B. sylvaticum*. **Badania przedstawione i przedyskutowane w pracy doktorskiej stanowią istotny wkład w poznanie struktury i ewolucji roślinnego genomu jądrowego na poziomie chromosomowym** (Betekhtin *i inni*, 2014).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, kontynuowałem badania związane z ewolucją rodzaju *Brachypodium*. W ramach badań była wykonana porównawcza wielobarwna fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (mFISH) z wykorzystaniem specyficznych chromosomowo klonów BAC (*ang. Bacterial Artificial Chromosomes*) pochodzących z genomu jądrowego gatunku referencyjnego *B. distachyon* ( $2n=10$ ). Badania te zostały wykonane we współpracy z Prof. Pilar Catalan z University of Zaragoza, Huesca, Spain, w laboratorium której odbywałem kilkumiesięczny staże przed (w ramach programu Erasmus 5 miesięcy) oraz po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (tygodniowe wyjazdy w ramach programu Erasmus +). Efektem tych badań są dwie publikacje, których jestem współautorem: Lusinska *i inni* (2018) oraz Lusinska *i inni* (2019). Badania te umożliwiły integrację wyników otrzymanych dzięki międzygatunkowemu mapowaniu cytogenetycznemu z dostępnymi danymi o sekwencji całogenomowej *B. distachyon*. Pozwoliło to na przypisanie odpowiednich chromosomów lub ich fragmentów do 12 bloków syntenicznych, tworzących tzw. Pośredni Ancestralny Kariotyp Traw o podstawowej liczbie chromosomów ( $x$ ) równej 12. Porównanie struktury chromosomów badanych przedstawicieli rodzaju *Brachypodium* umożliwiło rekonstrukcję historii ewolucyjnej głównych linii rozwojowych dla tej grupy roślin. Otrzymane wyniki dowodzą, że obserwowana powszechnie w rodzaju *Brachypodium* redukcja liczby chromosomów zachodzi głównie na drodze fuzji insercyjnych. Ponadto, otrzymane wyniki umożliwiły wykluczenie *B. distachyon* jako domniemanego gatunku rodzicielskiego dla allotetraploidalnych gatunków *B. phoenicoides* oraz *B. pinnatum*, a także wykluczyły *B. stacei* jako potencjalnego przodka *B. mexicanum*.

Kilkumiesięczne staże w ramach programu Erasmus, odbyte przeze mnie w trakcie studiów doktoranckich w laboratorium prof. Glyna Jenkinsa, Aberystwyth University, Aberystwyth, UK pozwoliły na zoptymalizowanie metodyki 3D-FISH dla gatunków *Brachypodium*, a następnie wykorzystanie te umiejętności w badaniach dominacji jąderkowej (Borowska-Zuchowska *i inni*, 2019). Dominacja jąderkowa jest zjawiskiem epigenetycznym, które występuje u niektórych allopoliploidów i hybryd międzygatunkowych u roślin i zwierząt. Manifestuje się tym, że tylko jeden zestaw genów rodzicielskich kodujących 35S rRNA ulega ekspresji, podczas gdy loci rDNA pochodzące od drugiego rodzica są wyciszane. Istnieją dowody na to, że dominacja jąderkowa może się zmieniać w trakcie rozwoju roślin. Celem

opisywanych badań była próba znalezienia odpowiedzi na pytanie czy dominacja jąderkowa u allotetraploidalnego gatunku trawy, jakim jest *B. hybridum*, zmienia się w trakcie rozwoju tej rośliny? Zastosowanie sekwencji 25S rDNA w charakterze sondy wykazało, że dominacja jąderkowa u *B. hybridum* występuje nie tylko w merystematycznych i zróżnicowanych komórkach somatycznych tego gatunku, ale także w męskich mejocytach w trakcie profazy I, tetradach mikrospor i we wszystkich tkankach niedojrzałych i dojrzałych zarodków. We wszystkich wyżej opisanych przypadkach jedynie loci 35S rDNA wywodzące się z genomu *B. distachyon* tworzyły jąderka u *B. hybridum*, podczas gdy loci pochodzące z genomu *B. stacei* pozostały silnie skondensowane, a zatem wyciszone transkrypcyjnie.

Wieloletnia współpraca z prof. Johnem Doonanem, National Phenomics Centre, Aberystwyth University, Aberystwyth, UK oraz doświadczenie naukowe w zakresie cytogenetyki roślin pozwoliły mi uczestniczyć w badaniach nad poznaniem roli kinaz cyklinozależnych w parowaniu chromosomów u *A. thaliana* (Nibau i inni, 2020). W pracy tej po raz pierwszy wykazano, że tak zwana kinaza cyklinozależna G1 (CDKG1) działa u tego gatunku na wczesnym etapie procesu rekombinacji genetycznej i jest niezbędna do stabilizacji półproduktów rekombinacyjnych w trakcie mejozy. Badania te wykazały także, że wpływ na rekombinację nie ogranicza się do mejozy i że CDKG1 jest również niezbędna do normalnego poziomu rekombinacji homologicznej indukowanej uszkodzeniem DNA w tkankach somatycznych.

### **Tematyka badawcza związana z analizą składu ściany komórkowej**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora zajmuję się również analizą rozmieszczenia kluczowych komponentów ściany komórkowej. Badania te prowadzone były we współpracy z prof. dr. hab. Ewą Kurczyńską i jej grupą z mojego macierzystego instytutu. Analiza rozmieszczenia składników ściany komórkowej w niedojrzałych zarodkach zygotycznych *B. distachyon* pokazała, że większość AGP i ekstensyn rozmieszczona była na powierzchni komórek i że pektyny są głównymi składnikami otoczki nasiennej i innych części zarodka. Hemicelulozy zostały zlokalizowane w ścianie komórkowej mezokotyłu i na powierzchni korzenia zarodkowego. Specyficzne rozmieszczenie składników ściany komórkowej może wskazywać na ich znaczenie podczas rozwoju zarodka i kiełkowania nasion, sugerując w ten sposób ich rolę ochronną. Pomimo różnic w składzie ściany komórkowej wykazano, że niektóre przeciwciała można wykorzystać jako markery do identyfikacji określonych komórek i części rozwijającego się zarodka *B. distachyon* (Betekhtin i inni, 2018).

Ostatni kierunek moich zainteresowań badawczych związany jest z analizą odpowiedzi *B. distachyon* na stres temperaturowy (Pinski *i inni*, 2019). Badania te są obecnie bardzo aktualne ze względu na globalne zmiany klimatyczne. W opisywanej pracy wykazano zmiany w lokalizacji i zróżnicowanej ekspresji genów AGP, ekstensyn oraz kinaz ekstensynopodobnych w liściach *B. distachyon*, zachodzące w odpowiedzi na stres temperaturowy. Zaobserwowano wzrost poziomu AGP wykrywanego przeciwciałem JIM8 w ścianach komórek łyka w warunkach wysokiej temperatury (40 °C) i spadek w warunkach niskiej temperatury (4 °C). Obserwowany był także wzrost zawartości AGP wykrywanego przeciwciałem LM2 w liściach roślin poddanych działaniu wysokiej temperatury oraz spadek obecności AGP wykrywanego przeciwciałem JIM16 zarówno w warunkach niskiej, jak i wysokiej temperatury. Wykazano również, że w warunkach stresu temperaturowego dochodzi do nadekspresji niektórych genów AGP oraz ekstensyn. Opisywane obserwacje mogą mieć znaczenie dla inżynierii roślin, mającej na celu otrzymanie gatunków o podwyższonej odporności na stres temperaturowy.

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

**Wieloletnia współpraca z prof. Glynem Jenkinsem, prof. Johnem Doonanem oraz prof. Luisem Murem z Aberystwyth University, Aberystwyth, UK pozwoliła na odbycie staży naukowych oraz opublikowanie następujących prac naukowych:**

1. NIBAU C, LLOYD AH, DADAROU D, **BETEKHTIN A**, TSILIMIGKA F, PHILIPS DW, DOONAN JH (2020) CDKG1 is required for meiotic and somatic recombination intermediate processing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00942>.

2. **BETEKHTIN A**, HUS K, ROJEK-JELONEK M, KURCZYNSKA E, NIBAU C, DOONAN JH, HASTEROK R (2020) *In vitro* culture in *Brachypodium*: applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1037, DOI: 10.3390/ijms21031037.

3. LUSINSKA J, **BETEKHTIN A**, LOPEZ-ALVAREZ D, CATALAN P, JENKINS G, WOLNY, E, HASTEROK R (2019) Comparatively barcoded chromosomes of *Brachypodium*

perennials tell the story of their karyotype structure and evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5557, DOI: 10.3390/ijms20225557.

4. PINSKI A, **BETEKHTIN A**, HUPERT-KOCUREK K, MUR LAJ, HASTEROK R (2019) Defining the genetic basis of plant-endophytic bacteria interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1947, DOI: 10.3390/ijms20081947.

5. **BETEKHTIN A**, ROJEK M, NOWAK K, PINSKI A, MILEWSKA-HENDEL A, KURCZYNSKA E, DOONAN JH, HASTEROK R (2018) Cell wall epitopes and endoploidy as reporters of embryogenic potential in *Brachypodium distachyon* callus culture. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 3811, DOI 10.3390/ijms19123811

6. **BETEKHTIN A**, JENKINS G, HASTEROK R (2014) Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. *PLoS One* 9: e115108, DOI: 10.1371/journal.pone.0115108

7. IDZIAK D, **BETEKHTIN A**, WOLNY E, LESNIEWSKA K, WRIGHT J, FEBRER M, BEVAN M, JENKINS G, HASTEROK R (2011) Painting the chromosomes of *Brachypodium* - current status and future prospects. *Chromosoma* 120: 469-479

**Wieloletnia współpraca z prof. Pilar Catalan z University of Zaragoza, Zaragoza, Spain pozwoliła na odbycie staży naukowych oraz opublikowanie następujących prac naukowych:**

1. LUSINSKA J, BETEKHTIN A, LOPEZ-ALVAREZ D, CATALAN P, JENKINS G, WOLNY, E, HASTEROK R (2019) Comparatively barcoded chromosomes of *Brachypodium* perennials tell the story of their karyotype structure and evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5557, DOI: 10.3390/ijms20225557

2. CATALAN P, MULLER J, HASTEROK R, JENKINS G, MUR LAJ, LANGDON T, **BETEKHTIN A**, SIWINSKA D, PIMENTEL M, LOPEZ-ALVAREZ D (2012) Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. (Poaceae). *Annals of Botany*: 109: 385-405

3. LOPEZ-ALVAREZ D, LOPEZ-HERRANZ ML, **BETEKHTIN A**, CATALAN P (2012) A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae) *PLoS One* DOI: 10.1371/journal.pone.0051058.

**Współpraca z dr Natalią Rumyanstsewą z Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Centre of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia pozwoliło na opublikowanie następującej pracy naukowej:**

1. **BETEKHTIN A**, ROJEK M, JASKOWIAK J, MILEWSKA-HENDEL A, KWASNIEWSKA J, KOSTYUKOVA J, KURCZYNSKA E, RUMYANTSEVA N, HASTEROK R (2017) Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *PLoS One* 12: e0173537, DOI: 10.1371/journal.pone.0173537

**Współpraca z akademikiem Wiktorom A. Kunakhem z Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine pozwoliło na opublikowanie następującej pracy naukowej:**

1. NAVROTSKA D, ANDREEV I, **BETEKHTIN A**, ROJEK M, PARNIKOZA I, MYRYUTA G, PORONNIK O, MIRYUTA N, SZYMANOWSKA-PULKA J, GRAKHOV V, IVANNIKOV R, HASTEROK R, KUNAKH V (2018) Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Polish Polar Research* 39: 525-548, DOI: 10.24425/118759



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

**Poza aktywnością badawczą** prowadzę wykłady oraz inne zajęcia dydaktyczne na studiach I, II i III stopnia, a także różne zajęcia szkoleniowe. Byłem opiekunem jednej pracy magisterskiej oraz promotorem w trzech pracach licencjackich. Obecnie jestem promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich. Od lutego 2020 r. pełnię funkcję koordynatora ds. wymiany międzynarodowej w Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (dawniej WBiOŚ, UŚ). Pomagałem także w organizowaniu międzynarodowej konferencji naukowej pt. **Plant Molecular Cytogenetics in Genomic and Postgenomic Era**, jaka miała miejsce w Katowicach w dniach 23-24 września 2014 r.

### **Osiągnięcia dydaktyczne:**

**Prowadzenie następujących wykładów autorskich na studiach I stopnia** w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:

*Biotechnologia dla biologów* (rok akademicki 2019/2020)

**Prowadzenie następujących wykładów autorskich na studiach I stopnia** w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:

*Biotechnologia roślin* (rok akademicki 2019/2020)

**Prowadzenie ćwiczeń na studiach I stopnia** w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:

*Biologia komórki* (rok akademicki 2013/2014-2015/2016; 2017/2018- 2018/2019)

*Biotechnologia dla biologów* (rok akademicki 2015/2016-2019/2020)

*Inżynieria genetyczna* (rok akademicki 2013/2014; 2015/2016-2018/2019).

*Kultury in vitro w biotechnologii* (rok akademicki 2013/2014-2015/2016; 2017/2018-2018/2019)

*Podstawy procesów życiowych* (rok akademicki 2015/2016)

**Prowadzenie ćwiczeń na studiach II stopnia w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:**

*Biotechnologia roślin* (rok akademicki 2013/2014; 2015/2016-2019/2020).

*Cytogenetyka molekularna* (rok akademicki 2014/2015-2015/2016; 2017/2018)

*Podstawy Biotechnologii roślin* (rok akademicki 2013/2014-2014/2015; 2016/2017-2018/2019)

**Prowadzenie ćwiczeń w języku angielskim na studiach III stopnia w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:**

*Advanced Molecular Cytogenetics* (rok akademicki 2013/2014-2017/2018; 2019/2020).

**Wykład na zaproszenie w ramach programu BIO-TALENT (FP7-ERACChairs-Pilor Call-2013) pt. ‘Using of fluorescence *in situ* hybridisation in analysis of the plant genomes’,** wygłoszony w Instytucie Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań (23.11.2019)

**Wykład na zaproszenie pt. ‘Calli of Tartary buckwheat as unique *in vitro* plant system to study the stability of nuclear genome’,** wygłoszony na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, Kraków (12.09.2019).

### **Opieka naukowa nad studentami w toku specjalizacji:**

**Promotor prac licencjackich,** Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin; kierunek studiów Biologia, Biotechnologia:

1. *Nowotwory roślin* (2014-2015), lic. Anna Rudawska.
2. *Technika CRISPR/Cas 9 u roślin i zwierząt* (2015-2016), lic. Halina Belei.

3. *Komórki kambialne merystematyczne oraz ich zastosowanie w praktyce* (2017-2018), lic. Daniel Pieściński.

**Opiekun naukowy pracy magisterskiej**, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin; kierunek studiów Biotechnologia, specjalność Biotechnologia Roślin Użytkowych:

1. *Analiza cytogenetyczna polimorfizmu liczby i rozmieszczenia loci rDNA u wybranych gatunków rodzaju Festuca* (2016-2017), mgr Beata Weiss; promotor dr hab. Bożena Kolano, prof. UŚ.

**Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego:**

1. mgr Karolina Hus (2016-obecnie) *Wykorzystanie systemu ukierunkowanej mutagenezy CRISPR/Cas9 w edycji i badaniach genomów Brachypodium distachyon i B. hybridum*, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska; promotor prof. dr hab. Robert Hasterok.

2. mgr Artur Piński (2017-obecnie) *Genetyczne uwarunkowania interakcji bakterii endofitycznych z modelem dla roślin jednoliściennych, Brachypodium distachyon*, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska; promotor prof. dr hab. Robert Hasterok.

**Opiekun naukowy naukowców wizytujących:**

1. Prowadzenie badań naukowych (10.03.2014-10.06.2014), The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine, Daria Navrotska, doktorant.

2. Prowadzenie badań naukowych (23.09.2016-23.02.2017), Namik Kemal University, Tekirdag, Turkey, Gulru Yucell, doktorant.

3. Prowadzenie badań naukowych (12.11.2016-12.12.2016), The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine, Anastasija Halieieva, magistrant.

4. Prowadzenie badań naukowych, projekt naukowy finansowany przez Visegrad Scholarship Programme (1.02.2018-31.07.2018), The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine, Daria Navrotska, doktorant.

5. Prowadzenie badań naukowych (1.06.2018-1.08.2018), Ataturk University, Turkey, Murat Aydin, adiunkt.

6. Prowadzenie badań naukowych (17.07.2019-17.08.2019), Berkeley University of California, USA, Virginia Markham, doktorant.

**7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

Moje osiągnięcia naukowo-badawcze zostały wyróżnione następującymi nagrodami:

**Nagrody przyznawane przez Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:**

- (i) *Zespołowa nagroda specjalna Rektora Uniwersytetu Śląskiego I Stopnia* (2019)
- (ii) *Zespołowa nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego I stopnia* (2014)

**Nagrody krajowe:**

- (i) *Stypendium naukowe dla wybitnych młodych naukowców* przyznane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2015-2018)
- (ii) *Krajowa Nagroda Naukowa z zakresu genetyki roślin im. Stefana Barbackiego II stopnia, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu* (2013)

**Udział w warsztatach:**

7-8 września 2015, CRISPR-Cas Workshop, John Innes Centre, Norwich, UK

24 lutego 2020, Kursy: Zasady realizacji i rozliczenia projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Rozwoju kompetencji młodych naukowców w

zarządzaniu oraz kierowaniu własnymi zespołami badawczymi, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice

28 lutego 2020, Efektywne zarządzanie zespołem sprzedaży, Silesia Lex, Katowice

## Piśmiennictwo

- Bairu, M.W., Aremu, A.O. i Van Staden, J.** (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, **63**, 147-173.
- Baránek, M., Křížan, B., Ondrušíková, E. i Pidra, M.** (2010) DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**, 11-22.
- Betekhtin, A., Jenkins, G. i Hasterok, R.** (2014) Reconstructing the evolution of brachypodium genomes using comparative chromosome painting. *PLoS One*, **9**, e115108.
- Betekhtin, A., Milewska-Hendel, A., Lusinska, J., Chajec, L., Kurczynska, E. i Hasterok, R.** (2018) Organ and tissue-specific localisation of selected cell wall epitopes in the zygotic embryo of *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**.
- Betekhtin, A., Rojek, M., Jaskowiak, J., Milewska-Hendel, A., Kwasniewska, J., Kostyukova, Y., Kurczynska, E., Romyantseva, N. i Hasterok, R.** (2017) Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *PLoS One*, **12**, e0173537.
- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Guyot, R., Bertrand, B., Georget, F., Dechamp, E., Herrera, J.-C., Aribi, J., Lashermes, P. i Etienne, H.** (2015) Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **122**, 517-531.
- Borowska-Zuchowska, N., Robaszkiewicz, E., Wolny, E., Betekhtin, A. i Hasterok, R.** (2019) Ribosomal DNA loci derived from *Brachypodium stacei* are switched off for major parts of the life cycle of *Brachypodium hybridum*. *Journal of Experimental Botany*, **70**, 805-815.
- Brar, D.S. i Jain, S.M.** (1998) Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* (Jain, S.M., Brar, D.S. i Ahloowalia, B.S. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 15-37.
- Brisibe, E.A., Miyake, H., Taniguchi, T. i Maeda, E.** (1994) Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *New Phytologist*, **126**, 301-307.
- Cai, T. i Butler, L.** (1990) Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **20**, 101-110.
- Catalan, P., Chalhoub, B., Chochois, V., Garvin, D.F., Hasterok, R., Manzaneda, A.J., Mur, L.A., Pecchioni, N., Rasmussen, S.K., Vogel, J.P. i Voxeur, A.** (2014) Update on the genomics and basic biology of Brachypodium: International Brachypodium Initiative (IBI). *Trends in Plant Science*, **19**, 414-418.
- Chapman, A., Blervacq, A.-S., Vasseur, J. i Hilbert, J.-L.** (2000) Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, **211**, 305-314.
- Chen, H.** (2014) *Chemical composition and structure of natural lignocellulose*: Springer Netherlands.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U. i Jurgens, G.** (2010) Embryogenesis - the humble beginnings of plant life. *Plant Journal*, **61**, 959-970.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J. i Bacic, A.** (2010) Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology*, **153**, 403.
- Fehér, A., Pasternak, T.P. i Dudits, D.** (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **74**, 201-228.
- Filipecki, M., Yin, Z., Wisniewska, A., Smiech, M., Malinowski, R. i Malepszy, S.** (2006) Tissue-culture-responsive and autotetraploidy-responsive changes in metabolic profiles of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Applied Genetics*, **47**, 17-21.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. i Dennis, E.S.** (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 5824-5829.
- Footitt, S., Ingouff, M., Clapham, D. i von Arnold, S.** (2003) Expression of the viviparous 1 (Pavp1) and p34cdc2 protein kinase (cdc2Pa) genes during somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst). *Journal of Experimental Botany*, **54**, 1711-1719.

- Fras, A., Juchimiuk, J., Siwinska, D. i Maluszynska, J.** (2007) Cytological events in explants of *Arabidopsis thaliana* during early callogenesis. *Plant Cell Reports*, **26**, 1933-1939.
- Fras, A. i Maluszynska, J.** (2003) Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* via callus. *Acta Biologica Cracoviensia, series Botanica*, **45**, 145-152.
- Freytag, A.H., Rao-Arelli, A.P., Anand, S.C., Wrather, J.A. i Owens, L.D.** (1989) Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. *Plant Cell Reports*, **8**, 199-202.
- Gaj, M.D., Zhang, S., Harada, J.J. i Lemaux, P.G.** (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta*, **222**, 977-988.
- Garvin, D.F., Gu, Y.Q., Hasterok, R., Hazen, S.P., Jenkins, G., Mockler, T.C., Mur, L.A.J. i Vogel, J.P.** (2008) Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science*, **48**, S69-S84.
- Griffin, P.T., Niederhuth, C.E. i Schmitz, R.J.** (2016) A comparative analysis of 5-azacytidine- and zebularine-induced DNA demethylation. *G3 (Bethesda)*, **6**, 2773-2780.
- Gupta, N., Sharma, S.K., Rana, J.C. i Chauhan, R.S.** (2011) Expression of flavonoid biosynthesis genes vis-a-vis rutin content variation in different growth stages of *Fagopyrum* species. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 2117-2123.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. i Vibe Scheller, H.** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, **153**, 384-395.
- Hirochika, H.** (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J*, **12**, 2521-2528.
- Hofmann, N.R.** (2016) A Breakthrough in monocot transformation methods. *Plant Cell*, **28**, 1989.
- IBI** (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, **463**, 763-768.
- Jaligot, E., Beule, T., Baurens, F.C., Billotte, N. i Rival, A.** (2004) Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the mantled variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Genome*, **47**, 224-228.
- Ji, L., Mathioni, S.M., Johnson, S., Tucker, D., Bewick, A.J., Do Kim, K., Daron, J., Slotkin, R.K., Jackson, S.A., Parrott, W.A., Meyers, B.C. i Schmitz, R.J.** (2019) Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *Plant Cell*, **31**, 2315-2331.
- Joachimiak, A. i Ilnicki, T.** (2003) Nuclear morphology, polyploidy and chromatin elimination in tissue culture of *Allium fistulosum*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **72**, 11-17.
- Johnston, J.W., Benson, E.E. i Harding, K.** (2009) Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 123-131.
- Kamalova, G.V., Akulov, A.N. i Rumyantseva, N.I.** (2009) Comparison of redox state of cells of tatar buckwheat morphogenic calluses and non-morphogenic calluses obtained from them. *Biochemistry (Mosc)*, **74**, 686-694.
- Karp, A.** (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In *Plant Cell and Tissue Culture* (Vasil, I.K. i Thorpe, T.A. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 139-151.
- Kurczynska, E., Potocka, I., Dobrowolska, I., Kulinska-Lukaszek, K., Sala, K. i Wrobel, J.** (2012a) Cellular markers for somatic embryogenesis. In *Embryogenesis* (Sato, K.I. ed: InTech).
- Kurczynska, E.U., Potocka, I., Dobrowolska, I., Kulinska-Lukaszek, K., Sala, K. i Wrobel, J.** (2012b) Cellular markers for somatic embryogenesis. In *Embriogenesis* (Sato, K.-I. ed, pp. 307-332).
- Lambé, P., Mutambel, H.S.N., Deltour, R. i Dinant, M.** (1998) Somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*): Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **55**, 23-29.
- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F. i Apel, K.** (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 10270-10275.
- Li, X., Xu, M. i Korban, S.S.** (2002) DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 1229-1234.
- Lusinska, J., Betekhtin, A., Lopez-Alvarez, D., Catalan, P., Jenkins, G., Wolny, E. i Hasterok, R.** (2019) Comparatively barcoded chromosomes of *Brachypodium* perennials tell the story of their karyotype structure and evolution. *Int J Mol Sci*, **20**.
- Lusinska, J., Majka, J., Betekhtin, A., Susek, K., Wolny, E. i Hasterok, R.** (2018) Chromosome identification and reconstruction of evolutionary rearrangements in *Brachypodium distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum*. *Ann Bot*, **122**, 445-459.
- Malepszy, S.** (2009) *Biotechnologia roślin* Warszawa: PWN.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J. i Matzke, A.J.** (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J*, **8**, 643-649.
- Mazarei, M., Al-Ahmad, H., Rudis, M.R., Joyce, B.L. i Stewart, C.N., Jr.** (2011) Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. *Plant Science*, **181**, 712-715.

- Mohan Jain, S. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, **118**, 153-166.
- Mohd Din, A.R., Ilyas Ahmad, F., Wagiran, A., Abd Samad, A., Rahmat, Z. i Sarmidi, M.R. (2016) Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, **23**, S69-77.
- Montero-Cortés, M., Rodríguez-Paredes, F., Burgeff, C., Pérez-Nuñez, T., Córdova, I., Oropeza, C., Verdeil, J.-L. i Sáenz, L. (2010) Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **102**, 251-258.
- Nakano, M., Tanaka, S., Oota, M., Ookawa, E., Suzuki, S. i Saito, H. (2003) Regeneration of diploid and tetraploid plants from callus-derived protoplasts of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **72**, 63-69.
- Nibau, C., Lloyd, A.H., Dadarou, D., Betekhtin, A., Tsilimigka, F., Phillips, D.W. i Doonan, J.H. (2020) CDKG1 is required for meiotic and somatic recombination intermediate processing in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Ning, S.B., Wang, L. i Song, Y.C. (2002) Identification of programmed cell death *in situ* in individual plant cells *in vivo* using a chromosome preparation technique. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 651-658.
- Ovečka, M. i Bobák, M. (1999) Structural diversity of *Papaver somniferum* L. cell surfaces *in vitro* depending on particular steps of plant regeneration and morphogenetic program. *Acta Physiologiae Plantarum*, **21**, 117-126.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. i Olhoft, P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5222-5226.
- Pijnacker, L.P. i Ferwerda, M.A. (1990) Effect of sucrose on polyploidization in early callus cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **21**, 153-157.
- Pilarska, M., Popielarska-Konieczna, M., Ślesak, H., Koziernadzka-Kiszkurno, M., Goralski G, Konieczny R, Bohdanowicz, J. i Kuta, E. (2013) Extracellular matrix surface network is associated with non-morphogenic calli of *Helianthus tuberosus* cv. Albik produced from various explants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **83**, 67-73.
- Pinski, A., Betekhtin, A., Sala, K., Godel-Jedrychowska, K., Kurczynska, E. i Hasterok, R. (2019) Hydroxyproline-rich glycoproteins as markers of temperature stress in the leaves of *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**.
- Popielarska-Konieczna, M., Bohdanowicz, J. i Starnawska, E. (2010) Extracellular matrix of plant callus tissue visualized by ESEM and SEM. *Protoplasma*, **247**, 121-125.
- Popielarska-Konieczna, M., Koziernadzka-Kiszkurno, M., Swierczynska, J., Goralski, G., Slesak, H. i Bohdanowicz, J. (2008) Are extracellular matrix surface network components involved in signalling and protective function? *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 707-709.
- Rancour, D.M., Marita, J.M. i Hatfield, R.D. (2012) Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 266.
- Roja-Herrera, R., Quiroz-Figueroa, F., Monforte-Gonzalez, M., Sanchez-Teyer, L. i Loyola-Vargas, V.M. (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Molecular Biotechnology*, **21**, 43-50.
- Roy, S.C. (1980) Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *A. cepa*. *Protoplasma*, **102**, 171-176.
- Rumyantseva, N.I., Samaj, J., Ensikat, H.J., Salnikov, V.V., Kostyukova, Y.A., Baluska, F. i Volkmann, D. (2003) Changes in the extracellular matrix surface network during cyclic reproduction of proembryogenic cell complex in the *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. . *Doklady Biological Sciences*, **391**, 375-378.
- Rumyantseva, N.I., Sergejewa, N.B., Khakimova, L.E., Salnikov, B.B., Gumerova, E.A. i Lozowaja, B.B. (1989) Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue culture of two buckwheat species. *Russian Journal of Plant Physiology*, **36**, 187-194.
- Salinas, A.E. i Wong, M.G. (1999) Glutathione S-transferases-a review. *Current Medicinal Chemistry*, **6**, 279-309.
- Šamaj, J., Bobák, M., Blehová, A., Křištin, J. i Auxtová-Šamajová, O. (1995) Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays*. *Protoplasma*, **186**, 45-49.
- Šamaj, J., Bobák, M., Blehová, A. i Pret'ová, A. (2006) Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis* (Mujib, A. i Šamaj, J. eds). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 35-50.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T. i Nishimura, T. (2012) DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 766-784.
- Seifert, G.J. i Blaukopf, C. (2010) Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiology*, **153**, 467-478.

- Sharma, R., Sahoo, A., Devendran, R. i Jain, M. (2014) Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in Arabidopsis. *PLoS One*, **9**, e92900.
- Shibuya, K., Fukushima, S. i Takatsuji, H. (2009) RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 1660-1665.
- Showalter, A.M. (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 1399-1417.
- Smulders, M.J.M. i Klerk, D.G.-J. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* **63**, 137-146.
- Suzuki, T., Morishita, T., Kim, S.-J., Park, S.-U., Woo, S.-h., Noda, T. i Takigawa, S. (2015) Physiological roles of rutin in the buckwheat plant. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, **49**, 37-43.
- Sytar, O., Biel, W., Smetanska, I. i Brestic, M. (2018) Chapter nineteen - bioactive compounds and their biofunctional properties of different buckwheat germplasm for food processing. In *Buckwheat Germplasm in the World* (Zhou, M., Kreft, I., Suvorova, G., Tang, Y. i Woo, S.H. eds): Academic Press, pp. 191-204.
- Terletskaia, N., Khailenko, N. i Zhambakin, K. (2013) Stability of cereal crops to drought and saline stress *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Life Sciences*, **2**, 135-144.
- Toonen, M.A.J., Schmidt, E.D.L., van Kammen, A. i de Vries, S.C. (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, **203**, 188-195.
- Torres, K.C. (1989) Callus induction in grasses. In *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops* (Torres, K.C. ed. Boston, MA: Springer US, pp. 116-121.
- Vanyushin, B.F. i Ashapkin, V.V. (2011) DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1809**, 360-368.
- Vanyushin, B.F., Shorning, B.Y., Seredina, A.V. i Aleksandrushkina, N.I. (2002) The effects of phytohormones and 5-Azacytidine on apoptosis in etiolated wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, **49**, 501-506.
- Verdeil, J.L., Alemanno, L., Niemenak, N. i Tranbarger, T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science*, **12**, 245-252.
- Wan, Y. i Lemaux, P.G. (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*, **104**, 37-48.
- Wang, Q.M. i Wang, L. (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, **31**, 1535-1547.
- Wang, X., Li, H., Wang, M. i Yang, Z. (2010) Regulatory networks of somatic embryogenesis in plant. *Chinese journal of biotechnology*, **26**, 141-146.
- Weckx, S., Inze, D. i Maene, L. (2019) Tissue culture of oil palm: finding the balance between mass propagation and somaclonal variation. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 722.
- Winkelmann, T. (2016) Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *Methods in Molecular Biology*, **1359**, 25-46.
- Yamamoto, N., Kobayashi, H., Togashi, T., Mori, Y., Kikuchi, K., Kuriyama, K. i Tokuji, Y. (2005) Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 47-54.
- Yang, X. i Zhang, X. (2010a) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **29**, 36-57.
- Yang, X. i Zhang, X. (2010b) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **29**, 36-57.
- Zarzecka, K., Gugala, M. i Mystkowska, I. (2014) Wartość odżywcza i możliwości wykorzystania gryki *Postępy fitoterapii* **1**, 28-31.
- Zhang, G., Xu, Z., Gao, Y., Huang, X., Zou, Y. i Yang, T. (2015) Effects of germination on the nutritional properties, phenolic profiles, and antioxidant activities of buckwheat. *Journal of Food Science*, **80**, H1111-1119.
- Zhou, M., Tang, Y., Deng, X., Ruan, C., Kreft, I., Tang, Y. i Wu, Y. (2018) Chapter one - overview of buckwheat resources in the world. In *Buckwheat Germplasm in the World* (Zhou, M., Kreft, I., Suvorova, G., Tang, Y. i Woo, S.H. eds): Academic Press, pp. 1-7.

  
(A Bolek)