

**Załącznik nr 2**

**AUTOREFERAT**

**dr Agnieszka Janiak**

**Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice**

**Katowice, 2020**

1. **Imię i nazwisko:** Agnieszka Janiak

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne** – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**2005: Doktor nauk biologicznych;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Mapowanie genów odpowiedzialnych za rozwój włóśników u *Hordeum vulgare* L. z wykorzystaniem markerów DNA*”.

Promotor: prof. dr hab. Iwona Szarejko

**2001: Magister biologii, specjalność biotechnologia;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Tytuł pracy magisterskiej: „*Analiza genetyczna i molekularna mutantów jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) o zmienionej morfologii korzeni zarodkowych i włóśników*”.

Promotor: prof. dr hab. Iwona Szarejko

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu** w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**2019 – obecnie: adiunkt;** Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach; ½ etatu

**2018 – 2019: starszy wykładowca;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach; ½ etatu

**2006 – 2018: adiunkt;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach; pełny etat

**2006 – 2007: post-doc;** Seoul National University, College of Agriculture and Life Sciences, Korea Południowa

**2005 – 2006: asystent naukowo-dydaktyczny;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach; 9/10 etatu

**2002 – 2005: asystent naukowo-dydaktyczny;** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach; ½ etatu

**2000 – 2001: pracownik inżynierjno-techniczny,** Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

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

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Identyfikacja i charakterystyka genów odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia z wykorzystaniem metod globalnej analizy transkryptomów i szczególnym uwzględnieniem genów odpowiedzi na stres suszy ulegających ekspresji w korzeniach

## b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

<sup>1</sup>Wartość wskaźnika Impact Factor (IF) według Journal Citation Reports (Thomson Reuters) dla artykułów naukowych opublikowanych przed rokiem 2019 podano zgodnie z rokiem ich opublikowania; dla publikacji z roku 2019 podano IF 5-letni,

<sup>2</sup>Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych obowiązującym na koniec roku kalendarzowego, w którym ukazała się publikacja,

<sup>3</sup>Dodatkowo, ze względu na zmiany w sposobie wyliczania punktów dla czasopism, podano punktację MNiSW według wykazu obowiązującego od 18 grudnia 2019 roku,

<sup>4</sup>Cytowania publikacji podano za bazą Web of Science (WoS).

Dane bibliograficzne	IF <sup>1</sup>	MNiSW <sup>2</sup>	MNiSW (bieżące) <sup>3</sup>	Cytowania <sup>4</sup>
1. <b>Janiak A</b> , Kwasniewski M, Szarejko I. 2016. Gene expression regulation in roots under drought. <i>Journal of Experimental Botany</i> 67(4): 1003-14	5,83	45	140	54
Mój udział w powstaniu tej publikacji oceniam na 90%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, wykonaniu syntezy dostępnych informacji o genach zaangażowanych w regulację odpowiedzi na suszę w korzeniach różnych gatunków roślin, przygotowaniu treści manuskryptu i rycin oraz końcowej redakcji tekstu po otrzymanych recenzjach. Jestem autorem korespondencyjnym tego artykułu.				
2. <b>Janiak A</b> , Kwasniewski M, Sowa M, Gajek K, Żmuda K, Kościelniak J, Szarejko I. 2018. No time to waste: transcriptome study reveals that drought tolerance in barley may be attributed to stressed-like expression patterns that exist before the occurrence of stress. <i>Front. Plant Sci.</i> 8:2212. doi: 10.3389/fpls.2017.02212	4,106	40	100	7
Mój udział w powstaniu tej publikacji oceniam na 70%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu niezbędnych eksperymentów, wykonaniu analiz molekularnych związanych z izolacją i oczyszczaniem RNA, wykonaniu anotacji sond z użytej mikromacierzy względem genomu jęczmienia, przeprowadzeniu bioinformatycznej analizy genów ulegających zróżnicowanej ekspresji podczas stresu, z wykorzystaniem dostępnych baz danych obejmujących funkcje i ontologie genów, przeprowadzeniu szerokiej analizy danych literaturowych w celu przyporządkowania zidentyfikowanych genów do określonych ścieżek metabolicznych i procesów biologicznych, opracowaniu uzyskanych wyników, przygotowaniu treści manuskryptu, tabel i rycin oraz końcowej redakcji tekstu po otrzymanych recenzjach. Jestem autorem korespondencyjnym tego artykułu.				

<p>3. <b>Janiak A</b>, Kwasniewski M, Sowa M, Kuczynska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Szarejko I. 2019. Insights into barley root transcriptome under a mild drought stress with the emphasis on gene expression regulatory mechanisms. Int. J. Mol. Sci. 20, 6139; <a href="https://doi.org/10.3390/ijms20246139">https://doi.org/10.3390/ijms20246139</a></p>	4,331	140	140	0
---	-------	-----	-----	---

Mój udział w powstaniu tej publikacji oceniam na 80%. Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu niezbędnych eksperymentów, przeprowadzeniu zbioru materiału do analiz transkryptomów liści i korzeni, oczyszczeniu i przygotowaniu prób RNA do rozpoczęcia procedury hybrydyzacji z mikromacierzą, wykonaniu annotacji sond z użytej mikromacierzy względem nowej wersji genomu jęczmienia, przeprowadzeniu bioinformatycznej analizy genów ulegających zróżnicowanej ekspresji podczas stresu, z wykorzystaniem dostępnych baz danych obejmujących funkcje i ontologie genów, wytypowaniu z całej puli zidentyfikowanych transkryptów tych genów, które kodują czynniki transkrypcyjne, porównaniu zmian w transkryptomach korzeni jęczmienia zachodzących pod wpływem stresów o zróżnicowanej intensywności, przeprowadzeniu szerokiej analizy danych literaturowych w celu przyporządkowania zidentyfikowanych genów do określonych ścieżek metabolicznych i procesów biologicznych, nakreśleniu możliwych zależności regulacyjnych, zależnych od zidentyfikowanych czynników transkrypcyjnych, opracowaniu uzyskanych wyników, przygotowaniu treści manuskryptu, tabel i rycin oraz końcowej redakcji tekstu po otrzymanych recenzjach. Jestem autorem korespondencyjnym tego artykułu.

- Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **14,261**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, według roku publikacji: **225**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, według wykazu z dnia 18 grudnia 2019: **380**

#### c) Patenty wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Janiak A.**, Kwaśniewski M., Guzy-Wróbelska M., Sowa M. 2019. **Patent nr 233338 na wynalazek:** “Sekwencja starterów i sposób analizy poziomu ekspresji genów HvDHN4, HvDHN7, HvPRX6 i HvPRX10 jęczmienia oraz sposób identyfikacji odmian jęczmienia tolerancyjnych na suszę”; [75 pkt]
2. **Janiak A.**, Kwaśniewski M., Guzy-Wróbelska M., Sowa M. 2019. **Patent nr 233339 na wynalazek:** “Sekwencja starterów dla sekwencji genomowych genów HvDHN4, HvDHN7, HvPRX6 i HvPRX10 i sposób amplifikacji ich fragmentów genomowych oraz sposób genotypowania odmian jęczmienia na podstawie identyfikacji alleli tych genów”; [75 pkt]

Punktacja za patenty podana na podstawie Rozporządzenia MNiSW z dnia 22 lutego 2019 r., w sprawie ewaluacji jakości działalności naukowej

Uzyskane patenty stanowią rezultat prac badawczych prowadzonych w ramach projektu POLAPGEN-BD. Mój udział w powstaniu każdego z nich wynosi 40% i jest wynikiem przeprowadzonej analizy ekspresji genów opartej o linie i odmiany jęczmienia o zróżnicowanej tolerancji na stres suszy, połączonej z genotypowaniem tych odmian pod względem alleli dla zidentyfikowanych genów, istotnych z punktu widzenia odpowiedzi jęczmienia na stres suszy. Mój wkład w ich powstanie polegał na wytypowaniu genów w sposób istotny zaangażowanych w odpowiedź na suszę, których ekspresję można badać z wykorzystaniem liści jako materiału wyjściowego, zaprojektowaniu starterów do przeprowadzenia odpowiednich amplifikacji z wykorzystaniem cDNA i genomowego DNA, zaprojektowaniu profili reakcji amplifikacji oraz przygotowaniu treści wniosków do Urzędu Patentowego RP.

#### **d) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników**

Susza jest jednym z czynników abiotycznych mających istotny, negatywny wpływ na plon roślin uprawnych i zmniejszenie wydajności produkcji rolnej, co pociąga za sobą obniżenie bezpieczeństwa żywnościowego. Dlatego też w ostatnich latach kładzie się coraz większy nacisk na badania mające na celu minimalizowanie skutków tego zjawiska. Ważnym aspektem tych badań jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzi na stres suszy u roślin uprawnych oraz poszukiwanie czynników genetycznych i molekularnych mogących poprawić tolerancję roślin na ten stres. Wskazanie genów tolerancji na stres suszy jest pierwszym warunkiem do zainicjowania programów hodowlanych w kierunku otrzymania odmian utrzymujących wysoki plon nawet w warunkach przejściowych niedoborów wody. Niemniej jednak, istotną trudnością w wyborze takich genów jest niezwykle złożony mechanizm odpowiedzi roślin na stres, w który zaangażowanych jest bardzo wiele genów kodujących białka uczestniczące w szerokim spektrum ścieżek biochemicznych i regulujących niemal wszystkie procesy fizjologiczne rośliny. Zakres zmian obserwowanych na poziomie molekularnym jest jednocześnie zależny od długości trwania stresu oraz od stopnia jego natężenia, a także od fazy rozwojowej rośliny, podczas której doświadcza ona niedoboru wody. Ogólnie, wyróżnić można dwie główne strategie, za pomocą których rośliny radzą sobie ze stresem suszy. Pierwszą jest przejściowa reakcja na niedobór wody polegająca przede wszystkim na zredukowaniu transpiracji poprzez zamknięcie aparatów szparkowych oraz ochronie przed utratą wody przez uruchomienie procesów osmoprotekcyjnych. Z kolei druga, bardziej długofalowa strategia obejmuje wprowadzenie większych zmian na poziomie rozwojowym prowadzących do rozwoju systemu korzeniowego, zredukowaniu powierzchni liści, ochronie komórek przed uszkodzeniami powodowanymi przez stres oksydacyjny, a także dalszym dostosowaniem mechanizmów osmotycznych do zmniejszonej dostępności wody w glebie (Hu and Xiong, 2014). Oba mechanizmy wiążą się z istotną przebudową

metabolizmu, odzwierciedloną na poziomie zmian w ekspresji genów odpowiedzialnych za wiele procesów życiowych zachodzących w komórkach.

Jednocześnie należy podkreślić, że zdecydowana większość badań nad mechanizmami odpowiedzi roślin na stres suszy koncentruje się na procesach zachodzących w nadziemnych częściach rośliny, przede wszystkim w liściach. Znacznie mniej badań dotyczy korzeni, choć to właśnie system korzeniowy jest pierwszym miejscem, które doświadcza stresu związanego z niedoborem wody i pozwala na detekcję oraz późniejsze przekazanie sygnału o zmniejszającej się dostępności wody w podłożu. Z tego też względu korzenie wydają się kluczowym organem, w dużej mierze decydującym o efektywności odpowiedzi na stres niedoboru wody ostatecznie w całej roślinie.

Biorąc pod uwagę rolę systemu korzeniowego w percepcji stresu suszy, **za główny cel prowadzonych badań postawiono sobie identyfikację genów związanych z odpowiedzią na stres niedoboru wody w korzeniach jęczmienia**, jednego z ważnych gatunków uprawnych zbóż, którą prowadzono w oparciu o globalną analizę transkryptomów. Wybór takiej metody analitycznej podyktowany był wspomnianą złożonością odpowiedzi roślin na suszę na poziomie molekularnym, dając szansę na odkrycie możliwie pełnego spektrum czynników i stojących za nimi mechanizmów biochemicznych, odpowiedzialnych za reakcję na niedobór wody. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w publikacjach stanowiących główne osiągnięcie naukowe, a także stały się podstawą do uzyskania dwóch patentów, w których wykorzystano część rezultatów otrzymanych z analiz transkryptomicznych.

### **Charakterystyka mechanizmów regulacji ekspresji genów w korzeniach podczas stresu suszy**

Ważną częścią prowadzonych prac było nakreślenie znanych mechanizmów, które regulują ekspresję genów w warunkach niedoboru wody w glebie. Do tego celu posłużyła przygotowana przeze mnie praca przeglądowa (**Janiak i inni, 2016**), koncentrująca się na zebraniu dotychczasowej wiedzy o ścieżkach sygnalizacji stresu suszy oraz o spektrum czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję genów odpowiedzi na suszę działających w korzeniach różnych gatunków roślin.

Dostępne dane na temat mechanizmów molekularnych kontrolujących odpowiedź na stres suszy w korzeniach wskazują, że percepcja tego stresu może zależeć od działania kinazy histydynowej homologicznej do kinazy Sln1 drożdży, która związana jest z monitorowaniem zmian w ciśnieniu turgorowym komórki (**praca przeglądowa: Janiak i inni, 2016**; za Urao i inni, 1999). W momencie pojawienia się niedoboru wody w glebie, geny kodujące homologi kinazy Sln1 ulegają wzmożonej ekspresji, prowadząc do aktywacji kaskady transdukcji sygnału opartej o fosforylację, w której rolę mogą odgrywać kinazy MAPK, co stwierdzono w badaniach prowadzonych dla jabłoni (**praca przeglądowa: Janiak i inni, 2016**; za Peng i inni, 2006). Ścieżka przekazywania sygnałów komórkowych zależy także od obecności reaktywnych form tlenu (Reactive Oxygen Species, ROS), przy czym analizując dostępne

dane trudno jest jednoznacznie oddzielić mechanizmy przekazywania sygnału o stresie niedoboru wody za pomocą ROS od zjawiska stresu oksydacyjnego, który pojawia się na skutek suszy w komórkach korzeni i jest procesem niekorzystnym, wymagającym włączenia ścieżek antyoksydacyjnych chroniących komponenty komórki przed możliwymi uszkodzeniami (**praca przeglądowa: Janiak i inni, 2016**).

Istotną rolę w odpowiedzi na stres w korzeniach pełnią także hormony roślinne, przede wszystkim kwas abscysynowy (ABA), który można określić jako uniwersalny hormon odpowiedzi na stres, działający także w części nadziemnej rośliny. Hormon ten wchodzi w interakcję ze ścieżką auksynową, a balans między ABA i auksyną jest istotny dla utrzymania wzrostu korzeni i rozwoju włośników przy umiarkowanym niedoborze wody w glebie (**praca przeglądowa: Janiak i inni, 2016**; za Xu i inni, 2012).

Percepcja stresu suszy pociąga za sobą zmiany w ekspresji szeregu genów kodujących czynniki transkrypcyjne, należących do wielu różnych rodzin, między innymi do rodziny DREB, AP2/ERF, NAC, bZIP, MYB/MYC, CAMTA, Alfin-like, Q-type ZFP, WRKY czy HD-START. Z kolei ich aktywacja (lub represja) prowadzi do modulacji takich procesów jak synteza osmoprotektantów, w tym dehydryn, białek LEA i chaperonów, uruchomienie systemów antyoksydacyjnych i detoksyfikacyjnych, zmiany w regulacji transportu jonowego, zmiany w kontroli cyklu komórkowego, oddychaniu komórkowym czy syntezy szeregu wtórnych metabolitów. Przemiany te, szczególnie w stresie o mniejszym natężeniu, mogą stymulować wzrost korzeni na długość, tworzenie zawiązków korzeni bocznych i wykształcanie większej proporcji masy korzeni do masy części nadziemnej roślin, prowadząc z jednej strony do aktywnego poszukiwania wody w głębszych warstwach gleby z jednoczesnym ograniczeniem jej utraty w procesie transpiracji (**praca przeglądowa: Janiak i inni, 2016**).

Nakreślone powyżej mechanizmy związane z regulacją odpowiedzi na stres suszy w korzeniach stanowiły punkt wyjścia do przeprowadzenia szczegółowych badań laboratoryjnych nad określeniem mechanizmów aktywnych podczas odpowiedzi na stres niedoboru wody przede wszystkim w tym organie. W badaniach tych posłużono się globalną analizą transkryptomów korzeni dwóch genotypów jęczmienia: syryjskiej linii hodowlanej Cam/B1/CI08887//CI05761 (CamB), charakteryzującej się wysoką tolerancją na stres suszy oraz europejskiej odmiany Maresi o niższej tolerancji na ten stres. Obok transkryptomów uzyskanych z korzeni analizowano także transkryptomy z drugiego liścia, dzięki czemu możliwy był wgląd w zamiany na poziomie ekspresji genów zarówno w części podziemnej jak i nadziemnej rośliny. Pozwoliło to na ocenę, czy geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w korzeniach są specyficznym związane z odpowiedzią na stres w tym organie, czy też mają znaczenie w odpowiedzi na suszę także w części nadziemnej. Ponadto, możliwe było wytypowanie możliwie pełnego spektrum genów potencjalnie zwiększających tolerancję na stres suszy, niezależnie od analizowanego organu. Przeprowadzone eksperymenty obejmowały także traktowanie roślin dwoma poziomami stresu suszy, dla uproszczenia

określonymi jako stres silny, w którym dostępność wody dla roślin znajdowała się na granicy trwałego punktu wędnięcia (**Janiak i inni, 2018**) oraz jako stres umiarkowany, w którym ilość wody w podłożu znajdowała się na poziomie wody trudno dostępnej (**Janiak i inni, 2019**). Omawiane analizy prowadzone były w ramach interdyscyplinarnego projektu POLAPGEN-BD, obejmującego 23 zadania badawcze, a finansowanego w ramach Działania 1.3, poddziałania 1.3.1 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. W projekcie tym byłam kierownikiem zadania 19, którego celem była **analiza globalnych profili ekspresji genów u form jęczmienia tolerancyjnych i wrażliwych na suszę**.

Przeprowadzone analizy transkryptomów pozwoliły na osiągnięcie następujących rezultatów:

### **1. Wskazano grupę genów potencjalnie zwiększających tolerancję na stres suszy**

Ze względu na fakt, że w prowadzonych analizach wykorzystano dwie odmiany jęczmienia różniące się stopniem tolerancji na stres niedoboru wody, możliwe było wytypowanie genów potencjalnie podwyższających tolerancję na ten stres. Generalną obserwacją jakiej dokonano było stwierdzenie, że u genotypu tolerancyjnego – CamB, liczba genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem silnej suszy była zdecydowanie niższa niż u odmiany Maresi, bardziej wrażliwej na ten stres. Obserwacja ta stała się przesłanką do sprawdzenia, czym różnią się transkryptomy obu analizowanych genotypów rosnących w warunkach kontrolnych i porównanie tych różnic do listy genów o zróżnicowanej ekspresji podczas suszy. Przyjęto założenie, że linia CamB może charakteryzować się podwyższonym poziomem ekspresji określonych genów jeszcze w warunkach kontrolnych, podczas gdy u odmiany Maresi geny te podlegają aktywacji dopiero w warunkach stresu. I podobnie, geny o inicjalnie niższej ekspresji w linii CamB mogą u odmiany Maresi ulegać wyhamowaniu ekspresji dopiero podczas suszy. Założenie to jest ilustracją hipotezy, że określona pula genów może stanowić o lepszej adaptacji do warunków suszy u tolerancyjnego genotypu, ze względu na aktywację (lub wyciszenie) odpowiednich komponentów wybranych ścieżek biochemicznych jeszcze przed nastaniem suszy, przygotowując niejako metabolizm komórkowy do szybszej reakcji w momencie pojawienia się niedoboru wody w glebie.

Ogółem zidentyfikowano 170 takich genów charakterystycznych wyłącznie dla korzeni, 237 genów charakterystycznych dla liści oraz 99 genów spełniających wspomniane założenie w obu analizowanych organach. Charakterystykę dużej grupy z tych genów przedstawiono w pracy **Janiak i inni (2018)**. W niniejszym opracowaniu warto wspomnieć kilka z nich, które ilustrują potencjalną rolę wybranych mechanizmów molekularnych w odpowiedzi na stres suszy w korzeniach jęczmienia. Jednym z takich genów jest gen kodujący czynnik transkrypcyjny ICE1, który reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych CBF/DREB1. Gen *DREB1* jest znanym czynnikiem podwyższającym tolerancję na stres



suszy (Zhang et al., 2013), stąd jego regulator *ICE1* również jest dobrym kandydatem istotnym w budowaniu tolerancji na ten stres. W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że ekspresja genu *ICE1* była wyższa w korzeniach genotypu CamB w porównaniu do odmiany Maresi już w warunkach kontrolnych, po czym podczas stresu suszy jego ekspresja uległa podwyższeniu u obu genotypów i w obu analizowanych organach. Wskazuje to na jego związek z odpowiedzią na stres w całej roślinie, przy czym możliwe jest, że pierwotny efekt jego działania ma miejsce właśnie na poziomie systemu korzeniowego. Dodatkowo, badania nad transgenicznymi roślinami *Arabidopsis* rosnącymi w warunkach stresu osmotycznego wskazują, że nadekspresja genu *ICE1* prowadzi do wykształcania dłuższego korzenia głównego i większej liczby korzeni bocznych (Xu i inni, 2014), co stanowi dobrą przesłankę do dalszych badań nad tym genem także u roślin jednoliściennych.

Ciekawym genem, który również wykazywał inicjalnie wyższą ekspresję w korzeniach linii CamB w porównaniu do Maresi w warunkach kontrolnych, natomiast po zadziałaniu stresu jego ekspresja rosła w korzeniach odmiany Maresi i malała w liściach obu genotypów, jest gen kodujący czynnik transkrypcyjny BEE z rodziny bHLH. Dane literaturowe sugerują, że czynniki transkrypcyjne BEE są pozytywnymi regulatorami sygnalizacji brassinosteroidów i jednocześnie pełnią rolę mediatorów między antagonistycznymi interakcjami odpowiedzi na brassinosteroidy i ABA. Profil ekspresji zidentyfikowanego czynnika transkrypcyjnego sugeruje jego odmienną rolę w odpowiedzi na stres suszy w liściach i korzeniach. Nie można wykluczyć, że jego aktywacja w części podziemnej może wpływać na utrzymanie wzrostu systemu korzeniowego podczas stresu, co sugerują dane dla linii z nadekspresją genów *BEE* u *Arabidopsis* (Friedrichsen et al., 2002).

Profil ekspresji zgodny z założoną hipotezą spełniły także dwa geny związane ze ścieżką syntezy brassinosteroidów: gen *DET2* zaangażowany we wczesną fazę syntezy tych hormonów, który charakteryzował się wyższą inicjalną ekspresją w korzeniach linii CamB oraz gen *CYP90D1* działający później w tej ścieżce i wykazujący niższą inicjalną ekspresję u genotypu tolerancyjnego na stres suszy. Badania nad *Arabidopsis* sugerują, że niskie stężenie egzogennych brassinosteroidów promuje wzrost korzeni, natomiast wysokie stężenia hamują ten proces (González-García et al., 2011). Zaobserwowany schemat ekspresji wspomnianych genów sugeruje, że właściwa proporcja enzymów z różnych etapów biosyntezy tych hormonów może mieć istotne znaczenie dla utrzymania optymalnej ilości brassinosteroidów w korzeniach podczas stresu niedoboru wody, prawdopodobnie umożliwiającej podtrzymanie wzrostu korzeni, ze szczególną rolą białka CYP90D1 w modulowaniu tempa syntezy tych hormonów.

Ciekawym i niezbadanym do tej pory u roślin genem, który również charakteryzował się niższym inicjalnym poziomem ekspresji w korzeniach linii CamB w porównaniu do Maresi jest homolog genu *ULK4*. Gen ten opisano u człowieka i drożdży jako związany między innymi z procesem autofagii, uruchamianym w okresie głodu (Mizushima, 2010; Lang et al., 2014). Niższa inicjalna ekspresja jego homologa w korzeniach genotypu tolerancyjnego i obniżenie jego ekspresji w korzeniach odmiany Maresi podczas suszy może

wskazywać na konieczność zahamowania autofagii w korzeniach, sprzyjając podtrzymaniu wzrostu komórek pomimo czasowego ograniczenia dostępności produktów fotosyntezy.

Poza wymienionymi powyżej przykładami genów o potencjalnej roli w kształtowaniu lepszej tolerancji na suszę u jęczmienia, zidentyfikowano także szereg innych genów, które mogą odgrywać istotną rolę w tolerancji na niedobór wody. Biorą one udział w takich procesach jak translacja, przekazywanie sygnałów komórkowych za pośrednictwem jonów wapnia, regulacji tworzenia cytoszkieletu aktynowego, procesach defosforylacji lub wykazujące aktywność kinaz z domeną LIM, a także uczestniczące w sygnalizacji związanej z odpowiednim stężeniem hormonów takich jak ABA czy etylen oraz w regulacji procesu degradacji białek poprzez ubiquitytację (**Janiak i inni, 2018**).

## **2. Zidentyfikowano blisko 1740 genów związanych z odpowiedzią na silny stres suszy specyficznych dla korzeni analizowanych genotypów jęczmienia**

Poza wytypowaniem genów o potencjalnej roli w tolerancji na stres niedoboru wody, w puli genów o zróżnicowanej ekspresji zidentyfikowano także czynniki, które określono jako związane z odpowiedzią korzeni jęczmienia na suszę. Były to geny wykazujące zróżnicowaną ekspresję pod wpływem stresu w porównaniu do warunków kontrolnych obserwowane u jednego lub obu badanych genotypów.

Zidentyfikowane geny kodują białka zaangażowane w wiele procesów biologicznych. Do najbardziej istotnych statystycznie należy regulacja podziałów komórkowych, regulacja metabolizmu DNA oraz replikacja. Z kolei największa liczba genów związana jest z metabolizmem związków niskocząsteczkowych, metabolizmem lipidów, przekazywaniem sygnałów komórkowych a także regulacją cyklu komórkowego. W tej grupie zidentyfikowano również geny kontrolujące metabolizm fruktozy, metabolizm lignin, biosyntezę kwasu fitowego, metabolizm ATP czy sygnalizację za pośrednictwem brassinosteroidów. Cała grupa tych genów pozwoliła zatem na nakreślenie spektrum zmian jakie zachodzą w metabolizmie komórek systemu korzeniowego pod wpływem silnego stresu suszy (**Janiak i inni, 2018**).

## **3. Zidentyfikowano geny ulegające zróżnicowanej ekspresji wyłącznie w korzeniach tolerancyjnego genotypu CamB podczas silnego stresu suszy**

Analiza ontologii 170 genów należących do tej grupy pozwoliła na wyłonienie nadreprezentowanych procesów biologicznych, w których biorą one udział (**Janiak i inni, 2018, Tabela 3**). Zaobserwowano, że procesy te reprezentują różne aspekty metabolizmu, przede wszystkim metabolizm związków niskocząsteczkowych, metabolizm lipidów oraz ATP, a także katabolizm białek. Do nadreprezentowanych procesów należały również podziały komórkowe oraz transdukcja sygnałów komórkowych. W każdej z tych grup obserwowano geny charakteryzujące się zarówno podwyższoną jak i obniżoną ekspresją pod

wpływem suszy, co dodatkowo obrazuje dużą dynamikę przemian transkryptomu na skutek stresu.

Dodatkowo, wyłoniono dwa nadreprezentowane procesy biologiczne, szczególnie charakterystyczne dla transkryptomów korzeni genotypu CamB (**Janiak i inni, 2018, Fig. 4**): proces fosforylacji oraz procesy rozwojowe. W pierwszej kategorii zidentyfikowano geny kodujące kinazy białkowe, z których większość miała obniżoną ekspresję pod wpływem suszy. W drugiej kategorii znalazły się: geny kodujące dwie kinazy z poprzedniej grupy (związaną z metabolizmem ATP oraz kinazę z domeną typu LIM) oraz pięć innych genów kodujących: białko budujące pory w błonie jądrowej, białko z domeną F-box, białko z rodziny transferaz uczestniczące w syntezie składników ściany komórkowej, białko o aktywności N-acetylotransferazy związane z odpowiedzią na ABA oraz liazę zaangażowaną w naprawę DNA. Każdy z tych genów charakteryzował się podwyższoną ekspresją na skutek stresu.

Ze względu na fakt, że zidentyfikowane geny ulegały zróżnicowanej ekspresji wyłącznie w korzeniach genotypu bardziej tolerancyjnego na suszę można przypuszczać, że mogą one również odgrywać rolę w budowaniu tolerancji, niemniej jednak sam fakt obserwacji zróżnicowanej ekspresji genów, bez dodatkowych kryteriów nie pozwala jednoznacznie odróżnić czynników odpowiedzi na stres, których ekspresja wiąże się wyłącznie z szeroko pojętą molekularną reakcją na niedobór wody, od czynników podwyższających tolerancję na stres. Niemniej jednak, należy wspomnieć, że jeden z genów o podwyższonej ekspresji zaobserwowanych w tej kategorii – kodujący kinazę z domeną LIM, charakteryzował się także wyższym inicjalnym poziomem ekspresji w korzeniach CamB już w warunkach kontrolnych w porównaniu do odmiany Maresi. Może on zatem być rozpatrywany jako jeden z istotnych kandydatów ułatwiających efektywną odpowiedź na stres suszy, szczególnie, że dane literaturowe wskazują na rolę kinaz typu LIM jako swego rodzaju biosensorów uczestniczących w przekazywaniu sygnałów komórkowych między cytoplazmą a jądrem komórkowym za pośrednictwem cytoszkieletu aktynowego (Kadmas and Beckerle, 2004). Stąd też mogą one pełnić ważną funkcję już w pierwszej fazie percepcji niedoboru wody w glebie i uczestniczyć w uruchamianiu dalszej kaskady odpowiedzi na stres, poprzez aktywację ekspresji odpowiednich czynników transkrypcyjnych.

#### **4. Zidentyfikowano grupę genów kodujących czynniki transkrypcyjne i inne białka odpowiedzialne za regulację ekspresji, związane z odpowiedzią na niedobór wody w korzeniach podczas umiarkowanego oraz silnego stresu suszy**

W prowadzonych badaniach skoncentrowano się także na genach kodujących czynniki transkrypcyjne oraz inne regulatory ekspresji genów, ze względu na to, że stanowią one pierwszą linię odpowiedzi na stresy i od ich działania zależą dalsze przemiany transkryptomu, a co za tym idzie i metabolizmu komórek. Wykonana analiza pozwoliła na identyfikację 88 genów, które wykazywały zróżnicowaną ekspresję w korzeniach podczas umiarkowanego stresu suszy oraz 230 genów o zróżnicowanej ekspresji podczas stresu silnego. Wskazano

łącznie 42 geny z tej puli, które ulegały zróżnicowanej ekspresji niezależnie od natężenia stresu, 47 genów specyficznych dla stresu umiarkowanego oraz 188 genów dla stresu silnego. Co istotne, w przypadku genów wspólnych dla obu poziomów stresu wzór ich ekspresji nie był identyczny między genotypami, a w przypadku pięciu transkryptów zanotowano przeciwny profil ekspresji – jej podwyższenie podczas umiarkowanej suszy, natomiast obniżenie podczas suszy silnej. Wskazuje to na zróżnicowany sposób regulacji ekspresji genów docelowych dla tych czynników, zależnie od stopnia natężenia stresu (**Janiak i inni, 2019**).

Możliwe mechanizmy działania i procesy biologiczne kontrolowane przez zidentyfikowane czynniki transkrypcyjne zostały szerzej przedyskutowane w pracy Janiak i inni (2019). W tym podsumowaniu można jednak zwrócić uwagę na kilka genów, spośród dziesięciu, których ekspresję zidentyfikowano u genotypu tolerancyjnego. Wśród nich znalazł się gen wykazujący podwyższoną ekspresję na skutek umiarkowanej suszy, kodujący czynnik CXC podobny do TSO1, który jest związany z kontrolą cyklu komórkowego, prowadzącą do odpowiedniej organizacji merystemów wierzchołkowych pędu i korzeni, a jego wysoka ekspresja u *Arabidopsis* pozwala na utrzymywanie podziałów komórkowych w strefie merystematycznej korzeni (Wang i inni, 2018).

U genotypu CamB zidentyfikowano także dwa geny dla czynników transkrypcyjnych z nadrodziny MYB, jeden o podwyższonej, a drugi o obniżonej ekspresji pod wpływem obu poziomów natężenia suszy, przy czym tylko pierwszy z nich był specyficzny dla genotypu CamB w obu reżimach stresu. Pierwszy z tych genów związany jest z represją odpowiedzi na niedobór azotu, z kolei drugi odpowiada za aktywację ścieżki odpowiedzi na niedobór fosforu (Kiba i inni, 2018; Ruan i inni, 2017). Ze względu na to, że niedobór azotu lub fosforu wpływa na rozwój systemu korzeniowego, wydaje się, że wspomniane geny mogą mieć istotny wpływ na wzrost korzeni, tworzenie korzeni bocznych lub wykształcanie włośników, nie tylko podczas niedoborów składników mineralnych, ale także w odpowiedzi na suszę, co czyni z nich ciekawych kandydatów do dalszych badań nad ich możliwą rolą w kształtowaniu tolerancji na ten stres.

W korzeniach genotypu CamB stwierdzono także różnicowaną ekspresję genów homologicznych do regulatorów odpowiedzialnych za kondensację chromatyny oraz rozpoznających znaczniki stanu metylacji histonów lub DNA. Ze względu na ich możliwe szersze działanie w kierunku regulacji ekspresji większej puli genów stanowią one również dobre geny kandydackie do dalszych analiz, ukierunkowanych na znaczenie regulacji epigenetycznych w odpowiedzi na stres suszy.

Ciekawy profil ekspresji zaobserwowano także dla genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny Tify związane z negatywną regulacją odpowiedzi na jasmoniany. Obniżenie ekspresji jednego z nich (TIFY 3B) podczas umiarkowanego stresu zaobserwowano wyłącznie w korzeniach odmiany Maresi. Gen ten, i dwa inne z tej samej rodziny, wykazywały również obniżenie ekspresji u genotypu CamB, ale tylko podczas suszy silnej. Obniżenie ekspresji wspomnianego genu u odmiany Maresi może zmniejszać represję

ścieżki sygnalizacji kontrolowanej przez jasmoniany, co może mieć wpływ na niższą efektywność odpowiedzi na suszę u tego genotypu. Z badań nad *Arabidopsis* wynika bowiem, że jasmoniany powodują inhibicję wzrostu korzeni (Fernández-Calvo i inni, 2011), co w warunkach umiarkowanej suszy może utrudniać poszukiwanie wody w głębszych warstwach gleby. Obserwacja podobnego obniżenia ekspresji genów z rodziny Tify u genotypu CamB podczas stresu silnego sugeruje, że korzenie u linii tolerancyjnej mogą przechodzić podobną reakcję, ale dopiero w warunkach skrajnego niedoboru wody w podłożu (**Janiak i inni, 2019**).

##### **5. Zaproponowano możliwe ścieżki regulacji ekspresji docelowych genów przez cztery czynniki transkrypcyjne działające pod wpływem umiarkowanej suszy**

Wykorzystując analizę *in slicio* możliwe było wskazanie genów dla czterech czynników transkrypcyjnych, które posiadały istotnie nadreprezentowaną pulę genów docelowych, spośród tych, które ulegały zróżnicowanej ekspresji w korzeniach podczas umiarkowanego stresu suszy. Dwa z tych genów kodują czynniki transkrypcyjne z rodziny bZIP (G-box binding factor 2; GBF2 oraz bZIP88), trzeci koduje czynnik odpowiedzi na szok cieplny (HSFB2b), a ostatni należy do genów z rodziny MYB (**Janiak i inni, 2019, Tabela 4**). Biorąc pod uwagę obecność określonych sekwencji docelowych w promotorach tych genów, możliwe było ułożenie ich w prawdopodobną kaskadę regulacyjną rozpoczynającą się od negatywnej regulacji ekspresji genu *GBF2* przez czynnik bZIP88 oraz pozytywnej regulacji genu z rodziny MYB przez czynnik GBF2. Stwierdzono również, że gen *HSFB2b* może podlegać autoregulacji (**Janiak i inni, 2019, Fig. 3**).

Analizując pulę prawdopodobnych genów docelowych, których ekspresja może być regulowana przez wspomniane czynniki transkrypcyjne stwierdzono, że należą one do różnych kategorii funkcjonalnych, obejmujących regulację procesu transkrypcji, inicjację translacji czy syntezę białek rybosomalnych, a także szeroko pojęty metabolizm, sygnalizację odpowiedzi na stres, regulację procesów oksydoredukcyjnych, transport błonowy czy też biogenezę plastydów. Geny te stanowią więc prawdopodobne regulatory szerokiego spektrum metabolizmu komórkowego.

Należy jednak podkreślić, że uzyskane w tej części analizy wyniki mogą być traktowane tylko jako wstępne założenie możliwych interakcji między określonymi czynnikami transkrypcyjnymi a ich prawdopodobnymi genami docelowymi. Stanowią one dobry start do postawienia hipotez o możliwych ścieżkach regulacyjnych aktywnych podczas stresu suszy. Niemniej jednak, wymagają dalszych szczegółowych analiz naceLOWANYCH na pojedyncze geny, które pozwolą zweryfikować ich rzeczywistą funkcję w odniesieniu do regulacji odpowiedzi molekularnej w korzeniach jęczmienia na niedobór wody.

## **6. Wysłunięto hipotezę o potencjalnej roli czynników zaangażowanych w proces fotosyntezy w regulacji procesów oksydoredukcyjnych mających miejsce w komórkach korzeni podczas stresu suszy**

Przeprowadzona analiza transkryptomów roślin poddanych silnemu stresowi suszy pozwoliła na zidentyfikowanie grupy genów zaangażowanych w proces fotosyntezy, które ulegały zróżnicowanej ekspresji nie tylko w liściach, ale, co było dość zaskakujące, także w korzeniach badanych genotypów. Wśród genów o podwyższonej ekspresji w korzeniach pod wpływem suszy znalazły się między innymi geny kodujące enzymy bezpośrednio uczestniczące w transferze elektronów, takie jak ferredoksyna, reduktaza ferredoksyna-NADP czy białko kompleksu rozkładającego wodę. Zaobserwowano także podwyższenie ekspresji genu kodującego jedną z transferaz, zaangażowaną w ten proces pośrednio, poprzez kontrolę syntezy filochinonu, wczesnego akceptora elektronów w fotosystemie I. Stwierdzono również podwyższoną ekspresję genu kodującego czynnik sigma dla organelowej polimerazy RNA oraz genu kodującego białko najprawdopodobniej zaangażowane w splicing intronów w chloroplastowych transkryptach (**Janiak i inni, 2018**). Wskazuje to na wzmożoną transkrypcję i późniejszą obróbkę transkryptów powstających w plastydach korzeniowych.

Zaobserwowana zróżnicowana ekspresja tych genów w korzeniach pod wpływem stresu suszy może sugerować dwojaką funkcję kodowanych przez nie białek w zależności od organu rośliny – udział w procesie fotosyntezy w chloroplastach liściowych oraz ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym za pośrednictwem plastydów korzeniowych. Zaproponowano zatem hipotezę, zakładającą, że plastydy korzeniowe mogą pełnić funkcję swego centrum antyoksydacyjnego podczas stresu, umożliwiającego wymiatanie wolnych rodników powstających podczas działania większości stresów abiotycznych, w tym stresu suszy. Hipoteza ta była poparta nie tylko pojedynczą obserwacją zróżnicowanej ekspresji wspomnianych genów w korzeniach podczas silnej suszy. Podobnie, analizując transkryptomy roślin poddanych suszy umiarkowanej również stwierdzono zróżnicowaną ekspresję genów związanych z fotosyntezą w tym organie (**Janiak i inni, 2019**). Ponadto, przegląd danych literaturowych z globalnych analiz transkryptomów wskazuje, że nie tylko w korzeniach jęczmienia, ale i w korzeniach innych gatunków zanotowano podwyższoną obecność transkryptów dla genów zaangażowanych w fotosyntezę. Wydaje się zatem, że jest to obserwacja dość powszechna. Postawiona hipoteza wymaga jednak dalszych analiz, dedykowanych wyłącznie roli plastydów korzeniowych w stresie suszy i choć wydaje się kontrowersyjna, otwiera pole do głębszej eksploracji i weryfikacji roli tych organeli w korzeniach podczas stresu oksydacyjnego.

## **7. Wskazano cztery geny, które mogą służyć jako markery odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia, a metody ich analizy zostały poddane ochronie patentowej**

Dodatkowo, warto podkreślić, że istotną wartość dodaną do zaprezentowanego osiągnięcia stanowią patenty uzyskane na podstawie części z otrzymanych wyników, chroniące dwie metody: metodę analizy ekspresji oraz metodę analizy wybranych wariantów allelicznych czterech genów odpowiedzi na stres suszy. Wybrane geny kodują dwie dehydryny oraz dwie peroksydazy, które charakteryzują się dużymi zmianami w poziomie ekspresji pod wpływem suszy i mogą stanowić dobre geny markerowe odpowiedzi na ten stres. Co istotne, ich ekspresja może być badana w liściach, a więc w organie łatwiej dostępnym do analiz, niż system korzeniowy. Objęcie ochroną patentową tych metod świadczy dodatkowo o możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników i ich przydatności w badaniach i działaniach aplikacyjnych, szczególnie hodowli nowych odmian jęczmienia o lepszej tolerancji na stres niedoboru wody.

**Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć przedstawionych prac należy zaliczyć:**

1. Wskazanie, że tolerancja na stres suszy u jęczmienia może zależeć od aktywacji (lub represji) niektórych genów odpowiedzi na ten stres jeszcze w warunkach optymalnej zawartości wody w podłożu, pozwalając na szybszą i lepszą aklimatyzację do warunków stresu w momencie pojawienia się suszy.
2. Wykazanie, że wyższa tolerancja na stres suszy u jęczmienia zależy głównie od działania genów zaangażowanych w regulację ekspresji, sygnalizację za pośrednictwem jonów wapnia lub hormonów, regulacji tworzenia cytoszkieletu oraz działania kinaz z domeną LIM czy regulacji degradacji białek poprzez ubiquitynację oraz wskazanie konkretnych genów uczestniczących w wymienionych procesach biologicznych jako istotnych kandydatów podwyższających tolerancję na niedobór wody, ze szczególnym uwzględnieniem genów działających w korzeniach.
3. Wykazanie, że odpowiedź systemu korzeniowego na suszę silną wymaga uruchomienia znacznie większej liczby czynników transkrypcyjnych niż w przypadku stresu o umiarkowanym natężeniu, a geny dla czynników transkrypcyjnych identyfikowane wspólnie dla obu poziomów stresu wykazują często różny, genotypowo specyficzny profil ekspresji w zależności od natężenia niedoboru wody.
4. Wskazanie grupy dziesięciu genów kodujących czynniki transkrypcyjne lub inne regulatory ekspresji jako genów kandydackich podwyższających tolerancję na stres suszy u jęczmienia i działających na poziomie systemu korzeniowego.
5. Zaproponowanie możliwych ścieżek regulacji ekspresji docelowych genów przez cztery czynniki transkrypcyjne (z rodziny bZIP, MYB oraz HSF) działające pod wpływem umiarkowanej suszy w korzeniach jęczmienia.
6. Wykazanie, że w systemie korzeniowym dochodzi pod wpływem suszy do aktywacji genów zaangażowanych w wybrane elementy procesu fotosyntezy i zaproponowanie

hipotezy, że plastydy korzeniowe mogą pełnić funkcję centrów antyoksydacyjnych podczas stresu suszy.

7. Uzyskanie ochrony patentowej dla metod pozwalających na molekularną analizę czterech genów mogących służyć jako markery odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia.

Przeprowadzone analizy transkryptomów pozwoliły zatem na charakterystykę szerokiego spektrum przemian molekularnych, jakie mają miejsce podczas stresu suszy w korzeniach jęczmienia, dając możliwość wytypowania potencjalnych genów kandydackich, istotnych w kształtowaniu tolerancji na niedobór wody. Należy zaznaczyć, że chociaż wykonana analiza danych ma w dużej mierze charakter opisowy, to jednocześnie stanowi cenny materiał otwierający drogę do realizacji wielu kolejnych, szczegółowych projektów ukierunkowanych na badania pojedynczych genów lub grup genów należących do pojedynczych ścieżek biochemicznych. Charakter zastosowanej metody analitycznej daje bowiem możliwość wglądu w wiele procesów biologicznych jednocześnie, co stanowi o jej przydatności do późniejszej selekcji najbardziej istotnych procesów, kształtujących odpowiedź na takie zjawisko jakim jest niedobór wody.

Charakter tej metody powoduje również zasadniczą trudność w interpretacji uzyskanych wyników, ponieważ identyfikowane geny reprezentują niemal wszystkie aspekty fizjologii rośliny, które niełatwo ułożyć w możliwą sieć zależności i interakcji. Trudność ta prawdopodobnie powoduje, że zdecydowana większość opublikowanych prac opartych o globalne badania transkryptomów ogranicza się w dużej mierze do przedstawienia statystycznej analizy wyników z niewielką dyskusją na temat funkcji wybranych genów. W zaprezentowanych powyżej pracach starano się unikać podobnego podejścia. Przygotowując przedstawione publikacje przyjęto, że obok analizy statystycznej ważna jest także możliwie głęboka interpretacja biologiczna zaobserwowanych zmian, ponieważ tylko ona daje możliwość praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników. Stąd też przedstawione prace są dość obszerne, niemniej jednak ich głównym celem było otwarcie drogi do weryfikacji funkcji poszczególnych genów, pozwalającej na przetestowanie postawionych hipotez w oparciu o projekty dedykowane wybranym, szczegółowym aspektom odpowiedzi oraz tolerancji na stres suszy u jęczmienia, szczególnie na poziomie kontroli rozwoju i funkcjonowania systemu korzeniowego.

#### Literatura

Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, et al. 2011. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23, 701–715

Friedrichsen DM., Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, et al. 2002. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* 162, 1445–1456.



- González-García MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-García S, Russinova E, et al. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138, 849–859.
- Hu, H., and Xiong, L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 715–741.
- Kadmas JL, Beckerle MC. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 920–931.
- Kiba T, Inaba J, Kudo T, Ueda N, Konishi M, Mitsuda N. et al. 2018. Repression of nitrogen starvation responses by members of the arabidopsis GARPT-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. *Plant Cell* 30, 925–945.
- Lang B, Pu J, Hunter I, Liu M, Martin-Granados C, Reilly TJ, et al. 2014. Recurrent deletions of ULK4 in schizophrenia: a gene crucial for neuritegenesis and neuronal motility. *J. Cell Sci.* 127(Pt 3), 630–640.
- Mizushima N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 132–139.
- Peng LX, Gu LK, Zheng CC, Li DQ, Shu HR. 2006. Expression of MaMAPK gene in seedlings of Malus L. under water stress. *Biochimica et Biophysica Sinica* 38, 281–286.
- Ruan W, Guo M, Wu P, Yi K. 2017. Phosphate starvation induced OsPHR4 mediates Pi-signaling and homeostasis in rice. *Plant Mol. Biol.* 93, 327–340.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11, 1743–1754.
- Wang W, Sijacic P, Xu P, Lian H, Liu Z. 2018. Arabidopsis TSO1 and MYB3R1 form a regulatory module to coordinate cell proliferation with differentiation in shoot and root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E3045–E3054.
- Xu W, Jia L, Shi W, Liang J, Zhou F, Li Q, Zhang J. 2012. Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytologist* 197, 139–50.
- Xu W, Jiao Y, Li R, Zhang N, Xiao D, Ding X, et al. 2014. Chinese wildgrowing *Vitis amurensis* ICE1 and ICE2 encode MYC-type bHLH transcription activators that regulate cold tolerance in Arabidopsis. *PLoS ONE* 9:e102303.
- Zhang L, Li Z, Li J, Wang A. 2013. Ectopic overexpression of SsCBF1, a CRT/DRE-binding factor from the nightshade plant *Solanum lycopersicoides*, confers freezing and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *PLoS ONE* 8:e61810.

### e) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza przedstawionym powyżej osiągnięciem naukowym, moje pozostałe zainteresowania naukowe obejmowały stosunkowo szeroki zakres tematyczny, choć w dużej mierze koncentrowały się wokół zagadnień dotyczących identyfikacji, a także izolacji genów w oparciu o różne podejścia metodyczne. Dane bibliograficzne do omawianych w tym miejscu publikacji przedstawiono szczegółowo w wykazie zawartym w Załączniku nr 3.

**Tematyka prowadzonych przeze mnie badań obejmowała następujące zagadnienia:**

- A. Analizę molekularnych podstaw rozwoju włósników u jęczmienia, w tym:
  - A.1. Identyfikację genów związanych z morfogenezą włósników w oparciu o mapowanie genetyczne i klonowanie pozycyjne

- A.2. Badania transkryptomów i proteomów mutantów włosnikowych
- B. Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach genetycznych, epigenetycznych oraz analizie zmienności genetycznej w populacjach wybranych gatunków roślin i zwierząt
- C. Badania odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia w aspekcie identyfikacji genów i QTL związanych z procesami fizjologicznymi
- D. Identyfikacja i charakterystyka genów związanych z produkcją biomasy u jęczmienia

### **A.1. Analiza molekularnych podstaw rozwoju włosników u jęczmienia w oparciu o identyfikację genów związanych z morfogenezą włosników poprzez mapowanie genetyczne i klonowanie pozycyjne**

Moje zaangażowanie w ten nurt badawczy związane jest tematyką, którą podjęłam jeszcze w czasie doktoratu, w którym głównym celem było określenie lokalizacji chromosomowej czterech genów odpowiedzialnych za różne etapy morfogenezy włosników u jęczmienia. Pierwszą pracą z tego nurtu była publikacja przedstawiając wyniki mojej pracy doktorskiej (**Janiak i Szarejko, 2007**), która pozwoliła na zmapowanie genów odpowiedzialnych za brak włosników (*rh11*), zatrzymanie rozwoju włosników w stadium bulwki (*rhpl*), zahamowanie wzrostu szczytowego włosników (*rhl1*) oraz tworzenie rzadkich włosników o nieregularnym rozmieszczeniu w obrębie strefy włosnikowej (*rhl1*) odpowiednio w chromosomach 7H, 1H, 5H oraz 6H. Kontynuacją tych badań była publikacja **Chmielewskiej i innych (2014)**, w której mój udział polegał na wysyceniu map obejmujących wspomniane geny nowymi markerami molekularnymi, wraz z przeprowadzeniem analizy otrzymanych wyników i ich dyskusją w ostatecznej wersji manuskryptu przygotowanego do druku. Zwieńczeniem prac prowadzonych nad jednym ze wspomnianych genów, genem *rh11* odpowiedzialnym za brak włosników u jęczmienia, była praca **Gajewskiej i innych (2018)**, w której udało się wskazać najbardziej prawdopodobny gen kandydacki, którego mutacja prowadzi do bezwłosnikowego fenotypu u mutantu *rh11.b*, wykorzystanego w tych analizach. Wspomniana publikacja oparta była o wysokorozdzielcze mapowanie genetyczne locus *rh11* oraz wykorzystanie dostępnych danych o sekwencji genomu jęczmienia w celu lokalizacji docelowego rejonu obejmującego mapowany gen na mapie fizycznej. Analiza ta doprowadziła do bardzo dobrego zawężenia obszaru na mapie fizycznej i wskazania genu kodującego jeden z czynników transkrypcyjnych z rodziny bHLH z domeną LRL, jako kandydata odpowiedzialnego za pierwszy etap tworzenia włosników – ustanowienie wzoru ryzodermy. Mój udział w omawianych badaniach polegał na uczestnictwie w planowaniu niezbędnych eksperymentów, szczególnie tych, dotyczących ostatniego etapu prac obejmujących analizę rekombinantów i wskazanie ostatecznego genu kandydackiego. Wykonałam także analizę filogenetyczną genów z rodziny bHLH, co pozwoliło na przypisanie zidentyfikowanego kandydata do odpowiedniej rodziny genów bHLH oraz zredagowałam ostateczną wersję manuskryptu do publikacji. Co również istotne,

przedstawiona publikacja jest ilustracją pracy doktorskiej dr Patrycji Gajewskiej, wykonanej w Katedrze Genetyki UŚ, w której byłam promotorem pomocniczym.

## **A.2. Analiza molekularnych podstaw rozwoju i funkcji włosników u jęczmienia w oparciu o badania transkryptomów i proteomów mutantów włosnikowych**

W swoich badaniach nad rozwojem i funkcją włosników byłam także zaangażowana w projekty oparte o analizy transkryptomów i proteomów mutantów włosnikowych, co zaowocowało współautorstwem lub pierwszym autorstwem kilku prac. Należy do nich publikacja **Kwaśniewskiego i innych (2010)**, dotycząca profilowania transkryptomów mutantów włosnikowych jęczmienia oraz ich odmian wyjściowych, która pozwoliła na identyfikację 10 genów różniących mutanta bezwłosnikowego *rh11.a* od jego odmiany wyjściowej Karat. Geny te prawdopodobnie biorą udział w inicjacji rozwoju włosników lub regulacji tworzenia wzoru ryzodermy – pierwszym etapie determinującym, które komórki ryzodermy ostatecznie będą zdolne do wykształcenia wypustki włosnikowej. Mój udział w tej pracy polegał na analizie ekspresji wybranych genów o zróżnicowanej ekspresji metodą qPCR, co pozwoliło na weryfikację wyników uzyskanych za pomocą mikromacierzy.

Inne badania z moim udziałem, prowadzone w ramach projektu „EURoot - Enhancing resource Uptake from Roots under stress in cereal crops” finansowanego z 7 Programu Ramowego UE i realizowanego w Katedrze Genetyki UŚ, dotyczyły roli włosników w odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia (**Kwaśniewski i inni, 2016**). W badaniach tych również wykorzystano mutant bezwłosnikowego *rh11.a* oraz jego odmianę wyjściową Karat, które poddano działaniu stresu suszy. Badano odpowiedź transkryptomów korzeni i liści tych form na zadany stres, identyfikując geny i kontrolowane przez nie mechanizmy molekularne biorące udział we wczesnej odpowiedzi jęczmienia na niedobór wody oraz odpowiedzi późnej, charakterystycznej dla długotrwałego i silnego stresu suszy. Mój udział w tej pracy polegał na współuczestniczeniu w prowadzeniu stresu suszy, zbiorze tkanki i przygotowaniu izolatów RNA do analiz mikromacierzowych oraz na interpretacji części wyników uzyskanych z różnicowych analiz transkryptomów. Dzięki przeprowadzonej w ten sposób interpretacji danych możliwe było wysunięcie wniosku, że u mutantu pozbawionego włosników dochodzi do takich zmian w ekspresji genów, które świadczą o zachodzących w jego komórkach procesach degeneracyjnych, podczas gdy u odmiany o włosnikach normalnych w dużej mierze aktywne są procesy chroniące przed stresem niedoboru wody. Uzyskane wyniki pozwalają zatem na stwierdzenie, że obecność włosników ma istotne znaczenie w podtrzymywaniu homeostazy podczas suszy, a rośliny bezwłosnikowe doświadczają większego stresu niż genotyp wykształcający włosniki prawidłowe.

W cykl prac dotyczących molekularnych podstaw rozwoju włosników, choć koncentrujących się tym razem nie na identyfikacji genów, lecz białek, wpisuje się także publikacja **Janiak i innych (2012)**, której celem była analiza proteomu korzeni dwóch mutantów włosnikowych: bezwłosnikowego mutantu *rh11.b* oraz mutantu *rhp1.b* o

włośnikach zatrzymanych w stadium bulwki oraz ich odmian wyjściowych Karat i Dema. Mój udział w tej pracy polegał na zaprojektowaniu eksperymentów, izolacji białek i przeprowadzeniu dwukierunkowej elektroforezy dla prób uzyskanych z korzeni mutantu *rhp1.b* oraz jej odmiany wyjściowej Dema, wykonanie różnicowej analizy żeli 2D oraz izolacji wybranych spotów, przygotowanie ich do analizy za pomocą spektrometrii masowej oraz przeprowadzenie bioinformatycznej analizy zidentyfikowanych na tej podstawie białek. Ostatecznie, badania przedstawione w tej pracy pozwoliły na identyfikację łącznie 13 białek charakteryzujących się większą akumulacją u odmian wyjściowych niż analizowanych mutantów, co pozwoliło na ich powiązanie z procesem wykształcania wypustek ryzodermy. Funkcje zidentyfikowanych białek to między innymi synteza ATP lub jego transport, zaangażowanie w transport pęcherzykowy, katabolizm glukozy, udział w procesach oksydoredukcyjnych, czy przekazywanie sygnałów komórkowych.

## **B. Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach genetycznych, epigenetycznych oraz analizie zmienności genetycznej w populacjach wybranych gatunków roślin i zwierząt**

Wszystkie omówione wcześniej prace dotyczące mapowania genetycznego i klonowania pozycyjnego wymagały ode mnie stosowania różnych systemów markerów molekularnych pozwalających na konstruowanie docelowych grup sprzężeń pozwalających na lokalizację badanych genów w chromosomach. Doświadczenie zdobyte pod tym względem wykorzystywałam także w innych pracach, w których niezbędne było posługiwanie się markerami DNA do analizy różnych procesów lub zjawisk. Do takich prac należą publikacje **Filek i innych (2006)** oraz **Filek i innych (2008)**, w których wykonałam analizę metylacji DNA w oparciu o markery typu MSAP, będące modyfikacją techniki AFLP, pozwalająca na detekcję zmetylowanych cytozyn. Pierwsza z prac dotyczyła możliwego związku między metylacją DNA a procesem wernalizacji i kwitnienia u rzepaku, w której wykorzystano różne kombinacje szczepienia wegetatywnych lub generatywnych wierzchołkowych części pędu na wernalizowanych lub niewernalizowanych podkładach. Stwierdzono, że większość obserwowanych różnic w analizowanych profilach MSAP świadczyła o demetylacji, przy czym większy poziom demetylacji był związany raczej z procesem wernalizacji niż stanem generatywnym wierzchołków pędu, co wskazuje na możliwe różnice w aktywności genów podczas wernalizacji i tranzycji do stanu generatywnego. Podobna analiza metylacji DNA została również wykonana w przypadku drugiej pracy, której celem było zbadanie możliwego ochronnego wpływu selenu na siewki rzepaku rosnące w obecności kadmu. Uzyskane wyniki wskazały, że kadm może wpływać na pojawianie się zdarzeń demetylacyjnych, a obecność selenu może posiadać pewien potencjał w przywracaniu stanu metylacji, charakterystycznego dla roślin rosnących w warunkach kontrolnych.

Inną pracą opartą o markery molekularne była publikacja **Janiak i innych (2008)**, w której starano się wykorzystać technikę amplifikacji PCR ze starterami o degenerowanej

sekwencji (DOP-PCR) do uzyskania markerów SNP przydatnych w analizach molekularnych u soi. Praca ta była wynikiem mojego rocznego stażu podoktorskiego, który odbyłam w Seoul National University w Korei Południowej. Analizy, które przeprowadziłam w tej pracy obejmowały klonowanie i masowe sekwencjonowanie produktów uzyskanych techniką DOP-PCR dla różnych odmian soi, detekcję polimorfizmów typu SNP oraz bioinformatyczną charakterystykę uzyskanych sekwencji. Otrzymane wyniki wskazały, że większość amplifikowanych loci pochodziła z genomów chloroplastowego i mitochondrialnego, co znacznie zmniejszyło skuteczność techniki DOP-PCR w generowaniu nowych markerów. Niemniej jednak przeprowadzone analizy bioinformatyczne pozwoliły także na detekcję i charakterystykę paralogicznych sekwencji, dając możliwość pewnego wglądu w strukturę genomu soi, charakteryzującego się stosunkowo dużą proporcją sekwencji zduplikowanych.

Doświadczenie z analiz molekularnych opartych o systemy markerowe posłużyło także do przeprowadzenia analizy danych AFLP uzyskanych dla populacji światłówki naziemnicy eksponowanej na kadm (**Augustyniak i inni, 2016**). Głównym celem tej pracy było sprawdzenie, czy wielopokoleniowa ekspozycja na kadm może być czynnikiem selekcyjnym pozwalającym na wykształcenie bardziej efektywnych mechanizmów ochrony DNA przez uszkodzeniami. Analizowane przez mnie dane AFLP wskazały, że porównywane grupy osobników: kontrolna i eksponowana na kadm, nie różniły się od siebie pod względem zmienności genetycznej, co wskazuje, że ekspozycja na kadm nie spowodowała pojawienia się zmian mutacyjnych, które mogłyby zostać wykryte techniką AFLP.

Koleją pracą, w której mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy danych uzyskanych za pomocą markerów molekularnych, była praca **Majki i innych (2019)**. Praca ta dotyczyła określenia kompozycji genomu tetraploidalnych hybryd *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* oraz ich potomstwa z pokolenia F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub> za pomocą narzędzi cytogenetycznych oraz markerów molekularnych typu ISSR. Przeprowadzona przez ze mnie analiza danych ISSR wskazała, że podczas mejozy zachodzącej u hybryd *F. pratensis* × *L. perenne* w przypadku większości analizowanych loci dochodzi do tetrasomicznego sposobu ich segregacji. Nieliczne loci wykazywały segregację disomiczną, a segregacja jednego z badanych loci wskazywała na możliwość tworzenia kwadriwalentów i losowej segregacji chromatyd. Taki obraz sugeruje, że możliwy jest mieszany model dziedziczenia u hybryd *Festulolium*, jednak z przewagą dziedziczenia tetrasomicznego.

Ostatni obszar badawczy z tej tematyki, dotyczył zagadnień związanych z analizą zmienności genetycznej w obrębie populacji gatunków roślin ściśle chronionych lub gatunków inwazyjnych. Jedną z publikacji z tego obszaru jest praca dotycząca oceny zmienności genetycznej marsylii czterolistnej, ściśle chronionego gatunku paproci wodnej, który nie występuje już w swoich naturalnych siedliskach w Polsce (**Janiak i inni, 2014**). Praca ta prowadzona była we współpracy z Centrum Dziedzictwa Przyrody Górnego Śląska, gdzie prowadzi się prace nad ochroną gatunków zagrożonych, a także restytucją gatunków wymarłych, do których należy właśnie marsylia czterolistna. W pracy tej posłużono się materiałem pozyskanym z kolekcji polskich ogrodów botanicznych, w których prowadzona

jest hodowla zachowawcza tego gatunku oraz materiałem z miejsc jego introdukcji w Polsce, a także próbkami zebranymi z naturalnych stanowisk marsylii czterolistnej zlokalizowanych na terenie Europy (Niemcy, Francja, Słowacja). Mój udział w jej realizacji polegał na zaplanowaniu schematu poboru prób i niezbędnych eksperymentów, wykonaniu analizy opartej o markery AFLP dla prób zebranych z populacji z siedlisk naturalnych na terenie Niemiec i Francji, przeprowadzeniu analizy wyników opartej o podstawowe parametry opisujące zmienność genetyczną populacji, a także przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Uzyskane wyniki wskazały na bardzo niski poziom zmienności genetycznej każdej z analizowanych populacji i duże znaczenie rozmnażania wegetatywnego w propagacji tego gatunku. Co istotne, zaobserwowano porównywalny poziom polimorfizmu wewnątrz populacji pochodzących z Polski a populacjami z naturalnych stanowisk w Europie. Wydaje się zatem, że kolekcje marsylii czterolistnej zachowane w polskich ogrodach botanicznych charakteryzują się podobną ilościowo pulą zmienności genetycznej, jaka dziś występuje w badanych siedliskach naturalnych. Taki wynik oznacza, że wykorzystanie posiadanego w Polsce materiału daje szansę na restytucję tego gatunku w jego historycznym zasięgu, z zachowaniem zbliżonej struktury genetycznej, jaka występuje obecnie na stanowiskach naturalnych.

Pozostałe prace z tego nurtu badawczego były prowadzone we współpracy z Katedrą Botaniki i Ochrony Przyrody UŚ, a dotyczyły analizy zmienności genetycznej inwazyjnych gatunków rdestowców z rodzaju *Fallopia*: *F. japonica*, *F. sachalinensis* i ich mieszańca *F. × bohemica* (Bzdęga i inni, 2012; Bzdęga i inni, 2016). W pracach tych posłużono się markerami AFLP do oceny zmienności badanych populacji. Moje zaangażowanie w powstanie tych publikacji polegało na wykonaniu analizy danych AFLP pozwalającej na opis badanych populacji pod względem poziomu klonalności, zmienności molekularnej w obrębie i między badanymi populacjami, dystansu genetycznego między populacjami, a także parametru „hybrid index”, pozwalającego na ocenę możliwego udziału sekwencji z genomów rodzicielskich *F. japonica* i *F. sachalinensis* w genomie mieszańca *F. × bohemica*. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykrycie istnienia zmienności genetycznej w występujących w Polsce populacjach *F. japonica* – taksonie, który do tej pory uważany był za pojedynczy klon rozprzestrzeniony na terenie Europy (Bzdega i inni, 2012). Taka obserwacja może wskazywać na wielokrotne introdukcje tego taksonu w Europie. Stwierdzono także, że poziom zmienności genetycznej populacji *F. × bohemica* jest wyższy, w przypadku gdy występuje on w sąsiedztwie taksonów rodzicielskich, niż w przypadku populacji mieszańców odizolowanych od taksonów rodzicielskich. Wydaje się także, że główną przyczyną obserwowanej wyższej zmienności w populacjach *F. × bohemica* jest przede wszystkim ich współwystępowanie z taksonem *F. sachalinensis* (Bzdęga i inni, 2016). Taka obserwacja może mieć zatem znaczenie w projektowaniu metod zwalczania populacji tego inwazyjnego gatunku rdestowców.

### C. Badania odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia w aspekcie identyfikacji genów i QTL związanych z procesami fizjologicznymi

Do analiz mieszczących się w tematyce najściślej powiązanej z moim głównym osiągnięciem naukowym, w których również miałam swój udział, wpisuje się praca **Gudyś i innych (2018)**, dotycząca mapowania loci QTL dla fizjologicznych i biochemicznych cech związanych z odpowiedzią jęczmienia na suszę. Badania składające się na tą publikację prowadzone były w oparciu o kilka odmian jęczmienia o zróżnicowanej tolerancji na stres suszy, w tym także odmianę Maresi oraz linię CamB. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie puli możliwych genów kandydackich dla zmapowanych loci QTL, odpowiedzialnych za reakcję jęczmienia na stres niedoboru wody. Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wytypowaniu grupy genów związanych z odpowiedzią jęczmienia na stres suszy, z wykorzystaniem danych uzyskanych z analizy transkryptomów odmiany Maresi i CamB oraz na identyfikacji polimorfizmów w tych genach między rodzicami populacji mapujących. W ten sposób możliwe było późniejsze zmapowanie i określenie możliwej ko-lokalizacji między genami kandydackimi związanymi z odpowiedzią na suszę a badanymi loci QTL. Taką ko-lokalizację stwierdzono między rejonem QdET0/RC.2H, wyjaśniającym duży, bo ponad 20% zakres zmienności dla kinetyki transportu elektronów przez fotosystem II a genem kodującym jedną z peroksydaz zaangażowaną w odpowiedź na stres oksydacyjny. Podobną ko-lokalizację zaobserwowano między locus QdTRo/RC.2H.1 związanym z pułapkowaniem elektronów w centrach reakcyjnych fotosystemu II a genem kodującym jedną z transketolaz, mogącą uczestniczyć w cyklu Calvina.

Inną pracą z moim udziałem, która dotyczy analiz transkryptomicznych w kontekście stresu suszy jest publikacja **Daszkowskiej-Golec i innych (2019)**, której głównym celem było określenie molekularnych podstaw regulacji procesu fotosyntezy podczas stresu suszy u jęczmienia. Praca ta koncentrowała się przede wszystkim na analizie transkryptomu liści odmiany Sebastian, wraz ze szczegółową analizą transportu elektronów przez fotosystem II, wykonaną na podstawie testu OJIP. Dodatkowo, wykorzystano w tej pracy także wspomniany wcześniej genotyp CamB oraz odmianę Maresi, które poddano bardzo silnemu stresowi suszy, również analizując efektywność działania fotosystemu II u tych form. Mój udział w tych badaniach był stosunkowo niewielki, obejmujący współuczestnictwo w prowadzeniu stresu, pomiarach fluorescencji chlorofilu u odmiany Maresi i linii CamB oraz dyskusji części z otrzymanych wyników. Przeprowadzone analizy wykazały, że wpływ suszy na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego na poziomie fotosystemu II jest podobny u odmian europejskich Maresi i Sebastian, natomiast genotyp syryjski CamB doświadcza bardziej drastycznych, negatywnych zmian, świadczących o bardziej znaczącym upośledzeniu przepływu elektronów w obrębie fotosystemu II w zadanych warunkach stresu. Wydaje się zatem, że obserwowana we wcześniejszych badaniach wyższa tolerancja na stres niedoboru wody u tego genotypu zależy w większej mierze od innych mechanizmów,

najprawdopodobniej związanych z bardziej efektywnym zatrzymywaniem wody w komórkach niż regulacją procesu fotosyntezy.

#### **D. Identyfikacja i charakterystyka genów związanych z produkcją biomasy u jęczmienia**

Poza wspomnianymi wcześniej badaniami, rozwijałam nadal swoje zainteresowania identyfikacją genów w oparciu o wspomniane wcześniej klonowanie pozycyjne. Metodę tą wykorzystałam w **kierowanym przeze mnie projekcie BarPLUS**, realizowanym w ramach programu FACCE-SURPLUS ERA-NET we współpracy z ośrodkami naukowymi we Włoszech, Niemczech i Hiszpanii. Projekt ten dotyczył selekcji form fenotypowych jęczmienia i identyfikacji nowych alleli w genach kandydackich, które pozwoliłyby na uzyskanie nowych odmian charakteryzujących się zwiększoną produkcją biomasy bez utraty plonu ziarna. Projekt koncentrował się na analizie takich cech jak zwiększona liczba pędów, większa szerokość liści, mniejszy kąt osadzenia liści na źdźbło dający szansę na lepszą penetrację i wykorzystanie światła w procesie fotosyntezy, a także na większej wydajności samego procesu fotosyntezy. W projekcie udało się wyselekcjonować szereg mutantów jęczmienia pochodzących z populacji TILLING 'HorTILLUS', wyprowadzonej w Katedrze Genetyki US, charakteryzujących się pożądanymi cechami fenotypowymi. Dla wybranych mutantów wykonano niezbędne analizy genetyczne i rozpoczęto procedurę mapowania genów stojących u podstawy obserwowanych fenotypów. W projekcie tym, mapowanie oparto o podejście zbiorczej analizy pul segregantów (Bulk Segregant Analysis; BSA), a skonstruowane pule osobników o przeciwstawnych fenotypach poddano analizie 'exome capture' połączonej z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS). Mój udział w tych badaniach, poza prowadzeniem selekcji poświadczonych form, przeprowadzeniu niezbędnych krzyżowań i analizie dziedziczenia wybranych cech, polegał na przygotowaniu bibliotek egzomów jęczmienia do sekwencjonowania NGS. Wyniki uzyskane w projekcie BarPLUS umożliwiły wytypowanie dwóch możliwych genów kandydackich odpowiedzialnych za: szybszą dyssypację energii w procesie fotosyntezy oraz za wykształcanie erektoidalnego pokroju rośliny i niewielki kąt osadzenia liści na źdźbło. Prace w kierunku szczegółowej analizy tych genów oraz mapowaniem kolejnych są kontynuowane w ramach współpracy międzynarodowej nawiązanej dzięki projektowi BarPLUS, a uzyskane wyniki będą w najbliższym roku publikowane.

Podsumowując omawiany w tej części dorobek naukowy można zaznaczyć, że wypracowany przeze mnie do tej pory warsztat badawczy obejmuje prowadzenie analiz opartych o różne systemy markerów molekularnych, analizy ekspresji pojedynczych genów, globalne analizy transkryptomów i proteomów, tworzenie bibliotek do wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji, wraz z bioinformatyczną analizą funkcjonalną identyfikowanych genów oraz analizą danych pozwalającą na tworzenie map genetycznych i



izolację genów w oparciu o klonowanie pozycyjne czy przeprowadzanie podstawowych analiz z zakresu genetyki populacyjnej. Warsztat ten pozwolił mi na uczestniczenie w wielu projektach badawczych o szerokiej i zróżnicowanej tematyce. Stosunkowo duże spektrum zagadnień biologicznych, w których badaniu współuczestniczyłam, spowodowało jednocześnie, że mogłam uzyskać doświadczenie wykraczające poza jedną wąską specjalizację, co w dużej mierze ułatwia nawiązywanie dalszej współpracy naukowej i uczestnictwo w projektach o multidyscyplinarnym charakterze.

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

Po uzyskaniu stopnia doktora, w latach 2006-2007, odbyłam roczny staż naukowy w College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University w Korei Południowej. W ramach stażu uczestniczyłam w badaniach mających na celu wygenerowanie nowych markerów typu SNP możliwych do zastosowania w tworzeniu map genetycznych u soi. Praca ta została zakończona publikacją **Janiak i innych (2008)** omówioną we wcześniejszej części autoreferatu. Ponadto, podczas mojego pobytu na Uniwersytecie w Seulu miałam szansę na zdobycie pierwszych doświadczeń nad badaniem proteomów roślinnych w oparciu o dwukierunkową elektroforezę i późniejszą analizę białek za pomocą spektrometrii masowej. Doświadczenie to rozwijałam dalej, uczestnicząc w 2008 roku w stażu realizowanym w ramach programu COST Short Scientific Mission na Uniwersytecie Technicznym w Danii, opracowując optymalną metodę izolacji białek z korzeni i liści jęczmienia. W 2009 roku odbyłam także staż w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Gatersleben w Niemczech, gdzie zapoznałam się z metodą analizy proteomu opartą o ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową. Pobyt w Instytucie IPK pozwolił mi również na scharakteryzowanie białek różnicujących proteomy korzeni mutantów włósnikowych i ich odmian wyjściowych, co zaowocowało publikacją **Janiak i innych (2012)**, również wspomnianą w części 4e autoreferatu.

Ponadto, brałam udział w **projekcie POLAPGEN-BD** o multidyscyplinarnym charakterze, w którym pełniłam rolę kierownika zadania 19, analizując transkryptomy genotypów jęczmienia poddanych stresowi suszy. W projekcie tym brało udział łącznie 12 jednostek: instytutów badawczych, uniwersytetów i firm hodowlanych, a wykonywane doświadczenia oparte były w dużej mierze o wspólne prowadzenie prac badawczych przez określone grupy jednostek, pozwalające na zacieśnienie współpracy naukowej. W przypadku kierowanego przez mnie zadania 19, najściślejszą współpracę prowadzono z Instytutem Genetyki Roślin PAN w Poznaniu oraz Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie. Współpraca ta zaowocowała publikacjami i patentami wykazanymi w autoreferacie jako główne osiągnięcie naukowe.

Byłam także kierownikiem polskiej części **projektu BarPLUS** (“BarPLUS: modyfikacja architektury pędu oraz procesu fotosyntezy u jęczmienia w celu maksymalizacji produkcji biomasy i plonu przeznaczonych dla różnych zastosowań końcowych”), realizowanego w ramach programu ERA-NET FACCE SURPLUS. Projekt ten prowadzony był we współpracy z ośrodkami naukowymi we Włoszech (Uniwersytet w Mediolanie oraz Instytut badawczy CREA, Fiorenzuola), w Hiszpanii (Uniwersytet w Lleida) oraz w Niemczech (Uniwersytet w Poczdamie). Zwornikiem większości zaplanowanych w projekcie eksperymentów była populacja TILLING ‘*HorTILLUS*’, wyprowadzona w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego, a będąca kolekcją kilku tysięcy linii mutacyjnych stanowiących źródło nowych wariantów allelicznych genów jęczmienia. Dzięki wykorzystaniu tej populacji możliwe było wyselekcjonowanie linii jęczmienia o cechach potencjalnie sprzyjających zwiększeniu produkcji biomasy, a uzyskane linii poddane zostały szczegółowej charakterystyce przez ekspertów pracujących w ramach międzynarodowego konsorcjum BarPLUS. Współpraca naukowa ze wspomnianymi ośrodkami jest nadal utrzymywana.

Brałam również udział, jako wykonawca, w międzynarodowym projekcie EuROOT „Enhancing resource Uptake from Roots under stress in cereal crops”, finansowanym w ramach 7. Programu Ramowego UE, który dotyczył różnych aspektów badań nad systemami korzeniowymi roślin uprawnych w kontekście stresów niedoboru wody i substancji mineralnych w podłożu. Wykonane w ramach tego projektu badania pozwoliły na opublikowanie pracy **Kwaśniewskiego i innych (2016)** omówionej w części 4e autoreferatu, w której jestem współautorem. W ramach tego projektu powstała także publikacja przeglądowa **Janiak i innych (2016)** wchodząca w skład zaprezentowanego wcześniej głównego osiągnięcia naukowego. Dodatkowo, współpraca nawiązana w ramach tego projektu pozwoliła nie tylko na realizację badań naukowych, ale otworzyła możliwość odbycia stażu o charakterze dydaktycznym, który realizowałam na Uniwersytecie w Bolonii we Włoszech.

Wszystkie szczegółowe dane dotyczące omówionych w tej części staży naukowych i realizowanych projektów zostały podane w wykazie stanowiącym Załącznik nr 3 do złożonej dokumentacji.

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

### **Osiągnięcia dydaktyczne**

Poza pracą naukową aktywnie uczestniczyłam w organizowaniu i prowadzeniu zajęć dydaktycznych dla studentów z różnych kierunków studiów licencjackich, magisterskich oraz studiów doktoranckich. Do moich osiągnięć w tym obszarze można zaliczyć:

**A. Opracowanie autorskich wykładów** dla następujących przedmiotów:

- Podstawy genetyki – realizowanego na studiach licencjackich kierunku Biotechnologia w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego (IBBiOŚ UŚ)
- Genomika roślin – realizowanego na studiach magisterskich kierunku Biotechnologia w IBBiOŚ UŚ
- Plant Functional Genomics – przedmiotu prowadzonego w języku angielskim dla studentów studiów doktoranckich “Advanced Methods in Biotechnology and Biodiversity” w IBBiOŚ UŚ
- Genetyka molekularna – realizowanego na studiach licencjackich kierunku Biofizyka w Instytucie Fizyki UŚ.

**B. Opracowanie autorskich zajęć – wykładów i konwersatoriów dla przedmiotu Nutrigenomika i nutrigenetyka**, realizowanego na studiach magisterskich kierunku Biologia żywienia w IBBiOŚ UŚ. Przedmiot ten będzie również w ofercie dydaktycznej w przygotowywanym obecnie nowym programie nauczania dla kierunku Biologia.

**C. Istotny udział w opracowaniu programu laboratoriów** dla przedmiotów:

- Podstawy genetyki (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Analiza genetyczna (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Analiza instrumentalna (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Genetyka molekularna (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Inżynieria genetyczna (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Markery molekularne (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Genomika roślin (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- GMO – korzyści i zagrożenia (kierunek Biotechnologia, IBBiOŚ)
- Podstawy Biologii molekularnej (kierunek Biologia, IBBiOŚ)
- Genetyka molekularna (kierunek Biofizyka, Instytut Fizyki UŚ)

**D. Sprawowanie opieki naukowej nad 18 pracami magisterskimi.** Opieka naukowa obejmowała naukę wymaganych technik analitycznych oraz późniejszy nadzór nad pracą magistranta w laboratorium, bieżący kontakt ze studentem, a także wykonywanie korekty tekstu prac magisterskich przed oddaniem ich do promotora.

**E. Sprawowanie opieki naukowej nad 4 pracami licencjackimi oraz promotorstwo 9 prac licencjackich.**

- F. Pełnienie funkcji **promotora pomocniczego pracy doktorskiej** dr Patrycji Gajewskiej pt. „Szczegółowe mapowanie genu związanego z pierwszym etapem rozwoju włośników u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”, której promotorem była pani prof. dr hab. Iwona Szarejko (Katedra Genetyki UŚ).
- G. Udział w **tworzeniu sylabusów** dla przedmiotów będących w ofercie dydaktycznej WBiOŚ UŚ, wdrażających do prowadzonej dydaktyki Krajowe Ramy Kwalifikacji dla Szkolnictwa Wyższego (2012 rok).

Ponadto, w bieżącym roku akademickim (2019/2020) **prowadzę tutoring**, opiekując się uczennicą liceum, pomagając jej rozwijać zainteresowania szeroko pojętą genetyką. Zajęcia te prowadzę w **ramach programu „Uniwersytet Najlepszych”** uruchomionego na Uniwersytecie Śląskim, który jest dedykowany dla uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych zainteresowanych rozwijaniem swoich pasji naukowych.

Poza dydaktyką dedykowaną dla studentów różnych kierunków studiów realizowanych na Uniwersytecie Śląskim, prowadziłam także **kursy o charakterze międzynarodowym**, w których wykorzystywałam doświadczenie w wykonywaniu analiz opartych o markery molekularne.

W październiku 2007 roku prowadziłam **warsztaty** pt. „The use of molecular markers techniques in plant genetic improvement” **na Uniwersytecie La Molina w Limie, Peru** (Universidad Nacional Agraria La Molina). Zakres tematyczny obejmował wykłady dotyczące różnych technik markerowych i ich możliwych zastosowań w genetyce i hodowli roślin, a także ćwiczenia laboratoryjne z podstawowych technik markerowych. Kurs ten był organizowany z ramienia Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej w Wiedniu.

Z kolei roku 2008 pełniłam funkcję **dyrektora międzynarodowego kursu „PCR-based molecular markers systems”** organizowanego w Katedrze Genetyki UŚ w ramach Regionalnego Programu Pomocy Technicznej Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej w Wiedniu (program nr C7-RER-5.013-003).

W roku 2010, ponownie byłam **dyrektorem** analogicznego, choć bardziej rozbudowanego merytorycznie kursu pt. „Use of induced mutations (TILLING) and DNA markers in cereal genetics and breeding”, również realizowanego na zlecenie Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej w Wiedniu w ramach Regionalnego Programu Pomocy Technicznej (program nr C7-RER-5013-006010). W przypadku obu wymienionych kursów brałam udział nie tylko w prowadzeniu wykładów i zajęć laboratoryjnych dla uczestników z różnych krajów rozwijających się z Europy i Azji, ale także zajmowałam się pełną stroną organizacyjną i logistyczną tych wydarzeń.

Oprócz prowadzenia zajęć dydaktycznych sama także doksztalałam się, **uczestnicząc w wymienionych poniżej kursach podnoszących kwalifikacje nauczycielskie:**

- warsztatach „Dobrze uczyć” organizowanych w ramach projektu Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy (UPGOW), w celu doskonalenia kompetencji dydaktycznych – 10 godzin dydaktycznych, Katowice, 03.06.2009.
- stażu podnoszącym kwalifikacje dydaktyczne, realizowanym w ramach programu NITKA – „Zwiększenie udziału osób dorosłych w kształceniu w zakresie narzędzi informatycznych i technologii”. Tematyka stażu: Metodyka mapowania asocjacyjnego u roślin. Staż zrealizowany był w Dipartimento di Scienze Agrarie, Uniwersytetu w Bolonii, Włochy (2 - 13 luty 2015)
- szkoleniach podnoszących kwalifikacje zawodowe, realizowanych w ramach programu SWAN (Szkolnictwo Wyższe Atrakcyjne i Nowoczesne), w tym:
  - warsztatach: „Profesjonalna prezentacja” (18-19 październik 2017)
  - kursie języka angielskiego EAP „Intensywny program rozwijania umiejętności mówienia” (28.02 – 25.04 2018)
  - szkoleniu: „Podstawy pracy z Adobe Photoshop i CorelDraw” (24.04. – 15.05 2018)
  - szkoleniu: „Data Mining – kurs podstawowy” (26-27 września 2018)

### **Osiągnięcia organizacyjne**

Do mojej działalności organizacyjnej prowadzonej w Instytucie IBBiOŚ UŚ (wcześniej: Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska; WBiOŚ UŚ) należy:

- A. Udział w przygotowaniu wniosku o finansowanie programu UPGOW: „Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy” (Program Operacyjny „Kapitał Ludzki”) w zakresie stworzenia dokumentacji dla staży zagranicznych dedykowanych dla kadry dydaktycznej WBiOŚ (2008 rok).  
Przygotowana przez mnie dokumentacja umożliwiła zwiększenie mobilności kadry dydaktycznej Wydziału, nawiązanie lub zacieśnienie współpracy między zespołami naukowymi WBiOŚ UŚ a zagranicznymi ośrodkami uniwersyteckimi i przede wszystkim podwyższenie kompetencji dydaktycznych pracowników WBiOŚ UŚ.
- B. Udział w przygotowywaniu dokumentacji przetargowej i prac związanych z remontem Wydziału WBiOŚ UŚ w ramach projektu MODLAB „Modernizacja infrastruktury zespołu laboratoriów dydaktycznych Uniwersytetu Śląskiego z zakresu nauk o środowisku w Katowicach i Sosnowcu” (Regionalny Program Operacyjny Województwa Śląskiego; 2012 rok).  
Przygotowanie tej dokumentacji pozwoliło na doposażenie laboratoriów o charakterze dydaktycznym w nowy sprzęt umożliwiający prowadzenie zajęć laboratoryjnych z szeroko pojętej biologii molekularnej. Poprawiło to jakość prowadzonej dydaktyki i istotnie ułatwiło jej organizację, dzięki stworzeniu dodatkowego laboratorium, w którym możliwe stało się prowadzenie tego typu zajęć.

- C. W latach 2008 – 2012: pełnienie funkcji przedstawiciela niesamodzielnych pracowników naukowo-dydaktycznych w Radzie Wydziału WBiOŚ.
- D. Udział w przygotowaniu „Założeń wstępnych do budowy Centrum Biotechnologii i Bioróżnorodności Uniwersytetu Śląskiego” (lata 2013 – 2016).  
Od wielu lat Wydział stara się o pozyskanie środków na budowę nowej siedziby, w której możliwe stałoby się stworzenie nowoczesnych laboratoriów badawczych i dydaktycznych, pozwalających na dalszy rozwój potencjału naukowego Wydziału. Wymaga to stosunkowo szczegółowego zaplanowania liczby i wielkości potrzebnych powierzchni laboratoryjnych, szklarniowych, administracyjnych, socjalnych czy zaplecza technicznego, a także niezbędnego wyposażenia do tego typu pomieszczeń. W trakcie prowadzonych w tym kierunku prac brałam udział w planowaniu kształtu nowej siedziby i zbieraniu zapotrzebowania na określone laboratoria i ich wyposażenie zgłaszanego przez poszczególne jednostki Wydziału. Wykonałam też syntezę zebranych informacji, co pozwoliło na późniejsze sporządzenie pełnej dokumentacji kilku wniosków o finansowanie budowy nowej siedziby Wydziału.
- E. W latach 2012 – 2016: pełnienie funkcji pełnomocnika Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska do spraw związanych z aparaturą Wydziału. W ramach tej działalności koordynowałam prace związane z promocją laboratoriów wydziałowych w ramach ogólnouczelnianej bazy przygotowywanej przez Dział Współpracy z Gospodarką Uniwersytetu Śląskiego.
- F. W roku 2019, po zmianach organizacyjnych w Uniwersytecie Śląskim, zostałam powołana przez Kanclerza UŚ na przedstawiciela Wydziału Nauk Przyrodniczych do Zespołu ds. Zarządzania Infrastrukturą Badawczą, Dydaktyczną i Artystyczną Uniwersytetu Śląskiego. W ramach tego Zespołu wypracowywany jest schemat zarządzania infrastrukturą Uniwersytetu, który pozwoliłby na efektywniejsze wykorzystanie potencjału posiadanego w poszczególnych jednostkach organizacyjnych Uniwersytetu.
- G. Poza wymienionymi wyżej zadaniami organizacyjnymi związanymi z funkcjonowaniem Wydziału czy Uniwersytetu, organizowałam także wydarzenia dydaktyczne lub konferencyjne. Należą do nich wspomniane w poprzedniej części kursy markerów molekularnych, prowadzone na zlecenie Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej w Wiedniu. Dodatkowo, zorganizowałam również międzynarodowe warsztaty pt. „Plant architecture traits and efficient energy assimilation for improved biomass and grain production in cereals”, które zrealizowane były na zakończenie projektu BarPLUS i pozwoliły na zaprezentowanie szerszej społeczności naukowej oraz hodowcom jęczmienia osiągniętych w projekcie wyników. Warsztaty te odbyły się w Katowicach w dniach 10-11 lipca 2019 roku.

## 7. Inne informacje , niewymienione w pkt. 1-6, dotyczące mojej kariery zawodowej.

Od kilku lat jestem aktywnym recenzentem publikacji naukowych. Wykonałam w sumie 27 recenzji prac zgłoszonych do publikacji w następujących czasopismach:

- Acta Physiologiae Plantarum
- Agronomy
- BMC Genomics
- BMC Plant Biology
- Forests
- Genes
- Hereditas
- International Journal of Molecular Sciences
- Plant Science
- Scientific Reports

Byłam również recenzentem raportu końcowego z realizacji jednego projektu naukowego finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Ponadto, recenzowałam dwa wnioski o przyznanie grantów na realizację projektów fenotypowania roślin z wykorzystaniem infrastruktury dostępnej w ramach sieci EPPN (European Plant Phenotyping Network), koordynowanej przez National Research Institute for Agriculture, Food and Environment in France (INRA - Montpellier).

### Uzyskane nagrody:

Podczas pracy na Uniwersytecie Śląskim otrzymałam kilka nagród za działalność naukowo-badawczą lub organizacyjną:

- Nagrodę indywidualną III stopnia za działalność naukowo-badawczą, Uniwersytet Śląski, Katowice, 01.10.2006
- Nagrodę indywidualną III stopnia za działalność organizacyjną, Uniwersytet Śląski, Katowice, 31.08.2008
- Nagrodę zespołową I stopnia za działalność naukowo-badawczą, Uniwersytet Śląski, Katowice, 01.10.2009
- Nagrodę zespołową I stopnia za działalność naukowo-badawczą, Uniwersytet Śląski, Katowice, 01.10.2012
- Nagrodę specjalną Rektora I stopnia za wybitne osiągnięcia naukowe, Uniwersytet Śląski, Katowice, 01.10.2017

.....  
*Agnieszka Jankowska*  
(podpis wnioskodawcy)