

## **Autoreferat**

Rola acetylacji histonów oraz sygnalizacji auksyny w tranzycji embriogenicznej u *Arabidopsis thaliana*

Barbara Wójcikowska



## Autoreferat

### 1. IMIĘ I NAZWISKO.

Barbara Wójcikowska

### 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

#### 2015 **Dyplom doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia**

Podmiot nadający stopień: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza funkcjonalna genu *LEAFY COTYLEDON2* podczas somatycznej embriogenezy w kulturze *in vitro Arabidopsis thaliana*.

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Gaj

#### 2009 **Dyplom magistra**

Podmiot nadający stopień: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (Kierunek: Biotechnologia; Specjalność: Biotechnologia roślin i mikroorganizmów). Tytuł pracy magisterskiej: Ocena zdolności do procesu organogenezy pędów *Arabidopsis thaliana* w kulturze *in vitro* przy nadekspresji genu *LEC2*.

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Gaj

#### 2007 **Dyplom licencjata**

Podmiot nadający stopień: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (Kierunek: Biotechnologia). Tytuł pracy licencjackiej: Genetyczne podstawy morfogenezy *in vitro* u roślin.

Promotor: prof. dr hab. Mirosław Małuszyński

### 3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.

02.10.2015 - obecnie: **adiunkt**, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach

13.10.2014 - 30.06.2015: **wykładowca**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

07.10.2013 - 30.06.2014: **asystent**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach

05.01.2009 - 30.09.2009: **pracownik gospodarczy**, 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 Z DNIA 20 LIPCA 2018R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

##### a) Temat osiągnięcia naukowego

**Rola acetylacji histonów oraz sygnalizacji auksyny w tranzycji embriogenicznej u *Arabidopsis thaliana*.**

##### b) Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, wraz z określeniem indywidualnego wkładu w ich powstanie

Załącznik	Dane bibliograficzne	IF <sup>1</sup>	MNiSW <sup>2</sup>	Cytowania <sup>3</sup>
H1	<b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*✉</sup> , Wójcik, A.M., Gaj, M.D. 2020. Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. International Journal of Molecular Sciences, 21, 2307. <b>Praca przeglądowa</b>	<b>5.9<sup>1</sup></b>	<b>140<sup>2a</sup></b> <b>140<sup>2b</sup></b>	<b>73<sup>3a</sup></b> <b>100<sup>3b</sup></b>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji publikacji; analiza i opracowanie wyników; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; udział w przygotowaniu manuskryptu, wszystkich figur oraz tabel; odpowiedzi na uwagi recenzentów; autor korespondencyjny.</i>			
H2	<b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*✉</sup> , Botor, M., Morończyk, J., Wójcik, A.M., Nodzyński, T., Karcz, J., Gaj, M.D. 2018. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in Arabidopsis explants via an auxin-related pathway. Frontiers in Plant Science, 9, 1353. <b>Praca oryginalna</b>	<b>4.1<sup>1</sup></b>	<b>40<sup>2a</sup></b> <b>100<sup>2b</sup></b>	<b>57<sup>3a</sup></b> <b>71<sup>3b</sup></b>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: opracowanie koncepcji publikacji; koordynowanie prac badawczych; uprawa i opieka fitosanitarna roślin donorowych; przygotowanie roztworów i pożywek; ocena zdolności embriogenicznych eksplantatów traktowanych trichostatyną A; współudział w kolekcjonowaniu tkanki do pomiaru aktywności enzymów HDAC i HAT; współudział w analizie ELISA; udział w ocenie związków indolowych pod wpływem traktowania trichostatyną A oraz lokalizacji sygnału GUS</i>			

	w eksplantatach; czasowo-przestrzenna analiza ekspresji genów biosyntezy auksyny; przeprowadzenie izolacji RNA oraz syntezy cDNA; udział w wykonaniu reakcji RT-PCR, RT-qPCR dla badanych genów; analiza, wizualizacja interpretacja i opracowanie wyników; dokumentacja fotograficzna wykonanych analiz; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; współudział w przygotowaniu manuskryptu; opracowanie większości figur, tabel, materiałów dodatkowych; odpowiedzi na uwagi recenzentów; autor korespondencyjny.			
<b>H3</b>	<b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*☒</sup> , Chwiałkowska, K., Nowak, K., Citerne, S., Morończyk, J., Wójcik, A.M., Kiwior-Wesołowska, A., Francikowski, J., Kwaśniewski, M., Gaj, M.D. 2024. Transcriptomic profiling reveals histone acetylation-regulated genes involved in somatic embryogenesis in <i>Arabidopsis thaliana</i> . BMC Genomics, 25, 788. <b>Praca oryginalna</b>	<b>3.7</b> <sup>1</sup>	<b>140</b> <sup>2a</sup> <b>140</b> <sup>2b</sup>	<b>7</b> <sup>3a</sup> <b>8</b> <sup>3b</sup>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji publikacji; koordynowanie prac badawczych, uprawa i opieka fitosanitarna roślin donorowych; przygotowanie roztworów i pożywek; udział w kolekcjonowaniu tkanki do analiz: zawartości tryptofanu, hormonów roślinnych, ekspresji genów (RT-qPCR), transkryptomicznych (RNA-Seq); ocena jakości wyizolowanego RNA; udział w przygotowaniu bibliotek cDNA; udział w analizie statystycznej otrzymanych wyników oraz bioinformatycznej RNA-Seq; przeprowadzenie reakcji qPCR; współudział w genotypowaniu linii mutantów; współudział w przeprowadzaniu analiz zdolności do procesów morfogenetycznych badanych genotypów w różnych kombinacjach doświadczalnych; ocena wpływu orientacji/polarności eksplantatu na zdolność do procesu SE; analiza, wizualizacja interpretacja i opracowanie wyników; dokumentacja fotograficzna wykonanych analiz; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; współudział w przygotowaniu manuskryptu; opracowanie wszystkich figur, tabel, materiałów dodatkowych; odpowiedzi na uwagi recenzentów; autor korespondencyjny.</i>			
<b>H4</b>	Nowak, K. <sup>*</sup> , <b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*</sup> , Gajecka, M., Elźbieciak, A., Morończyk, J., Wójcik, A.M., Żemła, P., Citerne, S., Kiwior-Wesołowska, A., Zbieszczyk, J., Gaj, M.D. 2024. The improvement of the <i>in vitro</i> plant regeneration in barley with the epigenetic modifier of histone acetylation, trichostatin A. Journal of Applied Genetics, 65, 13-30. <b>Praca oryginalna</b>	<b>1.9</b> <sup>1</sup>	<b>140</b> <sup>2a</sup> <b>140</b> <sup>2b</sup>	<b>7</b> <sup>3a</sup> <b>13</b> <sup>3b</sup>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji analiz; koordynowanie prac badawczych; uprawa i opieka fitosanitarna roślin donorowych; przygotowanie roztworów i pożywek; udział w przeprowadzeniu trzyletnich, cyklicznych analiz zdolności do procesów morfogenetycznych badanych genotypów jęczmienia w różnych kombinacjach doświadczalnych z użyciem trichostatyny A; udział w wyborze genów</i>			

	<i>kandydackich do analizy ekspresji genów; wizualizacja interpretacja i opracowanie wyników; dokumentacja fotograficzna wykonanych analiz.</i>			
<b>H5</b>	Wójcik, A.M. *, <b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*☒</sup> , Gaj, M.D. 2020. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. International Journal of Molecular Sciences, 21, 1333. <b>Praca przeglądowa</b>	<b>5.9<sup>1</sup></b>	<b>140<sup>2a</sup></b> <b>140<sup>2b</sup></b>	<b>139<sup>3a</sup></b> <b>181<sup>3b</sup></b>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji publikacji; analiza i opracowanie wyników; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; współudział w przygotowaniu manuskryptu, figur oraz tabel; odpowiedzi na uwagi recenzentów; autor korespondencyjny.</i>			
<b>H6</b>	<b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*☒</sup> , Gaj, M.D. 2017. Expression profiling of <i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i> genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. Plant Cell Reports, 36, 843-858. <b>Praca oryginalna</b>	<b>3.0<sup>1</sup></b>	<b>35<sup>2a</sup></b> <b>100<sup>2b</sup></b>	<b>122<sup>3a</sup></b> <b>155<sup>3b</sup></b>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji analiz; zaprojektowanie i optymalizacja działania starterów; przeprowadzenie izolacji RNA oraz syntezy cDNA; wykonanie reakcji RT-PCR oraz RT-qPCR dla genów ARF1-23; wyselekcjonowanie homozygotycznych linii mutantów arf; przeprowadzenie analiz zdolności do procesów morfogenetycznych badanych linii transgenicznych; czasowo-przestrzenna analiza miejsca ekspresji badanych genów podczas procesów morfogenetycznych; analiza, wizualizacja interpretacja i opracowanie wyników; przeprowadzenie analizy statystycznej otrzymanych wyników; dokumentacja fotograficzna wykonanych analiz; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; udział w przygotowaniu manuskryptu; opracowanie wszystkich figur, tabel, materiałów dodatkowych; odpowiedzi na uwagi recenzentów; kierownik projektu PRELUDIUM 5, w ramach, którego prowadzono badania.</i>			
<b>H7</b>	<b>Wójcikowska, B.</b> *, Belaidi, S. *, Robert, H.S. 2023. Game of thrones among AUXIN RESPONSE FACTORs-over 30 years of MONOPTEROS research. Journal of Experimental Botany, 74, 6904-6921. <b>Praca przeglądowa</b>	<b>5.8<sup>1</sup></b>	<b>140<sup>2a</sup></b> <b>140<sup>2b</sup></b>	<b>14<sup>3a</sup></b> <b>17<sup>3b</sup></b>
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: opracowanie koncepcji publikacji; analiza i opracowanie wyników; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; udział w przygotowaniu manuskryptu, stworzenie wszystkich figur oraz tabel; odpowiedzi na uwagi recenzentów.</i>			
<b>H8</b>	<b>Wójcikowska, B.</b> <sup>*☒</sup> , Belaidi S. *, Mironova V., Citerne, S., Robert S.R. 2025. MONOPTEROS isoform MP11ir role during somatic embryogenesis in	<b>6.9<sup>1</sup></b>	<b>140<sup>2a</sup></b> <b>140<sup>2b</sup></b>	<b>0<sup>3a</sup></b> <b>1<sup>3b</sup></b>

	<i>Arabidopsis thaliana</i> . Plant Physiology, 199, k1af602. <b>Praca oryginalna</b>			
	<i>Wkład habilitantki w powstanie publikacji: opracowanie koncepcji analiz; ocena zdolności embriogenicznych wszystkich analizowanych linii transgenicznych oraz kontroli traktowanej różnymi związkami chemicznymi; przeprowadzenie izolacji RNA oraz syntezy cDNA; wykonanie wszystkich reakcji qPCR; udział w wyprowadzeniu na drodze krzyżowania oraz genotypowaniu wszystkich użytych linii transgenicznych; udział w czasowo-przestrzennej analizie ekspresji badanych genów z użyciem linii translacyjnych podczas procesów morfogenetycznych; kolekcja materiału roślinnego do analiz zawartości auksyny; analiza, wizualizacja interpretacja i opracowanie wyników; przeprowadzenie analizy statystycznej otrzymanych wyników; dokumentacja fotograficzna wykonanych analiz; zebranie i szczegółowe przeanalizowanie danych literaturowych; udział w przygotowaniu manuskryptu; opracowanie wszystkich figur (z wykluczeniem figury 3), tabel, materiałów dodatkowych oraz ich zdeponowanie w repozytorium; odpowiedzi na uwagi recenzentów; autor korespondencyjny; kierownik projektu OPUS LAP 26, w ramach, którego prowadzono badania.</i>			

<sup>1</sup> Wartość wskaźnika Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) podano zgodnie z rokiem ich opublikowania,

<sup>2a</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>2b</sup> Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych, obowiązującym w roku 2025;

<sup>3a</sup> Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus na dzień 26.11.2025

<sup>3b</sup> Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Google Scholar na dzień 26.11.2025

\* pierwszy autor

☒ autor korespondencyjny

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych obejmuje 8 publikacji:

- 5 publikacji oryginalnych
- 3 publikacje przeglądowe

*W 6 publikacjach jestem pierwszym autorem, w 2 jestem drugim autorem ze wskazaniem na równorzędny wkład, a w 6 jestem autorem korespondencyjnym (☒).*

Sumaryczny IF <sup>1</sup> publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	<b>37.2</b>	
Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	MNiSW <sup>2a</sup> <b>915</b>	MNiSW <sup>2b</sup> <b>1040</b>
Sumaryczna liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus <sup>3a</sup> lub Google Scholar <sup>3b</sup>	Scopus <sup>3a</sup> : <b>437</b> , bez autocytowań <b>419</b>	Google Scholar <sup>3b</sup> : <b>546</b>

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zamieszczono w załączniku numer 4.

Oświadczenia współautorów prac, w kolejności alfabetycznej, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zamieszczono w załączniku numer 5.

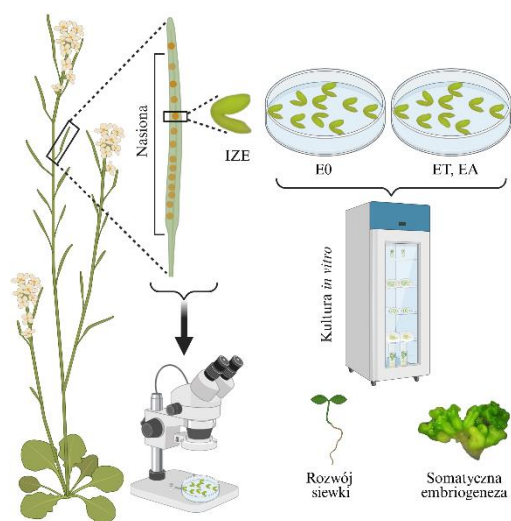
**c) Merytoryczny opis prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego****Wprowadzenie - charakterystyka procesu somatycznej embriogenezy oraz zasadność badań plastyczności rozwojowej w kulturach *in vitro* u modelowego gatunku *Arabidopsis thaliana*.**

W wyniku tranzykcji embriogenicznej, z komórek somatycznych powstają dwubiegunowe struktury, zwane zarodkami somatycznymi, które mogą rozwijać się w rośliny. Pierwsze doniesienie dotyczące indukcji zarodków somatycznych u *Arabidopsis thaliana* w kulturach *in vitro* zostało opublikowane w 1983 roku [1]. Od tego czasu opracowano kilkanaście protokołów dotyczących indukcji procesu somatycznej embriogenezy (SE) u tego gatunku, w których stosowano różne pożywki indukcyjne, eksplantaty oraz genotypy (Wójcikowska i Gaj, 2016, P14). Można wyróżnić bezpośrednią SE, gdzie zarodki somatyczne mogą rozwijać się bezpośrednio z tkanki eksplantatu oraz pośrednią, gdzie formowanie zarodków somatycznych poprzedza utworzenie kalusa. Najczęściej proces SE u *Arabidopsis thaliana* jest indukowany z niedojrzałych zarodków zygocytynych (IZE) traktowanych syntetyczną auksyną – dlatego też stanowi idealny model do analizy molekularnego mechanizmu działania tego hormonu. Poza auksyną, do indukcji SE u *Arabidopsis thaliana* można wykorzystywać także inne związki chemiczne. Niezależnie od użytego induktora, tranzykcja embriogeniczna związana jest z przeprogramowaniem transkryptomocznym komórek somatycznych i obejmuje regulację ekspresji genów na poziomie epigenetycznym i transkrypcyjnym (Wójcikowska i in., 2020, H1, P8).

W obliczu stale rosnącej populacji ludzkiej, postępujących zmian klimatu skutkujących spadkiem plonowania oraz nasilającego się zanieczyszczenia środowiska, znaczenie propagacji roślin z wykorzystaniem technik *in vitro* stale rośnie. Rola kultur *in vitro* w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego staje się coraz ważniejsza [2]. Globalny rynek kultur tkankowych roślin został wyceniony w 2024 roku na 564 miliony dolarów, a prognozy wskazują, że do 2034 roku osiągnie wartość 1.367 miliarda dolarów (<https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/plant-tissue-culture-market>).

Oznacza to, że kultura tkankowa roślin jest istotną technologią, zwłaszcza dla krajów rozwijających się i rozwiniętych – umożliwiającą produkcję wolnego od patogenów, wysokiej jakości materiału sadzeniowego oraz szybkie namnażanie dużej liczby jednolitych roślin. Proces SE jest zatem szeroko wykorzystywany do masowego mikrorozmnażania gatunków roślin o znaczeniu agrobotanicznym. Protokoły oparte na SE są również powszechnie stosowane do produkcji roślin transgenicznych, co jest kluczowe dla rozwoju biotechnologii oraz badań podstawowych [3]. Dodatkowo SE stanowi cenne narzędzie w ochronie

bioróżnorodności roślin [4]. Oprócz praktycznego znaczenia w biotechnologii, proces SE dostarcza wartościowego systemu modelowego do badań nad embriogenezą oraz plastycznością rozwojową i pluripotencją somatycznych komórek roślin (Wójcikowska i Gaj, 2016, P14). Wciąż wiele gatunków roślin nie może być skutecznie propagowanych metodami *in vitro*, a mechanizm stojący za ich opornością nie jest znany. Dlatego konieczne jest dogłębne poznanie molekularnego mechanizmu działania głównych induktorów procesów morfogenetycznych – w celu zwiększenia wydajności regeneracji roślin u genotypów opornych w warunkach *in vitro*. Do tego celu wykorzystywane są rośliny modelowe tj. *Arabidopsis thaliana*.



W naszych badaniach indukowano bezpośredni proces SE z użyciem eksplantatów, niedojrzałych zarodków zygotycznych w stadium zagiętych liścieni, które były izolowane z nasion rozwijających się w łuszczynach. Eksplantaty IZE na podłożu bezhormonalnym (E0), rozwijają się w siewki, traktowanie eksplantatów induktorami tj. trichostatyna A - TSA (1.0 μM) lub kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy - 2,4-D (5.0 μM), włącza tranzycję embriogeniczną (Fig.1).

Figura 1. Model badawczy wykorzystywany w prezentowanych analizach procesu somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*. IZE – niedojrzały zarodek zygotyczny; E0 – pożywka bezhormonalna; EA – pożywka z 5.0 μM 2,4-D; ET - pożywka z 1.0 μM TSA.

### **Rola acetylacji histonów w procesie somatycznej embriogenezy oraz trichostatyna A (TSA) – jako narzędzie badania acetylacji histonów i induktor somatycznej embriogenezy.**

Znaczące zmiany transkryptomu wynikają z działania czynników epigenetycznych. Wśród tych czynników cząsteczki mikroRNA (miRNA) odgrywają istotną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [5]. Oprócz miRNA, modyfikacje epigenetyczne DNA i histonów uważa się za kluczowe w kontrolowaniu procesów rozwojowych [6]. Wśród procesów epigenetycznych to metylacja DNA oraz acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, sumoilacja histonów należą do najintensywniej badanych mechanizmów regulacyjnych kontrolujących ekspresję genów [7]. W pracy przeglądowej omówiliśmy rolę czynników epigenetycznych w tranzycji embriogenicznej u *Arabidopsis thaliana* i innych gatunków roślin (Wójcikowska i in., 2020, H1, P8).

Podczas regulacji ekspresji genów zależnej od acetylacji histonów, acetylotransferazy histonowe (HAT) neutralizują dodatni ładunek lizyny w ogonach histonowych, co sprzyja powstaniu „otwartej” i transkrypcyjnie aktywnej chromatyny. Odwrotnie działające deacetylazy histonowe (HDAC) przywracają dodatni ładunek lizyny w histonach, co prowadzi do kondensacji chromatyny i negatywnie wpływa na ekspresję genów [8]. Badania roli acetylacji histonów w regulacji genów opierają się na chemicznym hamowaniu aktywności enzymów HAT [9] i HDAC [10]. Trichostatyna A to środek przeciwgrzybiczy wyizolowany ze *Streptomyces hygroscopicus*, wykazujący działanie hamujące wobec zależnych od cynku białek HDAC (rodzina RPD3/HDA1 oraz HD2) [11, 12]. Wykazano, że TSA zwiększa poziom acetylacji histonów H3 i H4 zarówno w skali globalnej, jak i na poziomie specyficznych genów, a zmiany acetylacji po traktowaniu TSA obejmują H3K9/K14 oraz H4K5 [13-15]. Zgodnie z rolą TSA w promowaniu acetylacji histonów, wykazano, że jej zastosowanie zwiększa dostępność chromatyny zarówno u zwierząt, jak i u roślin. Ze względu na aktywność TSA prowadzącą do dekondensacji chromatyny, obecnie rekomenduje się jej użycie w celu poprawy wydajności klonowania zwierząt [16-18] i roślin oraz procesu transformacji genetycznej roślin [19]. Wiedza o kontroli morfogenezy roślin indukowanej *in vitro*, w tym SE, za pośrednictwem acetylacji histonów jest nadal ograniczona i opiera się na badaniach prowadzonych na roślinach modelowych bądź ważnych agrobotanicznie. Dowody na udział (de)acetylacji histonów w przejściu komórek w stan embriogeniczny *in vitro* obejmują zróżnicowaną ekspresję wielu genów *HDAC* i *HAT* podczas procesu SE różnych gatunków roślin [20-22]. Jednak dwie deacetylazy, HDA6 i HDA19, wydają się szczególnie istotne w indukcji SE, gdyż mutanty *hda6/hda19* formowały zarodki somatyczne na liściach, co udokumentowano w 2008 roku [23]. HDA6 i HDA19 kontrolują ekspresję genów w zarodkach zygotycznych, przez represję genów kodujących kluczowe dla SE czynniki transkrypcyjne, pionierski *TF LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* i *TF LEC2* [24-26]. Zwiększony poziom acetylacji histonów H3 i H4, związany z ekspresją genów kodujących acetylotransferazy histonowe, zaobserwowano podczas androgenezy u *Brassica napus* [21], a wzrost poziomu specyficznych markerów acetylacji histonów (H3K9 i H3K14) towarzyszył dekondensacji chromatyny i aktywacji transkrypcji genów podczas dedyferencji protoplastów *Nicotiana tabacum* [27]. Eksperymenty z użyciem TSA sugerują również, że acetylacja histonów odgrywa rolę w kontroli SE, a hamowanie aktywności HDAC przez TSA prowadzi do hiperacetylacji histonów i zmian konformacyjnych chromatyny związanych ze wzmożoną ekspresją genów [28]. Wspierając rolę acetylacji histonów w kontroli indukcji SE, wykazano, że traktowanie eksplantatów TSA sprzyjało rozwojowi struktur embriogenicznych u roślin iglastych *Picea abies*, *Pinus sylvestris*

[29, 30], *Arabidopsis thaliana* (Wójcikowska i in., 2018, H2, P10), *Vitis vinifera* [31] oraz *Coffea arabica* [32]. Korzystne efekty TSA odnotowano również w kulturze mikrospor *Brassica napus* [33], *Triticum aestivum* [34-36], *Brassica oleracea* [37] *Brassica rapa*, *Arabidopsis thaliana* and *Capsicum annuum* (Patent US 20160212956A1). Najnowsze badania wskazują, że TSA może promować regenerację także na drodze organogenezy u *Arabidopsis thaliana* [38, 39]. Niemniej jednak szczegółowy mechanizm TSA-zależnego uruchomienia tranzykcji embriogenicznej w roślinnych komórkach somatycznych, nie został dotąd dokładnie poznany.

### **Trichostatyna A - induktor procesu somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*.**

By zbadać rolę acetylacji histonów w epigenetycznej regulacji tranzykcji embriogenicznej oceniliśmy wpływ TSA na zdolność eksplantatów IZE *Arabidopsis thaliana* do indukcji procesu somatycznej embriogenezy (Wójcikowska i in., 2018, H2, P10). Eksplantaty IZE wzrastające na podłożu bezhormonalnym E0 rozwijają się w siewki, podczas gdy  **dodanie TSA do podłoża E0 w stężeniach 0.1–1.0  $\mu\text{M}$ , prowadzi do powstawania struktur przypominających zarodki somatyczne (Fig. 2A). Wyłącznie górna część eksplantatów, obejmująca liścienie i merystem wierzchołkowy pędu (SAM), reaguje na działanie TSA**, a pierwsze struktury zarodko-podobne pojawiają się po stronie adaksjalnej liścienia w 10-dniowej kulturze *in vitro*. Stwierdziliśmy, że 42–61% eksplantatów traktowanych 0.1–1.0  $\mu\text{M}$  TSA przeszło indukcję SE, a średnio na jednym eksplantacie powstaje 27 struktur zarodko-podobnych. Jest kilka metod oceny, czy regenerujące struktury to zarodki somatyczne, czy też pędy. By potwierdzić, że regenerujące struktury zarodko-podobne to faktycznie zarodki somatyczne (zarodki somatyczne są zdolne do konwersji w siewki) przenoszono je na podłoże bezhormonalne pozbawione TSA. Zaobserwowaliśmy, że wzrost stężenia TSA był dodatnio skorelowany z częstotliwością regeneracji roślin ze struktur zarodko-podobnych. Odpowiednio, struktury zarodko-podobne indukowane na podłożu ET z 1.0  $\mu\text{M}$  TSA konwertowały w siewki z najwyższą wydajnością, wynoszącą 60% (Fig. 2B). Wynik ten wskazuje, że większość struktur przypominających zarodki, indukowanych w obecności 1.0  $\mu\text{M}$  TSA, stanowiła kompletne zarodki somatyczne z funkcjonalnymi biegunami – pędowym i korzeniowym. Dodatkowym dowodem tożsamości zarodkowej struktur indukowanych przez TSA było barwienie Sudanem Red 7B, który wykrywa neutralne lipidy gromadzące się w tkankach o charakterze embriogenicznym. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do siewek i pędów rozwijających się odpowiednio na podłożach E0 i CIM/SIM (Callus Induction Medium/Shoot Induction Medium), struktury regenerujące

po użyciu TSA wykazywały intensywne czerwone zabarwienie, wskazujące na ich zarodkowy charakter (Fig. 2C). **Podsumowując, wykazaliśmy, że TSA w stężeniu 1.0  $\mu\text{M}$  skutecznie indukuje odpowiedź embriogeniczną w eksplantatach IZE, a większość rozwijających się struktur stanowiły bipolarne zarodki somatyczne z funkcjonalnymi biegunami – pędowym i korzeniowym**, dlatego to stężenie wykorzystano w dalszych analizach. W związku z tym, że 2,4-D jest powszechnie stosowany do indukcji odpowiedzi embriogenicznej u *Arabidopsis thaliana*, sprawdziliśmy reakcję eksplantatów traktowanych jednocześnie 1.0  $\mu\text{M}$  TSA i 2,4-D. Wykazaliśmy, że 2,4-D negatywnie wpływał na odpowiedź embriogeniczną indukowaną TSA w sposób zależny od stężenia. Całkowite zahamowanie odpowiedzi embriogenicznej i powstawanie nieembriogenicznego kalusa obserwowaliśmy w eksplantatach na podłożu ET (1.0  $\mu\text{M}$  TSA) z dodatkiem 3.5  $\mu\text{M}$  2,4-D. Hamowanie TSA-indukowanej SE nie było specyficzne tylko dla 2,4-D – również inne auksyny, takie jak kwas indolilo-3-octowy (IAA) i kwas naftylo-1-octowy (NAA), znacząco ograniczały indukcję SE na podłożu ET.

Izolowane liścienie IZE (ale nie hipokotyle) również wykazywały wysoką wydajność SE – ponad 80% liścieni ułożonych stroną abaksjalną na podłożu z dodatkiem 1.0  $\mu\text{M}$  TSA tworzyło liczne zarodki somatyczne na stronie górnej, tj. adaksjalnej (Fig. 2D). Dla porównania, liścienie umieszczone odwrotnie na podłożu wykazywały znacznie słabszą odpowiedź embriogeniczną (nawet 2.5-krotnie niższą). **Reasumując, wykazaliśmy, że strona adaksjalna liścieni IZE efektywnie reagowała na TSA-indukując tranzycję embriogeniczną – co wskazuje, że polarność tkanki jest istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność procesu SE.**

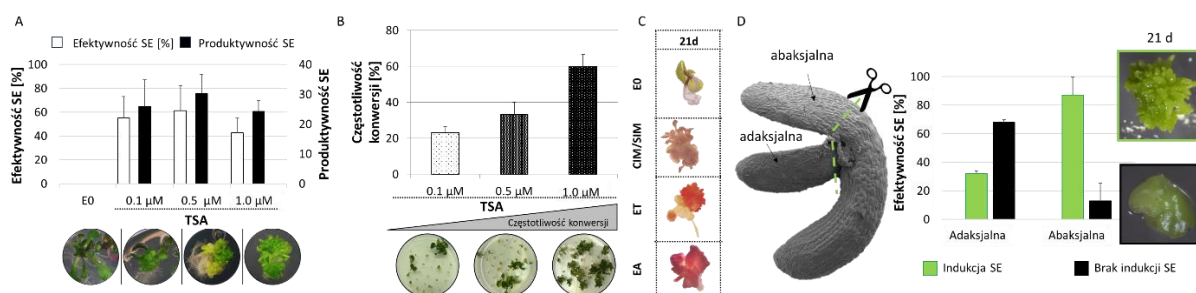


Figura 2. Indukcja procesu SE z wykorzystaniem TSA. A. Zdolność do tranzycji embriogenicznej eksplantatów IZE traktowanych różnymi stężeniami TSA. B. Konwersja struktur zarodko-podobnych, zregenerowanych pod wpływem traktowania IZE różnymi stężeniami TSA, w siewki. C. Barwienie Sudanem Red 7B 21-dniowej kultury IZE formującej siewkę (pożywka E0), pędy (pożywka CIM/SIM), lub zarodki somatyczne (pożywki ET, EA). Indukcja procesu SE po traktowaniu 1.0  $\mu\text{M}$  TSA liścieni ułożonych stroną adaksjalną lub abaksjalną do żywki. d - dzień kultury *in vitro*; CIM – Callus Induction Medium; E0 – żywka bezhormonalna; EA – żywka z 5.0  $\mu\text{M}$  2,4-D; ET - żywka z 1.0  $\mu\text{M}$  TSA; SIM – Shoot Induction Medium; SE – somatyczna embriogeneza.

Aby zweryfikować założenie, że TSA promuje indukcję SE przez mechanizm związany z acetylacją histonów, oceniliśmy aktywność enzymów HDAC i HAT w eksplantatach traktowanych 1.0  $\mu$ M TSA. Analiza wykazała znaczną redukcję aktywności enzymów HDAC – nawet o 93% – w eksplantatach traktowanych TSA w porównaniu ze świeżo izolowanymi zarodkami zygotycznymi (0 dzień kultury IZE). Co ciekawe, aktywność HDAC zmniejszała się również w eksplantatach na podłożach bez TSA (E0 i EA), jednak była ona do dwóch razy niższa w eksplantatach traktowanych TSA. Oprócz HDAC, aktywność HAT również była istotnie zredukowana w eksplantatach podczas indukcji embriogenicznej *in vitro*, a najniższą aktywność wykazywały kultury traktowane auksyną 2,4-D i TSA – nawet pięciokrotnie niższą niż w świeżo izolowanych eksplantatach (0 dzień). **Udowodniliśmy, że TSA hamuje aktywność enzymatyczną HDAC, a tranzycji embriogenicznej towarzyszy spadek aktywności zarówno HDAC, jak i HAT.**

Następnie, oceniliśmy poziom ekspresji kilku genów kodujących czynniki transkrypcyjne, które mają udokumentowany udział w indukcji SE, w tym *LEC1*, *LEC2*, *FUSCA 3 (FUS3)*, *BABY BOOM (BBM)*, *WUSCHEL (WUS)*, *AGAMOUS LIKE 15 (AGL15)*, *EMBRYOMAKER (EMK)* i *MYB118*, podczas TSA-zależnej indukcji procesu SE. Zaobserwowano, że z wyjątkiem *WUS*, którego ekspresji nie wykryto w żadnym z analizowanych dni (5, 10, 15, 21, 28), **traktowanie TSA znacząco zwiększało ekspresję wszystkich pozostałych analizowanych genów TF**. Najsilniejszą indukcję ekspresji wykazał gen *MYB118*, którego poziom wzrósł aż 255-krotnie w 15-dniowej kulturze indukowanej TSA. Pozostałe geny, takie jak *LEC1*, *LEC2*, *AGL15*, *FUS3* i *BBM*, wykazywały co najmniej 15-krotny wzrost ekspresji w odpowiedzi na TSA, przy czym dla większości z nich maksymalny wzrost obserwowano w 15. dniu kultury na podłożu ET. Co istotne, poziom ekspresji badanych genów kodujących TF, w kulturze indukowanej TSA, był znacząco wyższy niż w eksplantatach traktowanych auksyną 2,4-D. W szczególności ekspresja genu *LEC2* była ponad 125-krotnie wyższa w odpowiedzi na TSA niż po traktowaniu 2,4-D. Można zatem stwierdzić, **TSA-zależnej indukcji tranzycji embriogenicznej towarzyszy aktywacja ekspresji genów TF – markerów procesu SE.**

Genami bezpośrednio kontrolowanymi przez wyżej analizowane czynniki transkrypcyjne, są geny zaangażowane w szlak biosyntezy auksyny. Ze względu na kluczową rolę kumulacji endogennej auksyny w indukcji SE, oceniliśmy jej poziom w eksplantatach traktowanych 1.0  $\mu$ M TSA. Analiza zawartości związków indolowych, będących pośrednim wskaźnikiem obecności IAA, wykazała ponad trzykrotny wzrost w 10-dniowej kulturze IZE traktowanej 1.0  $\mu$ M TSA. Dodatkowym pośrednim dowodem intensywnej akumulacji auksyny

był silny sygnał pDR5::GUS w eksplantatach podczas kultury na podłożu ET. **Zatem potencjalnie zwiększona biosynteza IAA jest związana z TSA-zależnym mechanizmem indukcji SE.** Aby zidentyfikować geny biosyntezy auksyny aktywowane pod wpływem TSA, przeanalizowaliśmy ekspresję jedenastu genów rodziny *YUCCA* (*YUC*) podczas TSA-zależnej indukcji embriogenicznej. Analiza RT-PCR wykazała ekspresję dziewięciu genów *YUC* (*YUC1*, 3- 6, 8- 11) podczas TSA-zależnej indukcji SE. Analiza RT-qPCR potwierdziła istotną indukcję genów *YUC1* i *YUC10*, których ekspresja była ponad 1300-krotnie wyżej w eksplantatach traktowanych TSA. Analiza transkrypcyjnych linii reporterowych pYUC1:GFP i pYUC10:GFP wykazała, że w odpowiedzi na TSA geny *YUC1* i *YUC10* były aktywne w liścieniach i rejonie bliskim SAM, tj. obszarach zaangażowanych w indukcję SE. Sygnał GFP zlokalizowany był na stronie adaksjalnej liścieni i skorelowany z miejscami indukcji SE. W późniejszej fazie (10. dniu kultury) ekspresja badanych genów była widoczna w zarodkach somatycznych w stadium globularnym. Ekspresja *YUC1* i *YUC10* nie była jednak ograniczona wyłącznie do tkanek zaangażowanych w SE – sygnał GFP obserwowano również w hipokotylach, z których nie formowały się zarodki somatyczne.

Biorąc pod uwagę, że jednoczesne traktowanie eksplantatów TSA i różnymi auksynami (2,4-D, IAA, NAA) hamowało odpowiedź embriogeniczną, zbadano poziom ekspresji kluczowych regulatorów SE w eksplantatach na podłożu ET z dodatkiem 2,4-D. Przeanalizowaliśmy ekspresję genów *LEC1*, *LEC2* i *BBM*, które kontrolują biosyntezę auksyny i stwierdziliśmy silne zahamowanie ich ekspresji w kulturze indukowanej na podłożu ET uzupełnionym 5  $\mu$ M 2,4-D. Wyniki te sugerują, że **obserwowane zahamowanie odpowiedzi embriogenicznej na podłożu ET z 2,4-D wynikało ze zredukowanej ekspresji genów kodujących te czynniki transkrypcyjne odgrywające kluczową rolę w indukcji SE.** Wyniki te mogą tłumaczyć dlaczego, w niektórych przypadkach zastosowanie TSA miało negatywny wpływ na indukcję kalusa u *Arabidopsis thaliana* [40], czy *Oryza sativa* [41].

**Podsumowując, udowodniliśmy, że TSA może być stosowany do efektywnej indukcji procesu SE u *Arabidopsis thaliana*.** Wykazaliśmy, że działanie TSA opiera się na zahamowaniu działania enzymów – deacetylaz histonowych, co prowadzi do aktywacji ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne o priorytetowej funkcji w procesie SE. Aktywacja kluczowych dla SE TF, skutkuje uruchomieniem biosyntezy endogennej auksyny, co jest strategicznym elementem tranzycji embriogenicznej.

**Zmiany transkryptomyczne wywołane TSA-zależną indukcją procesu somatycznej embriogenezy oraz identyfikacja nowych genów o kluczowej roli w tranzycji embriogenicznej.**

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że traktowanie TSA eksplantatów IZE *Arabidopsis thaliana* prowadzi do indukcji embriogenicznego szlaku rozwojowego i powstawania somatycznych zarodków bez konieczności zastosowania egzogennej auksyny w pożywce (Wójcikowska i in., 2018, H2, P10). Stąd też celem dalszych badań było przybliżenie funkcji acetylacji histonów w przeprogramowaniu embriogenicznym somatycznych komórek roślinnych przez poznanie molekularnego mechanizmu procesu SE indukowanego TSA oraz jego porównanie z procesem SE indukowanym traktowaniem eksplantatów auksyną, 2,4-D.

Analizy porównawcze transkryptomów (metodą RNA-seq) kultur embriogenicznych indukowanych TSA (ET) *versus* auksyną, 2,4-D (EA) oraz nieembriogenicznej kultury kontrolnej (E0) doprowadziły nas do identyfikacji genów o istotnych zmianach ekspresji, w tym wskazaliśmy geny: (i) specyficznym deregulowane po traktowaniu TSA; (ii) specyficznym deregulowane po traktowaniu 2,4-D; (iii) wykazujące podobny wzór ekspresji po traktowaniu obu zastosowanych induktorów SE (TSA i 2,4-D). Analizy RNA-seq objęły ogółem 27 581 genów. Wyniki wskazały na podobną ilość genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG) tj. 44,4% (13 636) i 44,9% (13 797) odpowiednio dla ET i EA. Odnotowano znacznie więcej genów DEG cechujących się obniżoną ekspresją podczas tranzycji embriogenicznej. Odpowiednio 56,0% i 60,6% genów DEG wykazywało istotnie obniżoną ekspresję w odpowiedzi na traktowanie TSA (ET) i 2,4-D (EA), w porównaniu do pożywki kontrolnej E0. Warto zauważyć, że co najmniej jedna piąta genów DEG podlegających obniżonej ekspresji wykazała jej istotny spadek- co najmniej dziesięciokrotny ( $FC < 10$ ). Kryterium to spełniało odpowiednio ~26% (1 428) i ~27% (1 866) genów DEG w kulturach ET i EA. Znacznie rzadziej występowały geny o silnie podwyższonej ( $FC > 10$ ) ekspresji, które stanowiły ~5% genów DEG o podwyższonej ekspresji, odpowiednio 221 i 222, w kulturach ET i EA.

Najistotniejszą, zidentyfikowaną grupą genów, były te wykazujące podobny wzór ekspresji po traktowaniu obu zastosowanych SE-induktorów (TSA i 2,4-D). W tym celu wyodrębniono DEG, które cechowały się zróżnicowaną ekspresją we wczesnym (5 dzień kultury), jak i zaawansowanym (10 dzień kultury) etapie SE w kulturach ET i EA. Zidentyfikowano 1 746 genów o podwyższonej oraz 3 471 o obniżonej ekspresji we wczesnym i późnym etapie SE. Wśród nich 947 wykazywało zwiększoną, a 2445 zmniejszoną ekspresję zarówno w ET, jak i EA, w obu analizowanych punktach czasowych procesu SE (w 5 i 10 dniu kultury). Wyniki wskazują na ponad 2.5-krotnie więcej genów o stale obniżanej, niż

podwyższonej ekspresji w kulturach embriogenicznych, co sugeruje, że szeroko zakrojona negatywna regulacja genów jest charakterystyczna dla tranzykcji embriogenicznej. Analiza GO 947 DEG o podwyższonej ekspresji podczas SE niezależnie od użytego induktora, wykazała liczne geny zaangażowane w cykl komórkowy (171), replikację DNA (55) i jego naprawę (93), organizację chromosomów (113) oraz wyciszenie genów indukowane przez wirusy RNA (27). Geny te uczestniczą w podstawowych procesach molekularnych, takich jak podziały komórkowe, wzrost i odróżnicowanie - kluczowych dla przeprogramowania komórek. Geny o podwyższonej ekspresji w SE były również przypisane do innych procesów związanych z SE, w tym odpowiedzi na auksynę (39), czy rozwoju organów kwiatowych i embriogenezy (139). Wśród genów o zwiększonej ekspresji zidentyfikowano *TF* o kluczowym znaczeniu dla embriogenezy, takie jak *LEC1*, *LEC2*, *ARF*, *AUX/IAA*, *PHB*, *PHV*, *SERK1*, *WOX* oraz *EMB*. Natomiast 2 445 DEG o obniżonej ekspresji w kulturach ET i EA były związane m.in. z organizacją ściany komórkowej (145) oraz rozwojem organów, tkanek i komórek (np. korzeń – 96; epiderma – 52; włosnik – 30; trichoblast – 40). Ponadto wykryto liczne geny zaangażowane w biosyntezę i metabolizm kwasu jasmonowego (16) oraz metabolizm ksyloglukanów i ksylanu (41). **Podsumowując, analiza GO wykazała, że geny o podwyższonej ekspresji podczas SE były bezpośrednio związane z reprodukcją roślin i procesami embriogenezy, podczas gdy geny o obniżonej ekspresji odpowiadały głównie za różnicowanie i specyfikację komórek.** Podobnie deregulowane w kulturach ET i EA DEG mogą reprezentować zestaw wspólnych, kluczowych – niezależnie od czynnika indukcyjnego – regulatorów SE, obejmujących *TF* o znanej roli w embriogenezie somatycznej (takich jak *LAF1*, *SERK*, *WUS/WOX*) oraz kandydatów potencjalnie związanych z reprodukcją roślin i embriogenezą zygocytową.

Integracja globalnych analiz transkryptomu metodą RNA-seq z analizami zawartości hormonów pozwoliła nam na wytypowanie związanych z fitohormonami, metabolicznych i sygnalizacyjnych szlaków, zaangażowanych w proces tranzykcji embriogenicznej. Wykazaliśmy, że indukcji SE towarzyszy biosynteza prekursora IAA tryptofanu (Trp), jak i samego IAA, aktywacja transportu i sygnalizacji tego hormonu. W związku z tym, że tryptofan stanowi substrat do produkcji IAA, analizie poddano 20 genów zaangażowanych w biosyntezę Trp w kulturach ET i EA. Stwierdziliśmy, że różne geny szlaku biosyntezy Trp wykazywały szybki i przejściowy wzrost ekspresji we wczesnym etapie SE. W kulturze ET zwiększoną ekspresję wykazało dwanaście genów biosyntezy Trp, m.in.: *ASA1*, *ASA2*, *ASA putative*, *ASB1*, *ASB2*, *IGPS*, *IGPS putative*, *PA11*, *PA13*, *PAT1*, *TSA1*. Trzy z nich (*ASA1*, *ASA putative*, *PA13*) wykazały również wzrost ekspresji w reakcji na auksynę. Geny *TAA1*, *TAR1-2*

oraz *YUC1-11* odgrywające kluczową rolę w szlaku biosyntezy IAA, wykazywały znaczną deregulację ekspresji podczas SE. Ekspresja genu *TAA1* była istotnie podwyższona (FC 5.6 w kulturze ET i FC 2.1 w kulturze EA). Analiza ekspresji genów *YUC1-11* wskazała, że potencjalnie różne monooksygenazy YUC mogą kontrolować produkcję IAA w SE indukowanej przez TSA i 2,4-D. **W kulturze ET zwiększoną ekspresję wykazywały *YUC4* i *YUC10*. Z kolei w kulturze EA podwyższoną ekspresję wykazywały *YUC3*, *YUC7*, *YUC8* i *YUC9*.** W zgodzie z podwyższoną ekspresją genów biosyntezy Trp i IAA, **udokumentowaliśmy zwiększoną zawartość tryptofanu oraz IAA w kulturach embriogenicznych ET i EA** względem kontroli E0. We wczesnym etapie SE zarówno TSA, jak i auksyna powodowały 1.5-krotny wzrost poziomu Trp. W zaawansowanym etapie SE podwyższona zawartość Trp była charakterystyczna wyłącznie dla kultury EA. Ponadto zaobserwowano znaczny wzrost (5–6-krotny) poziomu IAA w zaawansowanej kulturze (10 dzień kultury) na pożywkach ET i EA.

Wyniki wskazują, że biosynteza IAA z tryptofanu podczas indukcji SE przebiega z udziałem dwóch alternatywnych ścieżek, w tym poprzez dobrze udokumentowany szlak IPyA oraz słabo scharakteryzowaną drogę z udziałem NITRYLAZ (tzw. szlak IAN). Na udział NIT-zależnej biosyntezy IAA wskazuje intensywna ekspresja genów *NIT* podczas SE oraz istotnie zaburzona zdolność do indukcji SE mutantów *nit1-4*. Analiza RNA-seq wykazała, że *NIT1*, *NIT2*, *NIT4* ulegały podwyższonej ekspresji (1.5–3.6-krotnie) w kulturze ET w porównaniu z kulturą kontrolną E0. W kulturze EA geny *NIT1* i *NIT2* wykazywały obniżoną ekspresję (Fig. 3A). Wszystkie geny *NIT* ulegały podwyższonej ekspresji po traktowaniu TSA, w przeciwieństwie do 2,4-D (Fig. 3B). Aby potwierdzić udział *NIT1-4* w indukcji embriogenicznej, oceniono potencjał embriogeniczny mutantów *nit1-4*. Mutanty *nit1-4* wykazywały zaburzoną odpowiedź embriogeniczną w kulturze EA, natomiast *nit1* i *nit3* również w kulturze ET (Fig. 3 C-H). Analiza ekspresji genów *NIT1-4* w eksplantatach mutantów niezdolnego do regeneracji zarodków somatycznych tj. *lec1*, wykazała silne obniżenie ekspresji *NIT1*, *NIT2* i *NIT4*, co sugeruje, że TF LEC1 może pozytywnie wpływać na ekspresję genów *NIT* podczas indukcji SE. Dodatkowo analizy promotorów genów *NIT1-4* wskazały obecność m.in. elementu *cis*-regulatorowego rozpoznawanego przez kluczowy dla SE czynnik transkrypcyjny *LEC1*. Zatem, **wykazaliśmy, że obok szlaku IPyA biosyntezy auksyny, także szlak IAN jest zaangażowany w proces tranzycji embriogenicznej. Udowodniliśmy, że zaburzona aktywność enzymów NIT wpływa negatywnie na proces SE.**

Większość genów kodujących główne elementy szlaku sygnalizacji auksynowej, w tym *AUX/IAA* i *ARF*, była znacząco deregulowana w eksplantatach podczas indukcji SE. Spośród

29 genów *AUX/IAA*, 8 wykazywało podwyższoną ekspresję po traktowaniu TSA, a 19 po traktowaniu 2,4-D. W obu kulturach (ET i EA) podwyższoną ekspresję (1.6–43.4-krotną) wykazywały m.in. *IAA1*, *IAA20*, *IAA29*, *IAA30* i *IAA33*. Podobnie, większość z 23 genów *ARF* wykazywała deregulację podczas procesu SE. Ekspresja dziewięciu genów - *ARF3-6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF17-19* była istotnie podwyższona (1.2–15.2-krotnie) w odpowiedzi na oba czynniki indukujące SE. Większość genów *ARF* wykazywała podobną odpowiedź w ET i EA, natomiast *ARF11* wykazywał przeciwstawne kierunki ekspresji: była podwyższona w kulturze ET, a obniżona w EA. Podobnie jak *AUX/IAA*, większość genów *ARF* wykazywała wyższą ekspresję w kulturze EA, z wyjątkiem *ARF4*, *ARF11* i *ARF18*, które ulegały wyższej ekspresji w eksplantatach traktowanych TSA niż 2,4-D. Analiza genów związanych z transportem auksyny wykazała deregulację wielu genów kodujących białka wpływu i wypływu IAA, w tym *PIN* oraz *AUX/LAX*, w kulturach indukowanych TSA i 2,4-D. Podczas procesu SE niezależnie od użytego czynnika indukującego podwyższoną ekspresję wykazywały *PIN1*, *PIN3*, *PIN6*, a także *LAX1* i *LAX2*, natomiast *PIN2*, *PIN5* oraz *LAX3* cechowały się obniżoną ekspresją w kulturach ET i EA.

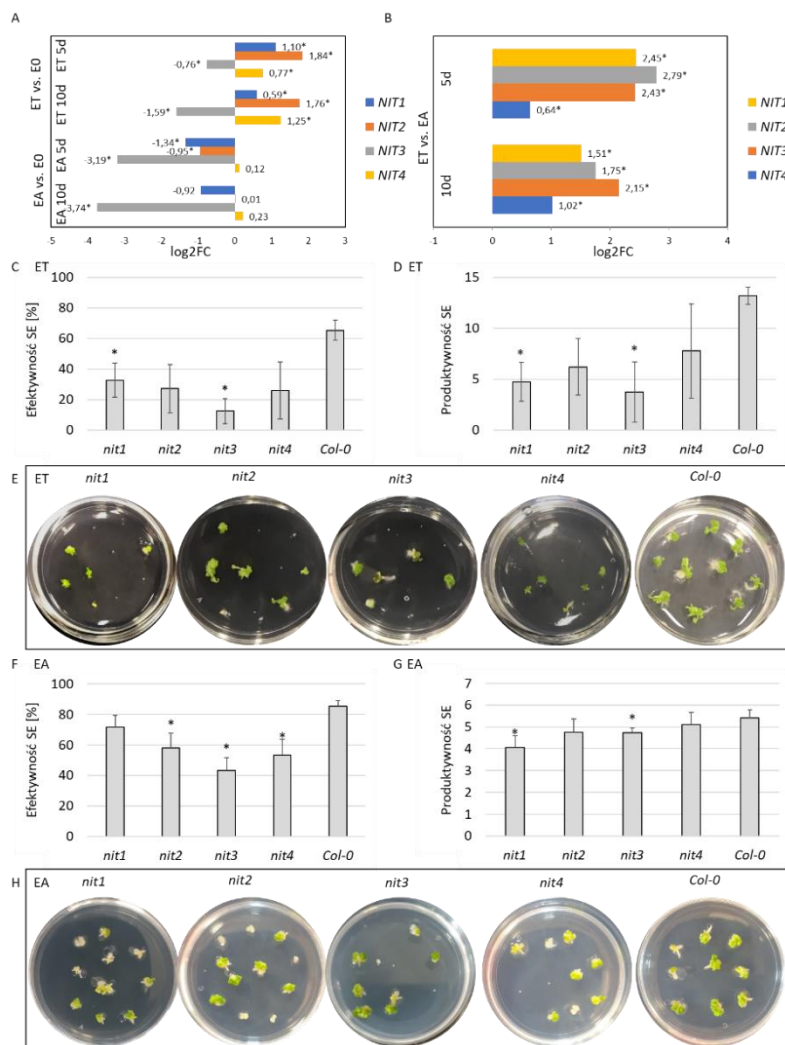


Figura 3. Ekspresja genów *NIT1-4* podczas tranzycji embriogenicznej (5 i 10 dzień kultury *in vitro*) na pożywkach EA i ET oraz w kulturze kontrolnej E0. Przedstawiono względny poziom ekspresji ( $\log_2FC$ ) w porównaniach ET vs. E0, EA vs. E0 (A) oraz ET vs. EA (B). Zaburzona odpowiedź embriogeniczna mutantów *nit* (*nit1-4*) (C-H). Analiza efektywności (C, F) oraz produktywności (D, G) procesu SE w kulturach eksplantatów mutantów *nit* i formy kontrolnej Col-0 podczas kultury na pożywkach ET (C, D, E) oraz EA (F, G, H). Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej (\*), (\*  $p < 0,05$ ).

Obserwacje histologiczne badanego procesu SE u *Arabidopsis thaliana* wskazują, że komórki protodermalne i subprotodermalne adaksjalnej strony liścieni zarodków zygocyticznych są zaangażowane w odpowiedź embriogeniczną. Zgodnie z tą wiedzą wskazaliśmy, że orientacja liścieni na pożywce indukcyjnej SE istotnie wpływała na odpowiedź SE. Liścienie ze stroną adaksjalną skierowaną do góry na pożywkach ET i EA wykazują znacznie wyższą odpowiedź embriogeniczną w porównaniu z eksplantatami zorientowanymi przeciwnie, tj. stroną adaksjalną w dół. Wyniki te dostarczają dowodów na rolę polarności organów w mechanizmie kontrolującym indukcję SE. **Zidentyfikowaliśmy siedem genów kodujących TF o znacząco podwyższonej (od 1.5 do 51.3 FC) ekspresji podczas indukcji embriogenicznej zależnej od TSA i związanych z polarnością tj. *RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1 (RGE1)*, *ULTRAPETALA 2 (ULT2)*, *HOMEBOX PROTEIN 32 (HB32)*, *C-REPEAT BINDING FACTOR 1 (CBF1)*, *AINTEGUMENTA-LIKE 7/PLETHORA 7 (AIL7/PLT7)*, *LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN18, 41 (LBD18, LBD41)*.** Cztery geny, w tym *RGE1*, *ULT2*, *HB32* i *CBF1*, cechowały się wyższą, (od 2.3-krotnej dla *HB32* do 107-krotnej dla *RGE1*), ekspresją na pożywce ET niż EA. Dwa z nich, *HB32* i *ULT2*, wykazywały przeciwstawne profile ekspresji w eksplantatach indukowanych TSA vs. 2,4-D, czyli wzrost/spadek ekspresji. W dalszej kolejności dokonaliśmy analizy funkcjonalnej wytypowanych genów kandydackich i oceniliśmy odpowiedź embriogeniczną mutantów w genach kodujących TF kontrolujących polarność organów. Większość mutantów (5/7), w tym *rgel*, *lbd41*, *ail7*, *lbd18*, *hb32*, przejawiała istotnie obniżoną efektywność i/lub produktywność procesu SE indukowanego obecnością TSA (Fig. 4A-B, E). Trzy mutanty, tj.: *rgel*, *lbd41* i *cbf1*, wykazywały także obniżoną efektywność i/lub produktywność SE także w kulturze prowadzonej na pożywce auksynowej (EA) (Fig. 4C-D, E). W przeciwieństwie do większości mutantów związanych z polarnością organów, mutant *ult2* cechował się poprawioną odpowiedzią embriogeniczną na pożywce ET, co sugeruje negatywną rolę genu *ULT2* w TSA-zależnym procesie SE. Podsumowując, **zmiany w ekspresji analizowanych genów wraz z upośledzoną odpowiedzią embriogeniczną badanych mutantów dostarczają dowodów na rolę TF kontrolujących polaryzację organów, w tym RGE1, LBD18, 41, AIL7, CBF1 i ULT2 w indukcji SE.**

Zidentyfikowano również geny wykazujące zróżnicowaną ekspresję pomiędzy kulturami ET i EA, określone jako DEG-ET/EA. Uzyskane wyniki wykazały, że 59% (8 058/11 944) DEG-ET/EA charakteryzowało się różnym poziomem ekspresji tylko w jednym z analizowanych punktów czasowych (5 lub 10 dniu kultury), natomiast jedna trzecia genów DEG (3 886/11 944) wykazywała zróżnicowaną ekspresję na obu etapach SE. Co istotne,

większość genów, 54,7% (6 536/11 944), przejawiała wyższy poziom ekspresji w kulturze ET względem EA. Analiza ontologii (GO) genów o podwyższonej ekspresji w grupie DEG-ET/EA ujawniła liczną grupę genów związanych z odpowiedzią na bodźce (1 857/6 536) oraz reakcjami stresowymi (1 170/6 536). Natomiast analiza GO genów o obniżonej ekspresji wskazała na częstą reprezentację genów związanych z regulacją procesów biologicznych (1 250), rozwojem (674) oraz regulacją poziomu hormonów (90).

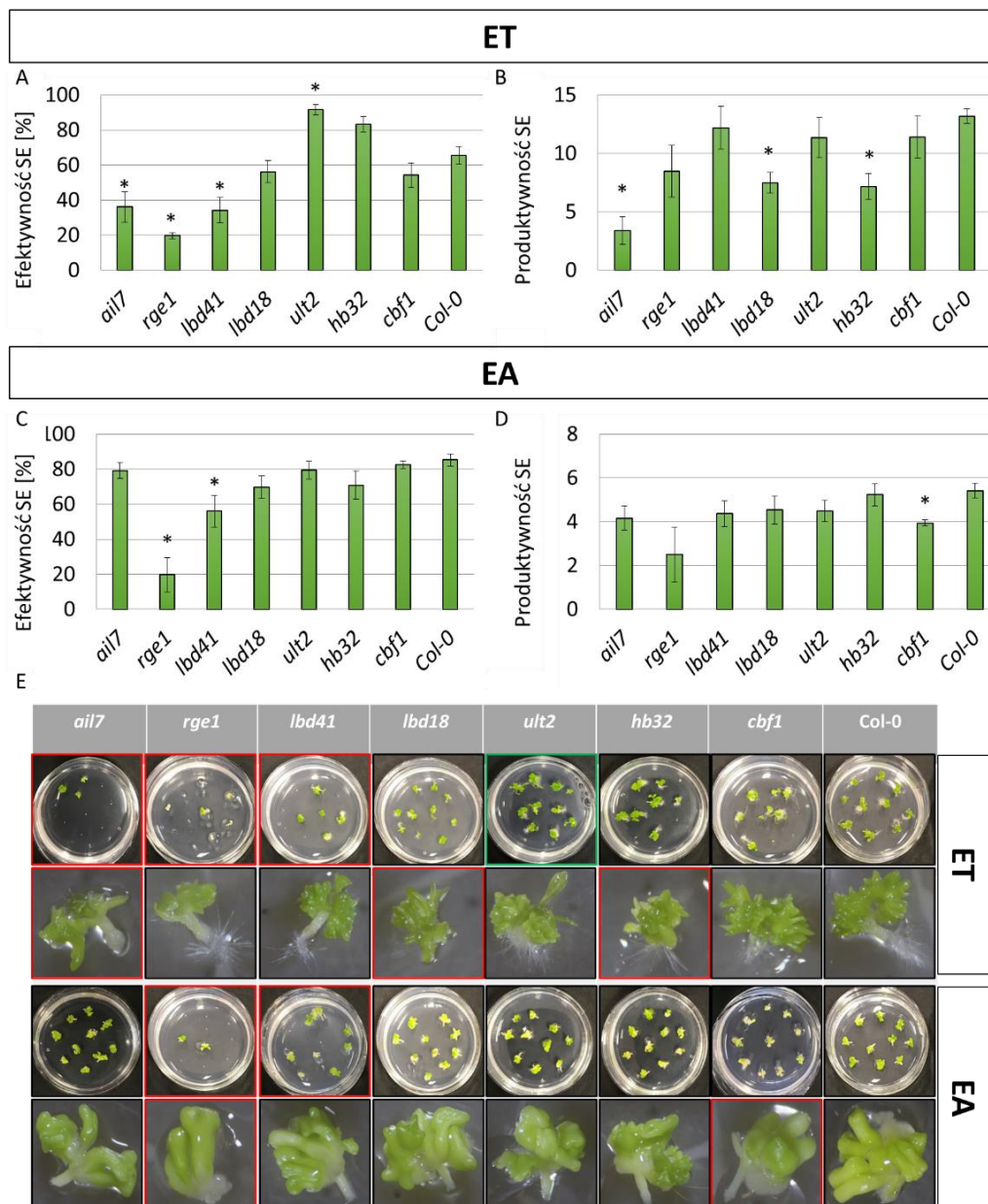


Figura 4. Reakcja embriogeniczna mutantów (*ail7*, *rge1*, *lbd41*, *lbd18*, *ult2*, *hb32*, *cbf1*) w genach związanych z polarnością eksplantatów. Efektywność (A, C) i produktywność procesu SE (B, D) mutantów oraz ekotypu kontrolnego WT (Col-0). Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej Col-0 (\*), (\* $p < 0,05$ ).

Szczegółowa analiza genów o podwyższonej ekspresji ujawniła dużą liczbę (758) genów związanych ze stresem, które były silnie akumulowane we wczesnym etapie SE (5 dzień) indukowanej przez TSA, podobnie w kulturze EA, choć w mniejszym stopniu. Liczba (264)

DEG związanych ze stresem, których ekspresja wzrastała we wczesnej odpowiedzi na działanie auksyny (5 dzień kultury EA), była niemal trzykrotnie niższa niż w analogicznym etapie kultury indukowanej TSA (5 dzień kultury ET). Wyniki te wskazują, że **działanie TSA może prowadzić do specyficznej aktywacji genów związanych ze stresem**. Zgodnie z tym założeniem, analiza GO genów o podwyższonej ekspresji w kulturze ET wykazała liczną reprezentację genów (462) zaangażowanych w odpowiedź na stres (genów związanych z systemową odpornością oraz reakcjami na stresy biotyczne i abiotyczne, w tym zimno, hipoksję, stres osmotyczny i oksydacyjny). Analiza genów DEG związanych ze stresem w kulturach SE ujawniła geny kodujące kluczowe enzymy metabolizmu hormonów stresowych, w tym kwasu salicylowego, kwasu abscysynowego oraz kwasu jasmonowego. Zgodnie z wynikami RNA-seq **wykazaliśmy istotne różnice w poziomach SA, ABA i JA pomiędzy kulturami embriogenicznymi, a nieembriogenicznymi (ET vs. E0, EA vs. E0) oraz pomiędzy kulturami embriogenicznymi (ET vs. EA)**. Stwierdzono bardzo wysoki poziom akumulacji dwóch hormonów stresowych — SA i ABA (odpowiednio 68- i 179-krotny wzrost) — w eksplantatach traktowanych TSA przez pięć dni. W przeciwieństwie JA wykazywał wyraźnie obniżoną akumulację w kulturach embriogenicznych (ET i EA) w porównaniu z kontrolą E0. Wśród genów DEG, które mogły przyczynić się do wysokiej akumulacji SA w eksplantatach indukowanych TSA, zidentyfikowaliśmy gen *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICSI)*, pełniący kluczową rolę w biosyntezie SA, którego ekspresja była istotnie zwiększona (11.5-krotnie) we wczesnym stadium procesu SE (5 dzień) indukowanego TSA. Poza biosyntezą *de novo*, zwiększona zawartość SA może wynikać z ograniczonej konwersji SA do jego nieaktywnych pochodnych. Zgodnie z takim scenariuszem, ekspresja genów zaangażowanych w przekształcanie SA do salicylanu metylu (MeSA) — w tym *METHYL ESTERASEs (MES1, 2, 7, 9)*, była istotnie obniżona w kulturze ET. Zgodnie z podwyższoną akumulacją ABA po zastosowaniu TSA, ekspresja genu *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 6 (NCED6)*, uczestniczącego w biosyntezie ABA, była silnie zwiększona (64-krotnie) w ET vs. E0. Ponadto, ekspresja genu *BETA GLUCOSIDASE 1 (BG1)*, kodującego esterazę uwalniającą aktywne ABA z jej glukozydowych form magazynujących, była wyraźnie podwyższona (6.2-krotnie) w ET. Dodatkowo, obniżona ekspresja genu *CYP707A4*, zaangażowanego w katabolizm ABA, może również przyczynić się do zwiększonej akumulacji ABA w kulturze ET. Dane transkryptomocne sugerują zatem, że akumulacja ABA w eksplantatach traktowanych TSA może wynikać zarówno ze zwiększonej biosyntezy *de novo*, wzmożonego uwalniania aktywnej formy hormonu, jak i obniżonego katabolizmu. Analiza genów DEG wykazała również obecność genów

uczestniczących w biosyntezie i katabolizmie JA w kulturach SE. Większość genów związanych z biosyntezą JA miała obniżoną ekspresję w kulturach embriogenicznych, co może wyjaśniać obniżenie poziomu JA w procesie SE. Do genów o istotnie zmniejszonej ekspresji należały: *LIPOXYGENASE 2 (LOX2)*, *ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS)*, *ALLENE OXIDE CYCLASE1-3 (AOC1, 2, 3)*, *OXOPHYTODIENOATE-REDUCTASE 3 (OPR3)*, *SULFOTRANSFERASE 2A (AtST2a)* oraz *ACYL-COA OXIDASE 2 (ACX2)*. Zgodnie z wyższą zawartością JA w ET niż EA, poziomy ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę JA (*LOX2, AOS, AOC1, 3, OPC-8:0 CoA LIGASE 1; OPLC1*) były podwyższone, natomiast genów uczestniczących w katabolizmie JA (*JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE; JMT, AtST2a*), niższe w ET niż EA. **Wskazaliśmy, że obok auksyny także hormony stresowe, w tym kwas salicylowy, abscysynowy i jasmonowy odgrywają istotną rolę w mechanizmie indukcji SE. Zaobserwowano bowiem w TSA-indukowanej kulturze embriogenicznej podwyższone poziomy SA oraz ABA, a wyniki te są zgodne z hipotezą o podobieństwie, na poziomie molekularnym, indukowanej *in vitro* tranzycji embriogenicznej komórek do odpowiedzi komórek na stres.**

Szczególnie intensywna regulacja ekspresji genów w odpowiedzi na TSA sugeruje udział acetylacji histonów w regulacji ich transkrypcji w komórkach poddanych tranzycji embriogenicznej. Badania transkryptomyczne doprowadziły nas do zidentyfikowania licznych genów mogących mieć fundamentalne znaczenie w regulacji plastyczności rozwojowej u roślin. Uzyskane, nowatorskie wyniki stanowią istotny wkład w budowaniu molekularnej sieci genetycznej i epigenetycznej czynników regulujących indukcję SE, a w szerszym aspekcie, reprogramowanie komórek somatycznych.

### **Translacja wiedzy z rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* do rośliny uprawnej *Hordeum vulgare* – poprawienie zdolności regeneracyjnych jęczmienia pod wpływem trichostatyny A.**

Przeprowadziliśmy ocenę przydatności inhibitora deacetylaz histonowych – TSA, do poprawy zdolności regeneracyjnych pięciu genotypów jęczmienia (Nowak i in., 2024, H4, P5). Do analiz wybraliśmy odmiany znacząco różniące się potencjałem regeneracyjnym, w tym wysoce regenerującą odmianę Golden Promise i niskowydajne odmiany tj. Dema, Morex, Krona i Scarlett. W badaniach zastosowaliśmy dwuetapowy protokół regeneracji [42], w którym jako eksplantaty wykorzystano tarczki niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz pożywkę CIM<sub>3</sub> indukującą kalus (4 tygodnie), a następnie pożywkę regenerującą K4NB (6 tygodni). Po 10 tygodniach kultury ocenialiśmy efektywność i produktywność procesu

regeneracji. Tkanka kalusowa pojawiała się z eksplantatów wszystkich genotypów jęczmienia w 7. dniu kultury na pożywce CIM. Biało-żółtawa tkanka kalusowa powstawała wzdłuż brzegów tarczki, w miejscu usuniętej osi zarodkowej. W ciągu kolejnych 3 tygodni na CIM produkcja kalusa zwiększała się, a tkanka miała tendencję do oddzielania się w liczne, małe skupiska. Podsumowując, czas indukcji, dynamika wzrostu oraz morfologia kalusa wydawały się podobne we wszystkich analizowanych genotypach jęczmienia. W przypadku Golden Promise, w 35. dniu kultury *in vitro* zaobserwowano pierwsze struktury, pędy oraz zarodki somatyczne, co potwierdziliśmy analizami histologicznymi. W kolejnych dniach, (42. dzień kultury), eksplantaty Golden Promise formowały już liczne regeneranty. W przeciwieństwie do Golden Promise, inne genotypy wykazywały opóźniony czas regeneracji pędów/zarodków somatycznych – kalusy odmian Morex, Scarlett, Krona i Dema wytwarzały pierwsze regeneranty co najmniej tydzień później niż Golden Promise. Potencjał regeneracyjny roślin analizowaliśmy w 8-tygodniowych kulturach. Wszystkie genotypy były bardzo efektywne w tworzeniu kalusa – 100% eksplantatów rozwinęło tkankę kalusową. Kalusy różnych genotypów na pożywce regenerującej K4NB wykazały już znacząco zróżnicowaną zdolność do produkcji pędów/zarodków somatycznych, ocenianą na podstawie procentu eksplantatów wytwarzających co najmniej jednego regeneranta (efektywność regeneracji) oraz średniej liczby regenerantów powstających na jeden eksplantat (produktywność regeneracji). Wyniki wskazują, że najwyższym potencjałem regeneracyjnym cechowały się kultury Golden Promise – 65% eksplantatów formowało regeneranty, osiągając średnią produktywność niemal 2.0 pędów na eksplantat. Eksplantaty pozostałych genotypów formowały regeneranty z ponad 3–5 razy niższą wydajnością, mieszczącą się w zakresie od 12% (Scarlett) do 18% (Morex). Genotypy te wykazywały również niższą produktywność regeneracji w porównaniu z Golden Promise – ich eksplantaty wytwarzały średnio 0.6–1.3 pędów na eksplantat. **Podsumowując wytypowane do analiz odmiany jęczmienia (Dema, Scarlett, Morex, Krona) charakteryzują się niskim, ponad 4-krotnie niższym potencjałem regeneracyjnym od Golden Promise.**

Do określenia wpływu TSA na zdolności regeneracyjne jęczmienia wybraliśmy różne koncentracje tego inhibitora (1.0; 2.5; 5.0; 7.5  $\mu\text{M}$ ) oraz różne czasy traktowania eksplantatów podczas indukcji tkanki kalusowej (1, 2, 4 tygodnie). **Dowiedliśmy, że traktowanie TSA istotnie zwiększyło skuteczność regeneracji roślin (zarówno efektywność, jak i produktywność) w dwóch z pięciu analizowanych genotypów jęczmienia. Odpowiednio, traktowanie TSA w stężeniu 7.5  $\mu\text{M}$  eksplantatów odmian Scarlett i Krona zwiększyło dwukrotnie efektywność i produktywność regeneracji.** Co ciekawe, traktowanie

eksplantatów 7.5  $\mu\text{M}$  TSA przez 1, 2 i 4 tygodnie dawało podobny efekt w zakresie regeneracji roślin. W przeciwieństwie do odmian Krona i Scarlett, traktowanie TSA nie wpłynęło na badane parametry kultury u odmian Dema i Morex. Z kolei czterotygodniowe traktowanie eksplantatów odmiany Golden Promise najwyższym stężeniem TSA negatywnie wpłynęło na efektywność regeneracji. **Wykazaliśmy, że TSA może być wykorzystany do poprawy zdolności regeneracyjnych u słabo-regenerujących odmian jęczmienia, jednak efekt zależy od genotypu (Fig. 5).**

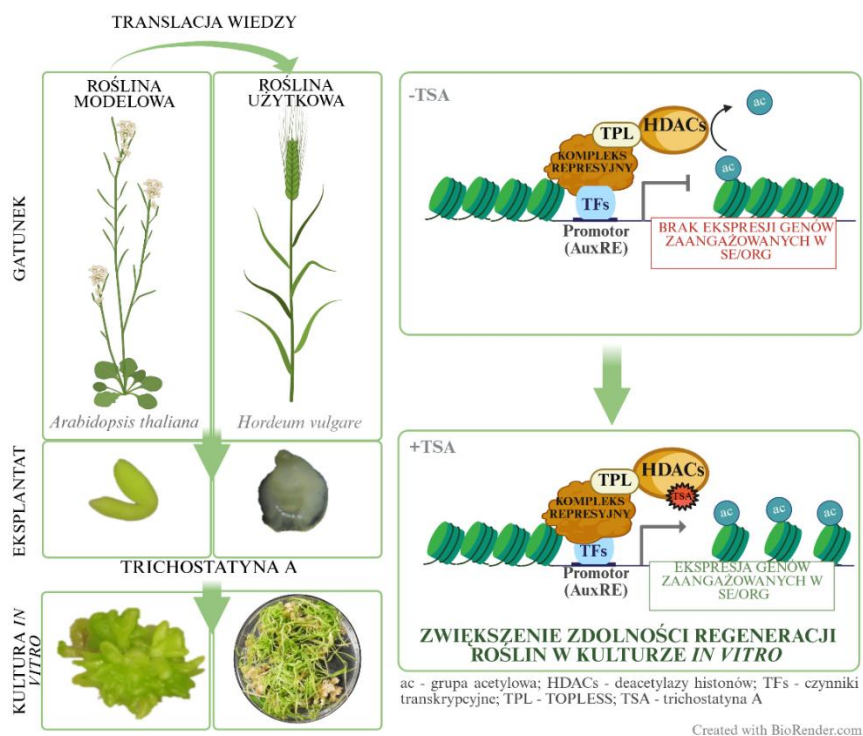


Figura 5. Translacja wiedzy z rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* do rośliny uprawnej *Hordeum vulgare* - poprawienie zdolności regeneracyjnych jęczmienia pod wpływem traktowania eksplantatów trichostatyną A.

### Auksyna – jako induktor procesu tranzycji embriogenicznej.

Pierwsze doniesienia o auksynie pochodzą z roku 1880, kiedy to Charles i Francis Darwin postawili hipotezę o istnieniu substancji kontrolującej proces fototropizmu, a w roku 1926 Fritz Went wyizolowali związek chemiczny wpływający na wzrost wydłużeniowy siewek *Avena sativa* pozbawionych SAM. Kilka lat później, Fritz Kögl zidentyfikował i otrzymał w postaci krystalicznej substancję, ustalając, że jest to auksyna, IAA [43]. Pierwsze doniesienia o potencjalnym wpływie auksyny na regulację transkrypcji wielu genów pojawiły się w latach osiemdziesiątych, lecz dopiero rozwój technik molekularnych ostatnich lat oraz możliwość wykorzystania roślin modelowych, doprowadziły do identyfikacji szeregu genów zaangażowanych w metabolizm, percepcję, sygnalizację i transport auksyny, jak i genów o auksyno-zależnej ekspresji [44]. Od czasu odkrycia auksyny badania wskazują, że kontroluje

ona niemal każdy aspekt rozwoju roślin *in vivo* i *in vitro*, dlatego odkrywanie, w jaki sposób reguluje ekspresję genów, jest kluczowe dla dalszego postępu biotechnologii i genetyki translacyjnej. Nie jest zaskoczeniem, że analiza Shiua i Lehti-Shiua (2023) [45] dotycząca najczęściej poruszanych przez naukowców zagadnień wskazuje, iż badania molekularne ukierunkowane na zrozumienie funkcji auksyny były i nadal będą głównym przedmiotem zainteresowania świata nauki. Obecnie tematyka związana z auksyną zajmuje pierwsze miejsce w badaniach nad *Arabidopsis thaliana*.

Auksyny możemy podzielić na naturalne, endogennie występujące w komórkach roślinnych i przez nią syntetyzowane oraz syntetyczne, nie występujące w komórkach. Najlepiej poznaną, naturalną auksyną, jest IAA, lecz zidentyfikowano również inne substancje, takie jak kwas indolilo-3-masłowy (IBA), kwas fenylooctowy (PAA) oraz kwas 5-chloro-indolilo-3-octowy (4-Cl-IAA), które są syntetyzowane w komórkach roślinnych. Zostały one zakwalifikowane do auksyn, ze względu na podobieństwo ich budowy do IAA, jednakże ich rola i mechanizm działania nie jest dobrze poznany [43]. Scharakteryzowano wiele syntetycznych substancji posiadających aktywność auksyny, a najczęściej stosowanymi są: 2,4-D, NAA, kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoesowy (dicamba) oraz kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy (picloram, tordon). Mechanizm działania syntetycznych auksyn jest podobny, do mechanizmu działania IAA, wykazują one zróżnicowane i najczęściej mniejsze powinowactwo do receptorów auksyny oraz zaburzenia w wewnątrzkomórkowym transporcie [46, 47], jednakże precyzyjny mechanizm działania naturalnych, jak i syntetycznych auksyn, poza IAA, jest wciąż bardzo słabo poznany.

Co wspólnego ma auksyna z procesem somatycznej embriogenezy? Do tej pory opracowano wiele protokołów umożliwiających indukcję SE u różnych gatunków roślin. Choć warunki hodowli *in vitro* stosowane do indukcji SE różnią się pomiędzy gatunkami, traktowanie eksplantatów auksyną lub substancjami o działaniu auksynowym wydaje się powszechnym wymogiem dla uzyskania indukcji SE. Najskuteczniejszym i najczęściej stosowanym induktorem SE (w 78% protokołów) jest 2,4-D (**Wójcik i in., 2020, H5, P9**). Dodatkowym potwierdzeniem kluczowej roli auksyny w indukcji embriogenicznej są analizy globalnych transkryptomów SE, które wykazały, że liczne geny związane z auksyną (jej syntezą i katabolizmem, transportem, sygnalizacją) ulegają transkrypcji w kulturach embriogenicznych różnych gatunków, w tym *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Cinnamomum camphora*, *Quercus suber*, *Lilium oriental* × *trumpet*, *Garcinia mangostana*, *Oryza sativa*, *Coffea canephora*, *Zea mays*, *Dimocarpus longan* (**Wójcik i in., 2020, H5, P9**) *Picea* sp. [48, 49], *Solanum tuberosum* [50], *Camellia sinensis* [51], *Hevea brasiliensis* [52],

*Ormosia henryi* [53] i wielu innych. Zaobserwowano, że eksplantaty o wysokim potencjale embriogenicznym różnych gatunków roślin zawierają zwykle wyższe poziomy auksyny IAA, niż eksplantaty nieembriogeniczne, co sugeruje pozytywną zależność między zawartością auksyny, a zdolnością tkanki do indukcji SE [54, 55]. Dynamiczny wzrost endogennej zawartości auksyny w odpowiedzi na indukcję SE może być kluczowy dla przeprogramowania embriogenicznego [56]. Zjawisko to potwierdza akumulację IAA towarzyszącą indukcji SE u *Arabidopsis in vitro* i *in planta* (Wójcikowska i in., 2013, P17; Wójcikowska i Gaj, 2015, P16; [57]).

Jak wspomniano wcześniej proces SE u *Arabidopsis thaliana* oraz w większości opracowanych protokołów jest indukowany z wykorzystaniem syntetycznej auksyny 2,4-D [58], jednakże mechanizm jego działania po dziś dzień nie został w pełni poznany. Istnieją cztery hipotezy wyjaśniające sposób działania tego roślinnego regulatora wzrostu, a pierwsza z nich zakłada że 2,4-D działa jak naturalna auksyna, wiążąc się do receptorów auksyny TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1), AUXIN SIGNALING F-BOX 1-5 (AFB1-5) oraz AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1) i wywołując analogiczną odpowiedź komórki jak naturalnie występujące auksyny [59-61]. Uważa się, że transport 2,4-D przez białka wypływu auksyny PIN jest nieefektywny i wolny, co prowadzi do nagromadzenia 2,4-D w komórce [62], chociaż najnowsze badania wskazują, że 2,4-D ma możliwość wiązania się z białkiem PIN-FORMED 8 (PIN8), który nie jest zlokalizowany w błonie komórkowej, a głównie w retikulum endoplazmatycznym [63]. Alternatywna hipoteza mówi o tym, że egzogennie dostarczony 2,4-D wpływa na ekspresję genów biosyntezy endogennej auksyny – wpływając na ilość endogennej IAA [64, 65] i w wyniku podwyższenia jego poziomu dochodzi do nabycia kompetencji przez komórki somatyczne i indukcji procesu SE [66], jednak podwyższenie poziomu auksyny jest nieznaczne i ilość dowodów na to wskazująca niewystarczająca. Z perspektywy lat oraz licznych przeprowadzonych analiz uważam, że 2,4-D, wręcz przeciwnie, powoduje wyzerowanie poziomu IAA w pierwszych godzinach po traktowaniu, co jest swoistym przeprogramowaniem traktowanej komórki roślinnej. W kolejnych dniach obserwowany jest stopniowy wzrost zawartości IAA (Nowak, niepublikowane). Następną teorią głosi, że 2,4-D zmienia metylację DNA co wpływa na ekspresję genów także tych zaangażowanych w proces SE i nabycie kompetencji do tranzycji embriogenicznej. Pierwsze doniesienia wskazujące na zależność metylacji DNA od obecności auksyny, pochodzą z 1989 roku, kiedy to LoSchiavo i współpracownicy udokumentowali wzrost poziomu metylacji DNA pod wpływem traktowania auksyną u *Daucus carota* [67]. Korelację między auksyną, a poziomem metylacji DNA potwierdzono analizując

wygenerowaną po mutagenezie chemicznej linię E9 *Daucus carota* cechującą się stałym i wyższym poziomem metylacji DNA, w stosunku do formy dzikiej. W linii tej stwierdzono także podwyższony poziom endogennego IAA, a rośliny prezentowały nieprawidłowy rozwój, formując tkankę kalusową. Kolejne doniesienia potwierdziły, że w trakcie auksyno-zależnej indukcji procesu SE, następuje wzrost metylacji DNA również u takich gatunków jak *Acca sellowiana* [68], *Cucurbita pepo* [69], czy *Coffea canephora* [70]. Zastosowanie inhibitora metylacji DNA 5-azacytydyny (5-AzaC) skutkuje zahamowaniem procesu SE u takich gatunków jak *Coffea canephora* [70] oraz *Arabidopsis thaliana* (Grzybkowska i in., 2018, P12), co bezspornie potwierdza kluczową rolę metylacji DNA w procesie indukcji SE [71]. Geny kodujące enzymy przeprowadzające proces metylacji DNA wykazują zróżnicowaną ekspresję podczas procesu SE, a spadek metylacji DNA obserwowany u mutantów w tych genach skutkuje nieprawidłową budową zarodków zygocycznych oraz zahamowanym procesem SE (Grzybkowska i in., 2018, P12; [72]). Prawidłowy poziom metylacji jest zatem niezbędny do zajścia procesów embriogenicznych *in vivo* oraz *in vitro*. Ostatnia hipoteza głosi, że 2,4-D będący herbicydem działa jako czynnik stresowy [73, 74]. Traktowanie tkanek 2,4-D skutkuje bowiem powstaniem reaktywnych form tlenu (Reactive Oxygen Species; ROS) indukujących stres oksydacyjny. Potwierdzeniem tej teorii jest także fakt, że podczas kultury eksplantatów na pożywce z 2,4-D, aktywowane są geny specyficzne dla stresu abiotycznego oraz biotycznego, jak i same ROS (Wójcikowska i in., 2018, H2, P10; [75]).

### **Identyfikacja czynników transkrypcyjnych AUXIN RESPONSE FACTOR zaangażowanych w proces somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*.**

W komórkach roślinnych, w których auksyna ulega akumulacji dochodzi do zmian ekspresji genów głównie w wyniku aktywacji kanonicznego, jądrowego szlaku sygnalizacyjnego auksyny. Ogólny, mechanizm regulacji ekspresji genów indukowany przez auksynę został poznany, jednak wciąż odkrywane są jego nowe elementy składowe. W jądrze komórkowym auksyna wiąże się z białkami F-box TIR1, AFB1-5, będącymi składnikami kompleksu ligazy ubikwitynowej: Skp1–Cullin–F-box (SCF<sup>TIR/AFBs</sup>), a także z koreceptorami Aux/IAA. Wiązanie auksyny z TIR1/AFBs i białkami Aux/IAA stymuluje zależną od TIR1/AFB1-5 produkcję cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP), generując cAMP z ATP w bliskim sąsiedztwie białek AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF). W związku z tym, że białka Aux/IAA działają jako represory czynników transkrypcyjnych ARF, ich odłączenie, znosi represję wstępnie utworzonych kompleksów transkrypcyjnych i prowadzi do regulacji transkrypcji z udziałem białek ARF przy obecności cAMP. Ubikwitynacja białek

Aux/IAA przez kompleks SCF<sup>TIR/AFBs</sup> i ich degradacja w proteasomie prowadzi do zahamowania syntezy cAMP, co skutkuje zahamowaniem ekspresji genów odpowiedzi na auksynę przez nieznaną jeszcze mechanizm. Przy braku auksyny białka Aux/IAA oddziałują z białkami ARF i korepresorami transkrypcyjnymi TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR), rekrutują także deacetylazy histonów, co prowadzi do zahamowania ekspresji genów odpowiedzi auksyny, wskutek kondensacji chromatyny [44, 76].

Geny *ARF* są charakterystyczne wyłącznie dla królestwa roślin i zostały zidentyfikowane w genomach różnych gatunków, w tym paproci, nagonasiennych, jednoliściennych i dwuliściennych [77]. W genomie *Arabidopsis thaliana* znajdują się 23 geny *ARF*, z których wszystkie – z wyjątkiem jednego pseudogenu (*ARF23*) – kodują czynniki transkrypcyjne zaangażowane regulację ekspresji genów w odpowiedzi na auksynę. Białka ARF zawierają domenę wiążącą DNA (DBD), klasyfikowaną jako typu B3 i specyficzną dla roślin, która rozpoznaje motyw AuxRE (TGTCNN) występujący w promotorach genów odpowiedzi na auksynę [78]. W obrębie DBD zlokalizowana jest domena dimeryzacji (DD) [79]. Czynniki transkrypcyjne ARF mogą aktywować lub hamować ekspresję genów docelowych w zależności od sekwencji aminokwasowej środkowej domeny funkcjonalnej - MR. Białka ARF z domeną MR bogatą w glutaminę, serynę i leucynę (MP/ARF5-ARF8 i ARF19) działają jako aktywatory transkrypcji, są najlepiej scharakteryzowane i należą do klasy A białek ARF. Zwiększona zawartość seryny, proliny, leucyny i glicyny w domenie MR (ARF1-ARF4, ARF9, ARF11-ARF15, ARF18, ARF20-22) skutkuje represją transkrypcji genów docelowych, a białka te należą do klasy B. Wyróżniono jeszcze klasę C białek ARF, do której należą ARF10, ARF16 i ARF17 [80-82]. Dodatkowo, ARF zawierają domenę PB1 (Phox and Bem1), która jest niezbędna do interakcji z innymi białkami ARF oraz Aux/IAA [83].

Celem prowadzonych przez nas badań było zidentyfikowanie czynników transkrypcyjnych ARF o kluczowej roli w procesie tranzycji embriogenicznej. Analiza ekspresji genów *ARF* metodą jakościowego RT-PCR na różnych etapach SE wykazała, że większość (14 z 22) tj. *ARF1-3*, *ARF5-11*, *ARF16-19* genów była transkrybowana podczas procesu SE. Analiza RT-qPCR ujawniła zróżnicowane profile ekspresji 14 wytypowanych genów *ARF*, przy czym zdecydowana większość genów *ARF* (11/14; 79%) wykazywała modulowaną ekspresję. Sześć genów *ARF* zostało istotnie indukowanych w różnych etapach kultury embriogenicznej. Wyróżniliśmy geny aktywowane we wczesnych (3, 5 dzień kultury) i późnych (10, 15 dzień kultury) etapach procesu SE. **Cztery geny *MP/ARF5*, *ARF6*, *ARF10* i *ARF16* wykazywały wyraźny wzrost ekspresji w fazie indukcji SE, podczas gdy dwa pozostałe *ARF8* i *ARF17* ulegały podwyższonej ekspresji w zaawansowanych etapach**

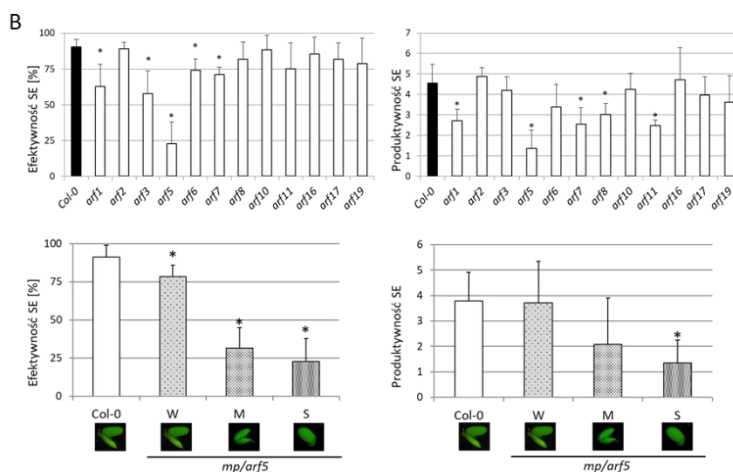
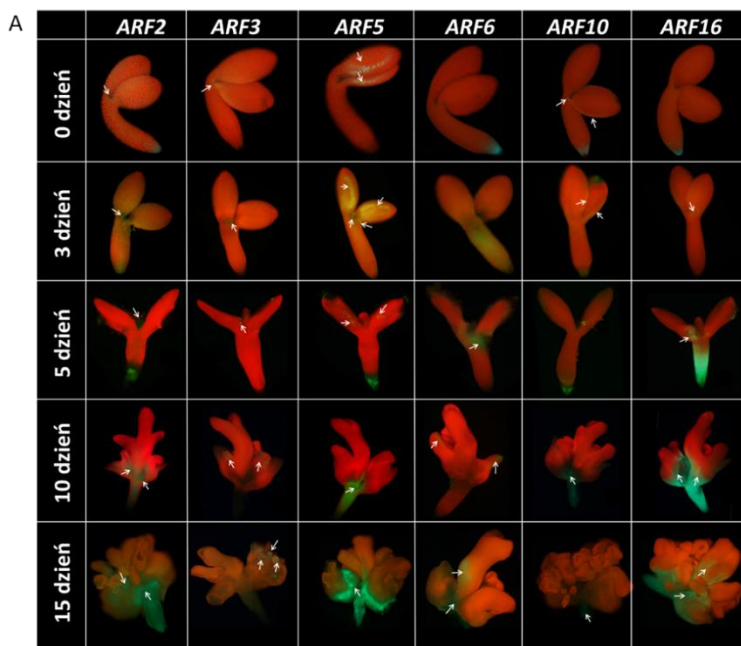
**związanych z formowaniem i rozwojem zarodków somatycznych.** Spośród genów *ARF* indukowanych podczas procesu SE **szczególnie wyróżniał się gen *MP/ARF5*, którego poziom ekspresji gwałtownie wzrastał we wczesnej fazie SE (aż 14-krotnie)**, co sugeruje istotną rolę *MP/ARF5* w tranzycji embriogenicznej. Pięć genów, *ARF1-3*, *ARF11* i *ARF18* wykazywało obniżoną ekspresję podczas procesu SE we wszystkich analizowanych dniach kultury *in vitro*. W przypadku trzech genów: *ARF7*, *ARF9* i *ARF19*, nie odnotowano zmian we wzorze ich ekspresji podczas procesu SE.

By wskazać geny *ARF*, których ekspresja jest regulowana przez auksynę, przeanalizowaliśmy ich ekspresję podczas rozwoju siewek na pożywce bezauksynowej (E0). **Ekspresja sześciu genów *MP/ARF5-6*, *ARF8-10* i *ARF16* była stymulowana egzogenną auksyną 2,4-D.** W celu ustalenia, czy obserwowane profile ekspresji genów *ARF* są specyficzne dla SE, czy też odzwierciedlają ogólne procesy odróżnicowania w eksplantatach traktowanych hormonami, zbadaliśmy także ich ekspresję podczas procesu organogenezy pędów. Wszystkie czternaście *ARF* genów transkrybowanych w kulturze SE było również aktywnych podczas procesu organogenezy pędów. Porównanie poziomów ekspresji wykazało, że **cztery geny *MP/ARF5*, *ARF6*, *ARF8* i *ARF9* wykazywały niższą ekspresję podczas procesu organogenezy pędów niż SE.**

Z wykorzystaniem transkrypcyjnych linii reporterowych przeanalizowaliśmy czasowo-przestrzenny wzór ekspresji genów *ARF* w eksplantatach poddanych indukcji SE (Fig. 6A). W szczególności badano liścienie i okolice SAM, czyli rejony zaangażowane w indukcję SE [84]. Sygnał GFP wykryliśmy w dziewięciu liniach reporterowych monitorujących ekspresję genów *ARF1-3*, *MP/ARF5-6*, *ARF10*, *ARF16*, *ARF18-19*, a w sześciu przypadkach sygnał ten był zlokalizowany w obszarach związanych z indukcją SE. W świeżo izolowanych eksplantatach IZE (0 dzień) sygnał GFP obserwowaliśmy dla *ARF2-3*, *MP/ARF5* i *ARF10*. **We wczesnej fazie SE (3, 5 dzień kultury) ekspresję w liścieniach i w pobliżu SAM wykazywały *MP/ARF5*, *ARF6*, *ARF10* i *ARF16*, przy czym najsilniejszy sygnał odnotowaliśmy w linii *MP/ARF5*.** Geny *ARF2* i *ARF3* były aktywne jedynie w pobliżu SAM. W 10 i 15 dniu kultury słaby sygnał GFP wykazywały zarodki somatyczne w liniach *ARF2-3*, *ARF6* i *ARF16*, natomiast w liniach reporterowych *ARF2*, *MP/ARF5*, *ARF10* i *ARF16* silny sygnał GFP zlokalizowany był w tkance kalusowej u podstawy zarodków somatycznych oraz w częściach eksplantatu niezaangażowanych w SE (hipokotyl i korzeń).

W celu zbadania roli genów *ARF* w procesie SE łącznie przeanalizowaliśmy dwanaście mutantów insercyjnych (*arf1*, *arf2*, *arf3*, *mp/arf5*, *arf6*, *arf7*, *arf8*, *arf10*, *arf11*, *arf16*, *arf17*, *arf19*) pod kątem ich zdolności indukcji procesu SE (Fig. 6B). Analiza wykazała, że większość

(7/12) mutantów cechowała się zaburzeniem odpowiedzi embriogenicznej. **Trzy mutanty (*arf1*, *mp/arf5* i *arf7*) wykazywały istotną redukcję zarówno efektywności, jak i produktywności SE. Mutanty *arf3* i *arf6* prezentowały niższą efektywność procesu SE, natomiast *arf8* i *arf11* – cechowały się istotnie mniejszą produktywnością SE. Proces SE był najmocniej zaburzony u mutantanta *mp/arf5*, a wraz ze wzrostem defektów rozwojowych eksplantatów mutantanta *mp/arf5* obserwowano spadek zdolności embriogenicznych. W kulturze IZE o silnym fenotypie (pojedynczy liścień, brak merystemu korzeniowego i hipokotyli [85]) odnotowaliśmy skrajne obniżenie potencjału embriogenicznego (ponad 80%). Dodatkowych dowodów na kluczową rolę MP/ARF5 w indukcji SE dostarczyła analiza linii p35S::ARF5. Konstytutywna nadekspresja *MP/ARF5* powoduje silne defekty rozwojowe, obejmujące zniekształcone kwiatostany w kształcie szpilki oraz wysoką sterylność [86], z tego powodu uzyskano jedynie 20 IZE z 12 roślin i żaden z eksplantatów z konstytutywną nadekspresją**



MP/ARF5 nie był zdolny do wytworzenia zarodków somatycznych, formował jedynie kalus. Dzięki przeprowadzonym przez nas badaniom możliwe było wyselekcjonowanie genów *ARF* o potencjalnie kluczowej roli w procesie SE, a dla części z nich potwierdziliśmy ich istotną rolę w procesie tranzycji embriogenicznej [57, 87] (Wójcikowska i in., 2025, H8, P2; Wójcikowska i in., 2020, H1, P8).

Figura 6. Czasowo-przestrzenna lokalizacja genów *ARF* ulegających ekspresji w obszarach eksplantatu związanych z indukcją SE tj. liścieniach i okolicach SAM (A). Ocena zdolności embriogenicznych wybranych mutantów *arf*. Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej Col-0 (\*), (\*p < 0,05).

**Czynnik transkrypcyjny MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR5 jako kluczowy regulator procesu somatycznej embriogenezy – analiza molekularnego mechanizmu działania MP/ARF5.**

Gen *MONOPTEROS* (*MP*), znany również jako *AUXIN RESPONSE FACTOR 5* (*ARF5*) został zidentyfikowany w 1998 roku przez Hardtke i Berletha, a ćwierć wieku badań nad nim pozwoliło odkryć kanoniczny mechanizm jądrowej sygnalizacji auksyny. Kanoniczne białko MP/ARF5 to czynnik transkrypcyjny, który reguluje ekspresję genów w odpowiedzi na auksynę [88]. MP/ARF5 może działać jako homodimer, jednak rola potencjalnych heterodimerów nadal pozostaje przedmiotem dyskusji [80]. MP/ARF5 wiąże się z elementami odpowiedzi na auksynę (AuxRE) w promotorach genów indukowanych przez auksynę. Wykazano metodą DAP-seq, że preferowanym motywem wiązania dla MP/ARF5 jest sekwencja 5'-TGTCGG-3', która została zidentyfikowana w promotorach 11 092 genów *Arabidopsis thaliana* podczas rozwoju siewek [89], a nie kanoniczny motyw AuxRE 5'-TGTCTC-3' [90, 91]. Białko MP/ARF5, podobnie jak inne białka z rodziny ARF składa się z czterech domen: domeny B3 wiążącej DNA, domeny dimeryzacyjnej, domeny środkowej, determinującej funkcję aktywacyjną białka, domeny Phox i Bem1, odpowiedzialnej za wiązanie represorowych białek Aux/IAA, głównie IAA12/BODENLOS (BDL). Przy niskim poziomie auksyny MP/ARF5 wchodzi w interakcję z BDL poprzez domeny PB1. BDL rekrutuje korepresory TPL/TPR, które z kolei wiążą się z deacetylazą histonową HDA19. HDA19 usuwa grupy acetylowe z histonów H3/H4, co prowadzi do kondensacji chromatyny i zablokowania ekspresji genów odpowiedzi na auksynę [92]. W obecności auksyny, BDL oddziałuje z nią i wiąże się do kompleksu SCF<sup>TIR/AFBs</sup>, co skutkuje formowaniem cAMP niezbędnego do działania MP/ARF5 [93]. Uwolnione białko MP/ARF5 tworzy kompleks z ATP-azami remodelującymi chromatynę z rodziny SWI/SNF – BRAHMA (BRM) i SPLAYED (SYD), co prowadzi do decondensacji i odblokowania chromatyny. Umożliwia to prawdopodobnie acetylotransferazom histonowym i czynnikom transkrypcyjnym dostęp do elementów regulatorowych w promotorach genów kontrolowanych przez MP/ARF5, a w konsekwencji aktywację ich transkrypcji [94, 95]. Co interesujące samo cAMP prawdopodobnie może naśladować działanie auksyny, a przeprowadzone przez nas badania pilotażowe wskazują, że aktywuje także tranzycję embriogeniczną (Wójcikowska, niepublikowane). Gdy białko BDL ulega ubikwitynacji i degradacji przez proteasom, cAMP nie jest syntetyzowane, a działanie MP/ARF5 zostaje zahamowane [44]. Nie można wykluczyć, że poziom auksyny powyżej określonego progu prowadzi do cytoplazmatycznej akumulacji białek MP/ARF5 uwięzionych w wyniku oligomeryzacji z MP/ARF5 lub innymi ARF, co może

hamować ekspresję genów odpowiedzi na auksynę. Tego typu oligomeryzację zaobserwowano *in vitro* oraz *in vivo* dla ARF19 [96-98]. Scenariusz ten jest prawdopodobny, gdyż rośliny p35S::ARF5 z konstytutywną nadekspresją MP/ARF5 odwzorowują mutanta *mp* – formując kwiatostan w kształcie szpilki, a eksplantaty IZE mają zaburzoną zdolność do procesu SE [86, 99]. Taki kanoniczny model działania MP/ARF5 obowiązywał do 2021 roku, wtedy zidentyfikowano izoformę białka MP/ARF5 – MP11ir [100]. Izoforma ta powstaje w wyniku alternatywnego splicingu, skutkującego retencją intronu 11, w którym zlokalizowany jest przedwczesny kodon STOP. MP11ir to skrócona wersja MP/ARF5, pozbawiona domeny PB1 zatem nie może być represjonowana ani przez oligomeryzację przy suboptymalnym poziomie auksyny, ani przez białka Aux/IAA przy niskim poziomie auksyny. Dlatego MP11ir, mimo że jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzi na auksynę, działa w sposób niezależny od niej. Transkrypt *MP11ir* został po raz pierwszy wykryty w załączniach oraz w korzeniach *Arabidopsis thaliana* [100, 101].

Kanoniczne białko MP/ARF5 pełni kluczową rolę w wielu procesach rozwojowych roślin *in vivo*, takich jak: rozwój kwiatów, załączni i pyłku, embriogeneza zygocyczna, powstawanie merystemów korzeni i pędów, utrzymanie polaryzacji organów, czy kształtowanie wiązek przewodzących (**Wójcikowska i in., 2023, H7, P6**). MP/ARF5 także odgrywa kluczową rolę w przejściu embriogenicznym, ponieważ jak wykazano: (i) jego ekspresja jest silnie indukowana podczas SE i stanowi potencjalny marker molekularny tego stadium, (ii) MP/ARF5 jest aktywny w liścieniach i rejonie merystemu apikalnego pędu, z których powstają zarodki somatyczne, (iii) eksplantaty mutanta *mp/arf5* nie są zdolne do wydajnego tworzenia zarodków somatycznych (**Wójcikowska i Gaj, 2017, H6, P13; Wójcikowska i in., 2023, H7, P6; Wójcikowska i in., 2025, H8, P2**). Dlatego znaczenie MP/ARF5 w formowaniu zarodków somatycznych jest niepodważalne.

Biorąc pod uwagę kluczową rolę białek sygnalizacji auksynowej w tranzycji embriogenicznej, zbadaliśmy, czy transkrypt *MP11ir* jest obecny podczas procesu SE indukowanego egzogenną, syntetyczną auksyną 2,4-D. Postawiliśmy hipotezę, że jeśli MP11ir reguluje geny docelowe w komórkach o niskim poziomie auksyny [100], jego obecność powinna być minimalna podczas procesu SE, ponieważ takie komórki akumulują zarówno egzogenną 2,4-D, jak i syntetyzują endogeny IAA [102] (**Wójcikowska i Gaj, 2015, P16; Wójcikowska i in., 2024, H3, P4**). W tym celu przeanalizowaliśmy poziomy transkryptu *MP11ir* w różnych próbkach: 10-dniowych siewkach, kwiatach, liściach, niedojrzałych zarodkach zygocycznych oraz eksplantatach IZE podczas indukcji SE zależnej od auksyny.

Transkrypt *MP11ir* nie został wykryty w liściach, ale był obecny w innych tkankach, szczególnie w kwiatach, co potwierdzono wcześniej [100]. Analiza ilościowa wykazała, że transkrypt *MP11ir* osiąga najwyższy poziom podczas tranzykcji embriogenicznej – 11-18 razy wyższy niż w siewkach. Sugeruje to, że **MP11ir może regulować ekspresję genów docelowych zarówno przy niskich, jak i wysokich stężeniach auksyny (Wójcikowska i in., 2025, H8, P2) [100, 101], wskazując na jego rolę w auksyno-niezależnej kontroli transkrypcji genów docelowych podczas SE.** Aby zbadać korelację między poziomem transkryptu *MP11ir*, a zdolnością do procesu SE, traktowaliśmy eksplantaty różnymi auksynami: 2,4-D, NAA i IAA, w rosnących stężeniach (0, 2.5, 5.0 i 7.5  $\mu\text{M}$ ) przez 10 dni. Różne auksyny w tych samych stężeniach wywoływały zróżnicowany efekt na poziom transkryptu *MP11ir*. Zaobserwowaliśmy dodatnią korelację między poziomem transkryptu *MP11ir*, a wzrastającymi stężeniami 2,4-D oraz NAA, ale nie IAA. Efektywność indukcji SE również różniła się w zależności od rodzaju zastosowanej auksyny. 2,4-D była najskuteczniejsza w indukcji SE, następnie NAA, natomiast IAA była najmniej efektywna. **Zaobserwowaliśmy dodatnią korelację między wzrostem poziomu transkryptu *MP11ir*, a efektywnością procesu SE dla 2,4-D i NAA, ale nie dla IAA. Dane te sugerują, że typ i stężenie auksyny wpływają na poziom transkryptu *MP11ir*, a w konsekwencji na wydajność procesu SE.** Aby sprawdzić, czy obecność transkryptu *MP11ir* jest specyficzna dla przejścia embriogenicznego, a nie jest jedynie odpowiedzią na podanie egzogennych auksyn, oceniliśmy wpływ trichostatyny A (TSA), inhibitora deacetylaz histonowych, znanego z indukowania SE [23], na poziom transkryptu *MP11ir*. Eksplantaty traktowane 1.0  $\mu\text{M}$  TSA masowo regenerują zarodki somatyczne (Wójcikowska i in., 2018, H2, P10). Podczas indukcji SE zależnej od TSA poziom transkryptu *MP11ir* był znacząco podwyższony. Transkrypt kodujący kanoniczne białko *MP/ARF5* został również wykryty w trakcie embriogenezy somatycznej, co jest zgodne z dotychczasową wiedzą (Wójcikowska i Gaj, 2017, H6, P13). Wzorzec jego ekspresji był bardzo podobny do obserwowanego dla *MP11ir*. Transkrypt *MP/ARF5* istotnie akumulował się w eksplantatach IZE traktowanych 2,4-D i NAA, a także w eksplantatach traktowanych 5.0  $\mu\text{M}$  IAA. Zaobserwowano wyraźną indukcję ekspresji *MP/ARF5* podczas SE-zależnej od auksyny oraz od TSA. Zarówno w warunkach indukcji SE przez auksynę, jak i TSA, transkrypt *MP/ARF5* był syntetyzowany w większej ilości niż *MP11ir*. Wyniki te sugerują, że **zarówno *MP11ir*, jak i *MP/ARF5* są specyficznie związane z przeprogramowaniem komórek somatycznych do embriogenicznych.**

Mutacje w genie *MP/ARF5* drastycznie hamują proces SE w porównaniu do Col-0 (Fig. 7), dodatkowo wpływają na rozwój eksplantatów tj. zarodków zygocytynych (posiadają często

jeden liścień, nieprawidłowo wykształcony hipokotyl oraz merystem apikalny korzenia), co potencjalnie może ograniczać zdolność eksplantatów do SE. By jednoznacznie potwierdzić kluczową rolę MP/ARF5 w procesie tranzycji embriogenicznej wykorzystaliśmy transgeniczną linię p35S::bdl-GR. Linia ta produkuje zmutowane białko bdl, które nie wiąże się do auksyny oraz receptora SCF<sup>TIR/AFBs</sup>, nie ulega ubikwitynacji oraz degradacji przez proteasom w obecności auksyny. **Zmutowane białko bdl może hamować działanie MP/ARF5 poprzez ciągłą interakcję z domeną PB1 MP/ARF5. Podczas indukowanej DEX nadekspresji zmutowanego białka bdl, eksplantaty nie formowały zarodków, a rozwijały się w siewki** (Fig. 7). Natomiast Col-0 i linia transgeniczna p35S::BDL-GR, syntetyzująca natywne białko BDL, masowo regenerowały zarodki somatyczne, niezależnie od obecności DEX (Fig. 7). **Wyniki te jednoznacznie potwierdzają, że MP/ARF5 jest fundamentalnym czynnikiem odpowiedzialnym za włączenie programu embriogenicznego.** Potwierdzono, że transkrypty *MP/ARF5* i *MP11ir* są obecne podczas tranzycji embriogenicznej. Jednak nie było wiadomym, czy białko MP11ir jest funkcjonalne. Aby zbadać funkcjonalność MP11ir i jego udział w procesie SE, przeprowadziliśmy test komplementacji. Do tego celu użyto linii transgenicznych, gdzie pod kontrolą promotora genu *MP/ARF5* ulegały ekspresji kanoniczne białko MP/ARF5 (pMP::MP-sekwencja CDS) lub izoforma MP11ir (pMP::MP11ir-sekwencja genomowa) w tle mutantu *mpS319*. Obecność MP11ir lub MP/ARF5 tylko częściowo przywróciła fenotyp ekotypu dzikiego. Pełne odtworzenie fenotypu kontrolnego wymagało obecności zarówno MP/ARF5, jak i MP11ir, co potwierdziliśmy w linii po skrzyżowaniu pMP::MP x pMP::MP11ir w tle mutantu *mpS319* (Fig. 7). Test komplementacji dowiódł, że **oba białka, kanoniczne i izoforma, są niezbędne do efektywnego formowania zarodków somatycznych.**

Aby wykryć białka MP/ARF5 i MP11ir podczas auksyno-zależnego procesu SE, wykorzystaliśmy linie reporterowe pMP::MP-GFP i pMP::MP11ir-GFP. Sygnał **MP/ARF5 wykrywano na różnych etapach indukcji SE jako silny sygnał jądrowy w merystemie wierzchołkowym pędu, liściach i wierzchołku korzenia.** Co istotne, sygnał ten nasilał się i obejmował coraz większe obszary wraz z wiekiem kultur. W przeciwieństwie do tego, dla **MP11ir we wszystkich etapach wykrywano jedynie słaby i rozproszony sygnał fluorescencji.** Często brakowało wyraźnego jądrowego wzorca lokalizacji, charakterystycznego dla MP-GFP. Sugeruje to, że białko MP11ir jest poniżej poziomu detekcji lub poddawane modyfikacjom posttranskrypcyjnym lub potranslacyjnym, skutkującym brakiem wyraźnego sygnału jądrowego GFP.

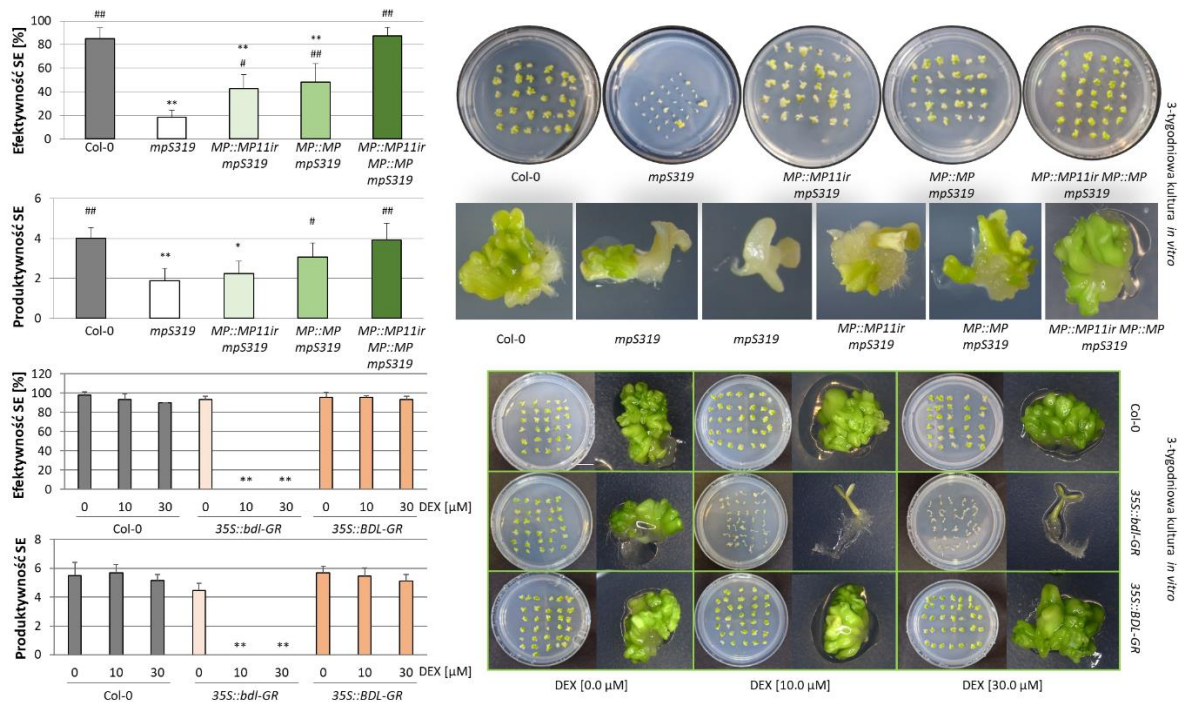


Figura 7. Zdolności embriogeniczne badanych linii tj. ekotypu kontrolnego Col-0, mutantu *mpS319*, linii pMP::MP11ir, pMP::MP, pMP::MP11ir pMP::MP w tle *mpS319*, p35S::bdl-GR, p35S::BDL-GR na podłożu EA oceniono w 21-dniowej kulturze *in vitro*. Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej Col-0 (\*), *mpS319* (#), (\*#p < 0,05; \*\*,# p < 0,01).

By zrozumieć złożone role kanonicznej i skróconej formy białka MP/ARF5 w SE, zbadaliśmy efekt ektopowej nadekspresji sztucznego, skróconego białka MP/ARF5 pozbawionego domeny PB1 ( $\Delta$ ARF5), podobnie jak MP11ir. Wykorzystaliśmy linię transgeniczną pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP z indukowaną  $\beta$ -estradiolem (E) nadekspresją  $\Delta$ ARF5. **Eksplantaty z nadekspresją  $\Delta$ ARF5**, traktowane 1  $\mu$ M  $\beta$ -estradiolu i różnymi stężeniami 2,4-D (1.0; 2.5; 5.0  $\mu$ M), **formowały kalus zamiast zarodków somatycznych. Wynik ten wskazuje, że konstytutywna nadekspresja  $\Delta$ ARF5 zaburza proces somatycznej embriogenezy.**

Hamujący wpływ nadekspresji  $\Delta$ ARF5 na SE skłonił nas do zbadania, czy wpływa on na poziom endogennej auksyny – IAA, bowiem zaburzenia SE często korelują z nieoptymalnymi stężeniami endogennej auksyny podczas indukcji SE w eksplantatach (Wójcikowska i Gaj 2015, P16). W celu oceny poziomu endogennej auksyny użyliśmy trzech metod analitycznych. Po pierwsze, oceniliśmy pośrednio zawartość auksyny poprzez analizę sygnału GFP w linii pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP. Analizę przeprowadzono podczas indukcji procesu SE indukowanej TSA (w 1 i 5 dniu kultury), aby uniknąć aktywacji sygnału DR5 przez egzogenną auksynę. Eksplantaty wzrastały na pożywce ET z  $\beta$ -estradiolem lub bez niego. W eksplantatach kontrolnych sygnał GFP zidentyfikowano w merystemie wierzchołkowym

korzenia, pędu i na końcach liścieni. **Po 24 godzinach indukcji nadekspresji  $\Delta$ ARF5, jak i w 5-dniowych eksplantatach, obserwowano silny sygnał GFP w całym eksplantacie – co wskazuje pośrednio na zwiększony poziom auksyny w eksplantatach (Fig. 8A).** Po drugie, zmierzono poziom związków indolowych (Fig. 8B) oraz samego IAA (Fig. 8C) odpowiednio w 21- oraz 10-dniowej kulturze *in vitro* na pożywce EA w eksplantatach pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP traktowanych lub nietraktowanych  $\beta$ -estradiolem. **Eksplantaty z indukowaną nadekspresją  $\Delta$ ARF5, które tworzyły kalus, wykazywały 1.37-krotny wzrost poziomu związków indolowych oraz 3-krotny wzrost zawartości IAA w porównaniu do eksplantatów kontrolnych z nieindukowaną nadekspresją  $\Delta$ ARF5.**

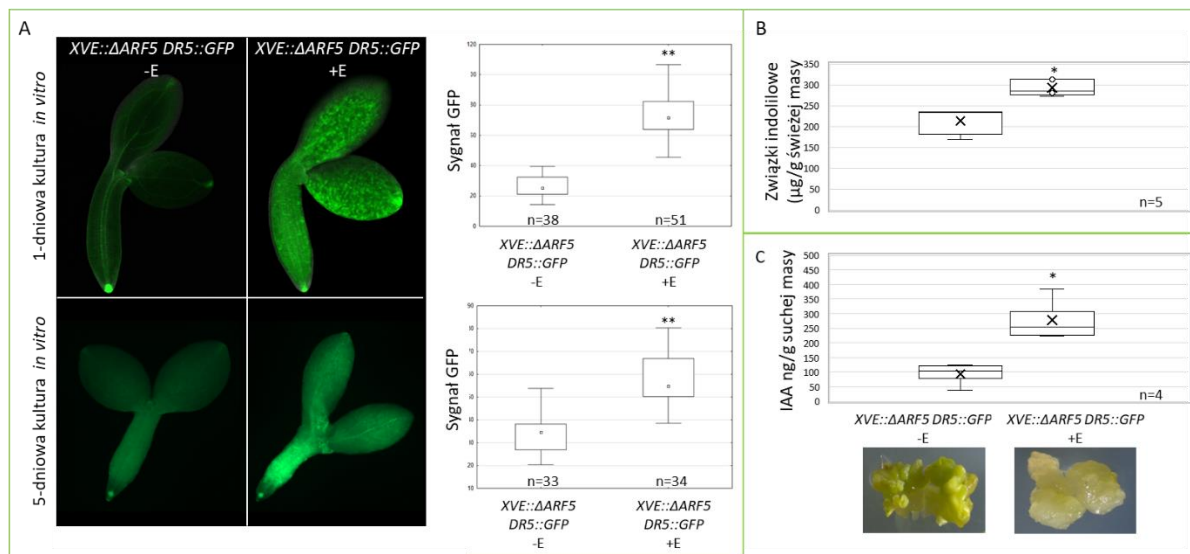


Figura 8. Analiza wpływu nadekspresji  $\Delta$ ARF5 na poziom endogennej auksyny. Analiza sygnału GFP (A), poziom związków indolowych ( $\mu$ g/g świeżej tkanki) w trzytygodniowej kulturze (B) oraz poziom IAA (ng/g suchej masy) w dziesięciodniowej kulturze (C) w eksplantatach pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP traktowanych bądź nie  $\beta$ -estradiolem. Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). n – liczba pomiarów.

Po trzecie sprawdziliśmy, czy powstawanie kalusa pod wpływem nadekspresji  $\Delta$ ARF5 może wynikać z podwyższonego poziomu IAA, za który mogą odpowiadać enzymy podstawowego szlaku biosyntezy auksyny IPyA. W tym celu przeanalizowaliśmy zdolność do procesu SE u Col-0 oraz w linii pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP traktowanych yucasin (100 i 150  $\mu$ M), inhibitorem enzymów YUC [103]. Eksplantaty Col-0, nietraktowane i traktowane  $\beta$ -estradiolem oraz pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP nietraktowane  $\beta$ -estradiolem i traktowane yucasin wykazywały silnie obniżoną efektywność SE (1.3- do 1.5-krotnie niższą) oraz produktywność (nie więcej niż dwa zarodki somatyczne na reagujący eksplantat), a wyniki te są zgodne z literaturą [75, 104]. Wyniki te potwierdzają, że enzymy YUC są istotne dla efektywnej tranzycji embriogenicznej. Następnie sprawdziliśmy, czy traktowanie eksplantatów pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP yucasin może odwrócić fenotyp wywołany przez nadekspresję

$\Delta$ ARF5 indukowaną  $\beta$ -estradiolem i umożliwić regenerację zarodków, zamiast kalusa. Rzeczywiście, te eksplantaty formowały zarodki somatyczne (efektywność 15.4% przy 100  $\mu$ M i 3.4% przy 150  $\mu$ M yucasin), z niską produktywnością (1 zarodek na eksplantat), zamiast kalusa. Wynik ten potwierdza, że **nadekspresja  $\Delta$ ARF5 stymuluje biosyntezę auksyny drogą IPyA, doprowadza do suboptymalnego poziomu IAA, co ostatecznie prowadzi do powstawania kalusa zamiast zarodków somatycznych**. Prawdopodobnie także inne, jak dotąd niepoznane komponenty genetyczne zostają deregulowane przez nadekspresję  $\Delta$ ARF5 hamując proces SE.

W celu zbadania związku między nadekspresją  $\Delta$ ARF5, a wahaniami poziomu endogennej auksyny, przeanalizowaliśmy ekspresję genów biosyntezy auksyny z szlaku IPyA: *TAA1*, *TAR1*, *TAR2* oraz *YUC1–11*. Geny te ulegają ekspresji podczas SE i są kluczowe dla produkcji auksyny w tym procesie [56, 104, 105]. W linii pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP indukowaliśmy nadekspresję  $\Delta$ ARF5 w eksplantatach na podłożu z 2,4-D i 1  $\mu$ M  $\beta$ -estradiolu przez 1, 5 i 10 dni. Analiza wykazała, że nadekspresja  $\Delta$ ARF5 znacząco zmieniała ekspresję genów *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8*: po 24 godzinach zaobserwowano wzrost ekspresji *TAA1*, *TAR1*, *YUC5* i *YUC8*, natomiast *YUC3* i *YUC8* były indukowane w 5. dniu. Po 10 dniach nadekspresji  $\Delta$ ARF5 utrzymywała się podwyższona ekspresja *TAA1* i *YUC5*, a ekspresja *YUC3* uległa obniżeniu. Dalsze analizy linii p35S::bdl-GR oraz mutantu *mpS319* potwierdziły silne obniżenie ekspresji wytypowanych genów *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8* (Fig. 9A). Profil ekspresji pozostałych genów biosyntezy auksyny w liniach pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP, p35S::bdl-GR oraz *mpS319* charakteryzował się głównie stabilnym lub obniżonym poziomem. Aby ocenić znaczenie MP/ARF5 i MP11ir w regulacji *in vivo* genów *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8*, przeanalizowaliśmy ich ekspresję w 5- i 10-dniowych eksplantatach linii pMP::MP11ir, pMP::MP oraz pMP::MP11ir pMP::MP w tle *mpS319*. W eksplantatach 5-dniowych ekspresja wszystkich badanych genów w obecności pojedynczego lub obu białek była podobna do poziomu w Col-0 (Fig. 9B). W eksplantatach 10-dniowych ekspresja *TAA1*, *YUC3* i *YUC5* wracała do poziomu Col-0 w obecności MP11ir, podczas gdy ekspresja *TAR1* i *YUC8* była obniżona. W obecności samego MP/ARF5 lub w kombinacji z MP11ir, badane geny wykazywały ekspresję równą (*TAA1*, *YUC8*) lub wyższą (*YUC3*, *YUC5*) niż w Col-0, a wszystkie charakteryzowały się istotnie wyższą ekspresją niż u *mpS319* (Fig. 9C). Analiza *in silico* danych z DAP-seq zidentyfikowała miejsca wiązania MP/ARF5 w promotorach genów *TAA1*, *TAR1* i *YUC5* oraz miejsca wiązania ARF2 w promotorze genu *YUC8* [90], a wszystkie geny deregulowane w odpowiedzi na  $\Delta$ ARF5 posiadają przynajmniej jedną sekwencję AuxRe w rejonie promotorowym. **Łącznie wyniki te sugerują, że MP/ARF5,  $\Delta$ ARF5, a zatem**

**prawdopodobnie MP11ir, mogą regulować ekspresję genów biosyntezy auksyny, w szczególności *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8*.**

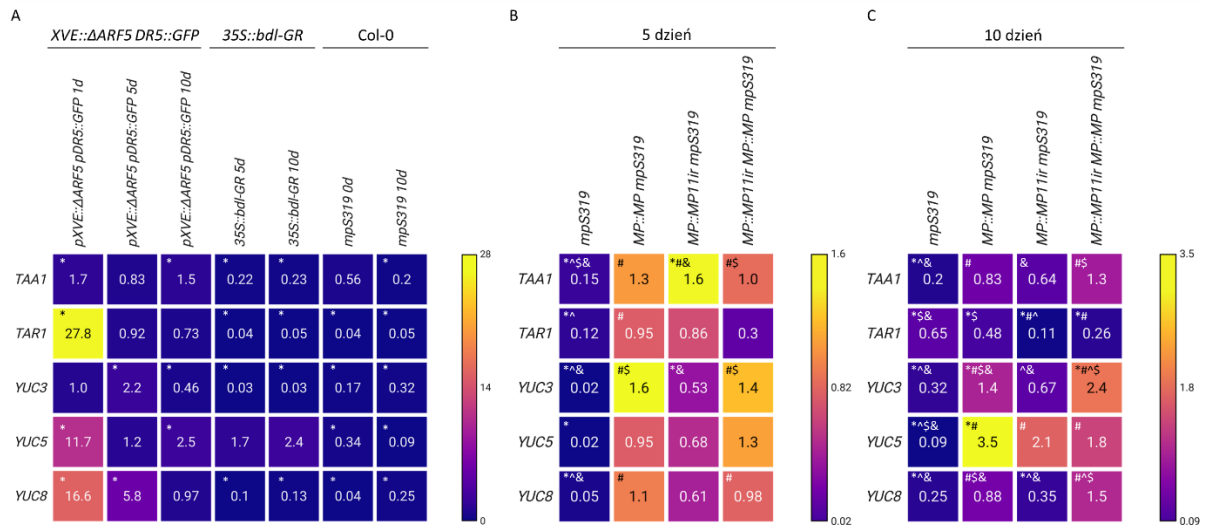


Figura 9. Mapy ciepłone przedstawiające względną ekspresję genów biosyntezy auksyny IAA *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8* w 1-, 5- i 10-dniowych kulturach embriogenicznych linii transgenicznej *pXVE::ΔARF5 pDR5::GFP* poddanej działaniu 1 μM β-estradolu (+E), 5- i 10-dniowych kulturach embriogenicznych linii transgenicznej *p35S::bdl-GR* poddanych działaniu 10 μM deksametazonu (+DEX) oraz 0- i 10-dniowych kulturach embriogenicznych mutantu *mps319* (A). Wartości istotnie statystycznie różne od kultury kontrolnej (\*), (\*p < 0,05). Mapa ciepłona przedstawiająca względną ekspresję genów biosyntezy auksyny IAA w 5- (B) i 10-dniowej (C) kulturze *mps319*, *pMP::MP mps319*, *pMP::MP11ir mps319* i *pMP::MP11ir pMP::MP mps319*. Wartości istotnie statystycznie różne od Col-0 (\*), *mps319* (#), *pMP::MP mps319* (^), *pMP::MP11ir mps319* (\$), *pMP::MP11ir pMP::MP mps319* (&), (\*#^\$&p < 0,05).

Po przeanalizowaniu lokalizacji enzymów szlaku IPyA biosyntezy auksyny podczas tranzykcji embriogenicznej z wykorzystaniem translacyjnych linii reporterowych opracowaliśmy ich mapę rozmieszczenia podczas procesu SE. Dodatkowo w celu potwierdzenia MP/ARF5-, MP11ir-zależnej ekspresji wytypowanych genów *TAA1*, *TAR1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8* skrzyżowaliśmy translacyjne linie reporterowe genów biosyntezy auksyny z liniami *pXVE::ΔARF5 pDR5::GFP*, *p35S::bdl-GR* oraz *mps319*, aby zbadać zmiany lokalizacji enzymów. Eksplantaty indukowano do SE przy użyciu 2,4-D oraz 1 μM β-estradolu lub 10 μM DEX w celu indukcji nadekspresji ΔARF5 lub bdl i analizowano w 5 oraz 10 dniu kultury. Dodatkowo przeanalizowaliśmy sygnał GUS w świeżo izolowanych eksplantatach (0 dzień) oraz w 5 i 10 dniu procesu SE mutantu *mps319* (Fig. 10). Wśród analizowanych enzymów *TAA1*, *YUC3*, *YUC5* i *YUC8* wykazywały odmienne wzorce ekspresji w odpowiedzi na nadekspresję ΔARF5. Najsilniej akumulował się enzym *YUC8* w proksymalnych rejonach liścieni i hipokotyli w warunkach nadekspresji ΔARF5, co potwierdzały intensywne sygnały GUS. Z kolei nadekspresja bdl powodowała znaczący spadek intensywności sygnału GUS dla *YUC8*. U mutantu *mps319* sygnał GUS dla *YUC8* był nieobecny, co potwierdza zależność ekspresji genu *YUC8* od MP/ARF5 i MP11ir. *TAA1* był

obecny w całych eksplantatach IZE (5. i 10. dzień), a nadekspresja  $\Delta$ ARF5 powodowała jedynie nieznaczny wzrost sygnału GUS. Zmiany intensywności były niewielkie zarówno w przypadku nadekspresji *bdl*, jak i u mutantu *mpS319*. Białko YUC3 kumulowało się w rejonie hipokotyłu eksplantatów, a ilość YUC3 zwiększała się w liścieniach w warunkach nadekspresji  $\Delta$ ARF5. Nadekspresja *bdl* znacząco obniżała intensywność sygnału GUS, który był całkowicie nieobecny w IZE mutantu *mpS319* lub obniżony w 5. i 10. dniu SE. Białko YUC5 kumulowało się na końcach liścieni wyłącznie w 10-dniowych eksplantatach z nadekspresją  $\Delta$ ARF5. Nie obserwowano zmian lokalizacji białka YUC5 przy nadekspresji *bdl*. U mutantu *mpS319* sygnał GUS wyznaczający lokalizację YUC5 był ograniczony do pojedynczych komórek. W przeciwieństwie do powyższych, lokalizacja TAR1 nie zmieniała się ani pod wpływem nadekspresji  $\Delta$ ARF5, nadekspresji *bdl*, ani u mutantu *mpS319*.

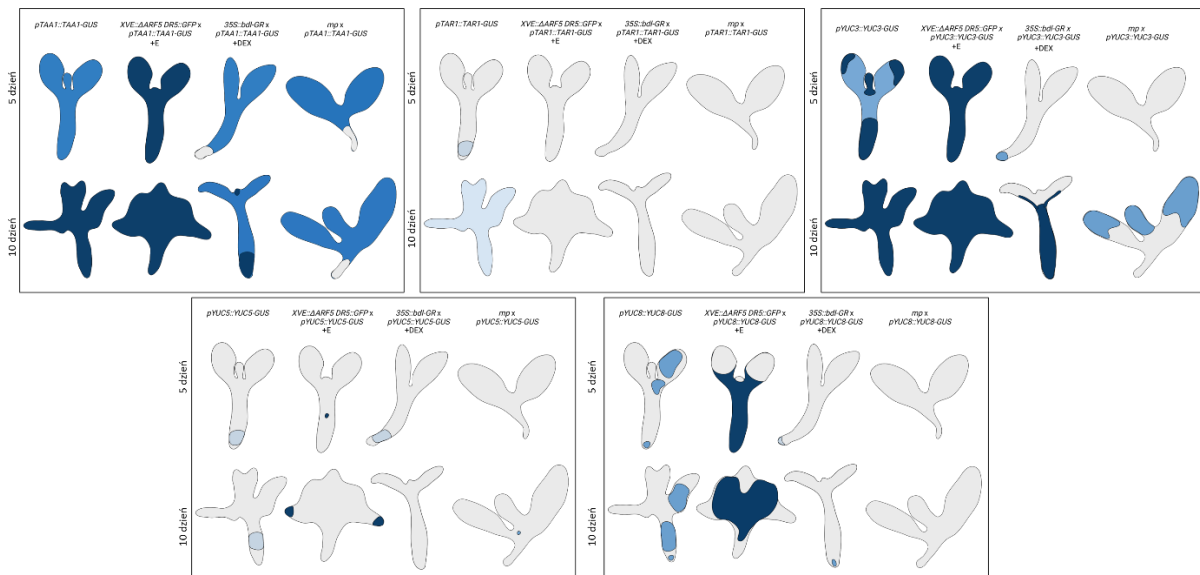


Figura 10. Podsumowanie lokalizacji enzymów TAA1, TAR1, YUC3, YUC5 i YUC8 podczas procesu SE w tle ekotypu kontrolnego Col-0, linii pXVE:: $\Delta$ ARF5 pDR5::GFP poddanej działaniu  $\beta$ -estradiolu, linii p35S::bdl-GR poddanej działaniu DEX oraz mutantu *mpS319*.

Otrzymane wyniki pozwoliły na zbudowanie modelu działania MP/ARF5 i MP11ir podczas procesu SE. Zakłada on, że zarówno kanoniczne białko MP/ARF5 i izoforma MP11ir są niezbędne do indukcji procesu SE poprzez kontrolę genów biosyntezy auksyny i utrzymanie optymalnego dla indukcji SE endogennego stężenia IAA (Fig. 11A). Nadekspresja skróconego białka  $\Delta$ ARF5 powoduje wzrost poziomu TAA1, YUC3, YUC5 i YUC8 w eksplantatach, co prowadzi do suboptymalnego poziomu endogennej auksyny, zahamowania procesu SE i formowania kalusa (Fig. 11B). Zablockowanie działania MP/ARF5 poprzez ekspresję represora *bdl* powoduje obniżenie poziomu TAA1, YUC3, YUC5 i YUC8 co hamuje proces SE i prowadzi do rozwoju siewek (Fig. 11C). Brak

**MP/ARF5 i MP11ir w mutancie *mps319* prowadzi do obniżenia poziomu TAA1, oraz braku YUC3, YUC5 i YUC8 we wczesnej fazie indukcji SE, co hamuje proces SE, formowanie siewek i kalusa (Fig. 11D).**

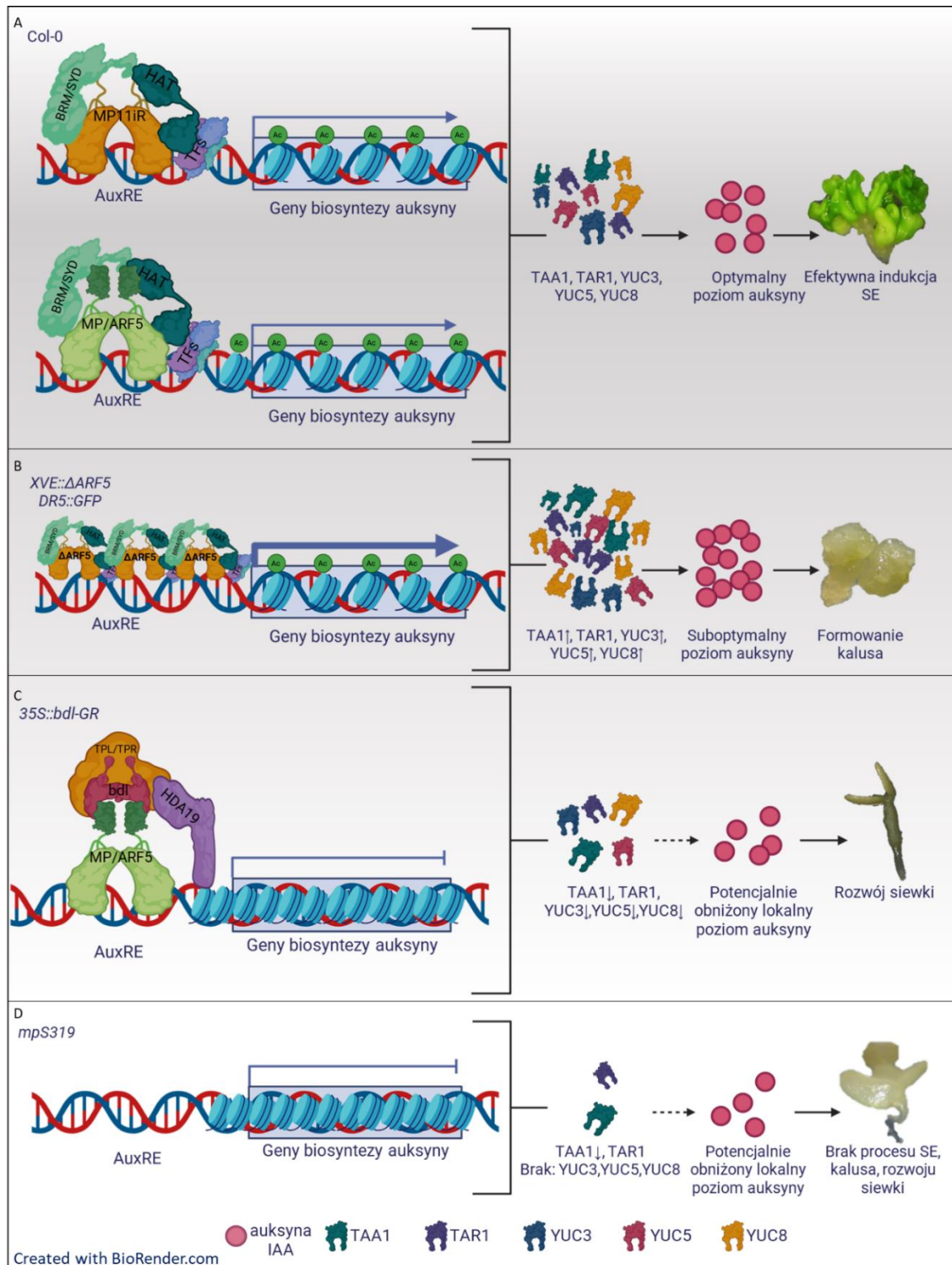


Figura 11. Proponowany model działania MP/ARF5 i MP11ir podczas tranzykcji embriogenicznej. Kanoniczne białko MP/ARF5 i izoforma MP11ir są niezbędne do indukcji procesu SE poprzez kontrolę genów biosyntezy auksyny (A). Nadekspresja  $\Delta$ ARF5 powoduje wzrost ilości enzymów TAA1, YUC3, YUC5 i YUC8 w eksplantatach, co zaburza homeostazę IAA, prowadzi do suboptimalnego poziomu auksyny, hamuje proces SE

i indukuje tworzenie kalusa (B). Blokowanie działania MP/ARF5 przez represor bdl powoduje obniżenie poziomu TAA1, YUC3, YUC5 i YUC8, co prowadzi do potencjalnie obniżonego lokalnego poziomu IAA, hamuje proces SE i indukuje rozwój siewki (C). Brak MP/ARF5 i MP11ir w mutancie *mpS319* prowadzi do obniżenia poziomu TAA1, braku enzymów YUC3, YUC5 i YUC8, prawdopodobnie zredukowanego lokalnego poziomu IAA we wczesnej fazie indukcji SE, co hamuje proces SE, tworzenie kalusa i prowadzi do rozwoju siewki. AuxRE – elementy odpowiedzi na auksynę; BRM/SYD – BRAHMA/SPLAYED; MP/ARF5 – MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR 5; MP11ir – izoforma MP; TFs – czynniki transkrypcyjne; HAT – acetylazy histonowe; TAA1 – aminotransferaza tryptofanu *Arabidopsis* 1, TAR1 – białko pokrewne aminotransferazie tryptofanu 1; TPL/TPR – TOPLESS/TPL-RELATED; YUC – YUCCA; Ac – grupa acetylowa; SE – somatyczna embriogeneza

### **Za najważniejsze spośród moich dotychczasowych osiągnięć uważam:**

1. Wskazanie istotnej funkcji acetylacji histonów w mechanizmach epigenetycznych kontrolujących geny, które odgrywają krytyczną rolę w embriogennym przeprogramowaniu roślinnych komórek somatycznych.
2. Dostarczenie unikatowych danych transkryptomicznych procesu SE indukowanego trichostatyną A – czynnika wykorzystywanego w indukcji somatycznej embriogenezy oraz androgenyzy w komórkach roślinnych.
3. Wskazanie złożoności regulacji genów związanych z acetylacją histonów w indukcji embriogenicznej i wskazanie na różnice w mechanizmach regulacyjnych, które są zaangażowane w proces SE indukowany trichostatyną A i auksyną.
4. Określenie kierunków zmian zawartości endogennych hormonów podczas procesu somatycznej embriogenezy indukowanego trichostatyną A oraz auksyną.
5. Identyfikacja nowych potencjalnych genów zaangażowanych w proces tranzycji embriogenicznej związanych z polarnością tkanki oraz biosyntezą auksyny alternatywnym szlakiem IAN.
6. Przeniesienie wiedzy z rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* na roślinę uprawną *Hordeum vulgare*. Wskazanie trichostatyny A jako czynnika zwiększającego zdolności regeneracyjne u odmian jęczmienia opornych w kulturze *in vitro*, co może w przyszłości otworzyć drogę do stworzenia efektywnych systemów transformacji jęczmienia innych odmian niż Golden Promise.
7. Wytypowanie genów z rodziny *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*MP/ARF5*, *ARF6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF16*, oraz *ARF17*) zaangażowanych w proces tranzycji embriogenicznej oraz udowodnienie ich priorytetowej roli w procesie SE.
8. Identyfikacja transkryptu izoformy *MP/ARF5*, *MP11ir* podczas tranzycji embriogenicznej.
9. Wykazanie korelacji między poziomem transkryptów *MP/ARF5* oraz *MP11ir*, a zdolnością do procesu somatycznej embriogenezy eksplantatów.
10. Udowodnienie, z wykorzystaniem klasycznej genetyki, że *MP/ARF5* oraz *MP11ir* w pojedynkę częściowo przywracają fenotyp ekotypu kontrolnego, a do pełnej

komplementacji wymagana jest obecność obu, białek kanonicznej formy MP/ARF5 i izoformy MP11ir.

11. Opracowanie modelu działania MP/ARF5 i MP11ir podczas tranzykcji embriogenicznej, zakładającego, że kanoniczne białko MP/ARF5 oraz izoforma MP11ir są wymagane do efektywnej tranzykcji embriogenicznej poprzez regulację genów biosyntezy auksyny, a zatem poziomu endogennej auksyny - IAA.
12. Zebranie, podsumowanie i udostępnienie informacji na temat roli auksyny w indukcji tranzykcji embriogenicznej, molekularnego mechanizmu, epigenetycznych i genetycznych komponentów zaangażowanych w proces somatycznej embriogenezy oraz dokładnej charakterystyki czynnika transkrypcyjnego MP/ARF5 w postaci prac przeglądowych. Prace te stanowią cenne źródło wiedzy dla badaczy zajmujących się zagadnieniem embriogenego przeprogramowania roślinnych komórek somatycznych.

## POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA - POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA

### Poznanie mechanizmów syntezy auksyny, popularyzowanie wiedzy o wytwarzaniu auksyn u *Arabidopsis thaliana* podczas rozwoju *in vivo* oraz *in vitro*.

Od początku kariery naukowej zajmuję się zagadnieniami związanymi ze ścieżkami syntezy auksyny, głównie IAA. Z biegiem lat, moją uwagę przykuwają jednak inne typy naturalnych auksyn, których może być znacznie więcej niż pierwotnie sądzono (**Wójcikowska i in., 2025, P1**), (**Wójcikowska i in., 2025, P3**). Poza najlepiej opisaną i zbadaną ścieżką syntezy IAA, tzw. IPyA, istnieje kilka alternatywnych dróg produkcji tego hormonu, gdzie enzymy NITRYLAZY (NIT) pełnią istotną funkcję. NIT to enzymy, które zostały zidentyfikowane w różnych królestwach i są ważnymi przemysłowo hydrolazami, szeroko stosowanymi w produkcji cennych chemikaliów oraz leków. W roślinach NIT są filogenetycznie podzielone na dwie grupy: NIT1 i NIT4. Podrodzina NIT1 (NIT1–3) detoksykująca nityle jest specyficzna dla rodziny *Brassicaceae* i katalizuje przemianę indolo-3-acetonitrylu (IAN), pochodzącego z glukozynolanów indolu (IG) lub indolo-3-acetaldoximu (IAOx), w IAA. Podrodzina NIT1 jest także potencjalnie zaangażowana w katabolizm indoloacetamidu (IAM), chociaż nie zostało to jeszcze potwierdzone *in vivo* w roślinach. NIT4 wydaje się pełnić funkcję w detoksykacji cyjanku i wykazuje silną specyficzność wobec  $\beta$ -cyanoalaniny. Ponadto wysuwa się hipotezę, że NIT4, podobnie jak enzymy z podrodziny NIT1, może brać udział w tworzeniu kwasu fenylooctowego (PAA) z fenyloacetonitrylu/cyjanku benzylu (PAN/BnCN). Rośliny uprawne, takie jak *Zea mays* i *Oryza sativa*, były sporadycznie wykorzystywane do badań nad NIT, w związku z czym nasza

wiedza na temat roli tych enzymów jest oparta głównie na badaniach nad rośliną modelową *Arabidopsis thaliana*. Opracowana przeze mnie praca przeglądowa (Wójcikowska, 2025, P1) skupia się głównie na podrodzynie NIT1, która odgrywa rolę w rozwoju korzeni i kwiatów *in vivo*. Jednak ekspresja genów *NIT* została wykazana głównie w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego, takiego jak zasolenie, susza, niedobór siarczanów, termomorfogeneza, podczas których aktywowana jest zależna od NIT biosynteza auksyn. Ponadto rola NIT została potwierdzona w procesach morfogenetycznych w hodowlach *in vitro*, co podkreśla ich rolę w indukowanym stresem przeprogramowaniu rozwojowym.

- Wójcikowska, B.<sup>\*✉</sup> 2025. Involvement of nitrilases in auxin biosynthesis and their role in plant development and stress response. *Plant and Cell Physiology*, pcaf152, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaf152>.

IF<sup>1</sup> 4.0<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 140<sup>2a</sup>, 140<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 0<sup>3a</sup>, 0<sup>3b</sup>

W pracy (Wójcikowska i in., 2024, P3) podsumowuję i popularyzuję wyniki badań Gonzalez-Garcia i współpracowników 2024 [106]. Autorzy przedstawili badanie opisujące nową substancję chemiczną o działaniu auksynowym, BiAux (C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>, 3,3'-bis(2-metoksy-2-oksoetylo)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)-1H,1'H-2,2'-bisindol), działającą przez sygnalizację jądrową auksyn, jako związek biorący udział w tworzeniu korzeni bocznych. Na rozwój korzeni wpływa wiele czynników środowiskowych, takich jak dostępność wody, światła, azotu, fosforu i tlenu azotu. W korzeniach *Arabidopsis thaliana* rosnących w świetle powstaje więcej korzeni bocznych, ale przyczyna tego zjawiska była nieznana. Analizy metabolomu pozwoliły zidentyfikować związek chemiczny, BiAux, który gromadzi się w znacznych ilościach w korzeniach rosnących w świetle w porównaniu z korzeniami rosnącymi w ciemności. Rośliny traktowane BiAux miały więcej zawiązków, jak i korzeni bocznych. BiAux, w przeciwieństwie do naturalnych i syntetycznych auksyn, nie hamuje wzrostu korzeni, co jest jedną z najbardziej typowych reakcji auksyn. Rośliny traktowane BiAux charakteryzowały się wzrostem długości głównego korzenia, całkowitej długości systemu korzeniowego oraz mniejszymi, ale liczniejszymi komórkami merystematycznymi. Jednocześnie rośliny poddane działaniu BiAux nie wykazywały zmian w wyglądzie pędów. Co ciekawe, mechanizm działania BiAux jest podobny u różnych gatunków roślin, ponieważ traktowanie pomidora BiAux również poprawiło wzrost korzeni. Naukowcy odpowiedzieli na pytanie, dlaczego BiAux powoduje zmiany w architekturze systemu korzeniowego. Podczas traktowania BiAux zaobserwowano zwiększoną amplitudę i zmienione wzorce częstotliwości oscylacji w strefie wzrostu, co spowodowało powstanie większej liczby komórek

założycielskich w perycyklu, zawiązków i korzeni bocznych. BiAux zwiększa również gęstość korzeni bocznych w różnych mutantach z defektami tworzenia korzeni bocznych, potwierdzając dominującą rolę BiAux w ich inicjacji. BiAux wiąże się z receptorami jądrowymi auksyn TIR1 i AFB2, jednak w innym miejscu niż IAA. Wiązanie to zwiększa powiązanie białek IAA18 i 28 z kompleksem SCF<sup>TIR1/AFB2</sup>, a uwolnione białko ARF7 może w ten sposób aktywować transkrypcję genów. Analizy transkryptomu oraz badania mutantów *arf7* i *arf19* sugerują, że BiAux działa poprzez ARF7, ale nie poprzez ARF19. W roślinach z mutacją genu *ARF7* (ale nie *ARF19*) wiele genów aktywowanych po podaniu BiAux nie jest już deregulowanych. Ponadto mutant *arf7*, ale nie *arf19*, poddany działaniu BiAux wykazywał zmniejszony sygnał pDR5::LUC, co dowodzi, że jest niezbędny do zwiększenia liczby miejsc DR5-dodatnich w odpowiedzi na BiAux. Dodatkowo analizy transkryptomu wykazały różnice w ekspresji genów w korzeniach poddanych działaniu BiAux, IAA i obu tych substancji jednocześnie. Różnicowa ekspresja wielu genów wyjaśnia zróżnicowane działanie tych dwóch związków auksynowych na rozwój korzeni.

- Wójcikowska, B., Friml, J., Mazur, E. 2024. BiAux, a newly discovered compound triggering auxin signaling. Trends in Plant Science, 29, 1279-1281.

IF<sup>1</sup> 20.8<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 200<sup>2a</sup>, 200<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 0<sup>3a</sup>, 0<sup>3b</sup>

Embriogeneza zygotyczna roślin wyższych przebiega synchronicznie i w przestrzennym powiązaniu z otaczającą tkanką matczyną zalążni. Mechanizmy koordynujące rozwój zarodka i zalążni od dawna stanowią istotne zagadnienie w biologii roślin. W pracy (**Robert i in., 2018, P11**) wykazaliśmy, że auksyna odgrywa kluczową rolę w komunikacji pomiędzy zalążnią, a rozwijającym się zarodkiem zygotycznym. Wskazaliśmy, że odpowiedź na auksynę w zalążniach *Arabidopsis thaliana* i *Zea mays* wzrasta po zapłodnieniu, co sugeruje istnienie konserwowanego mechanizmu u roślin. Ponadto dowiedliśmy, że u *Arabidopsis thaliana* zwiększona odpowiedź na auksynę wynika z podwyższonej biosyntezy tego hormonu w osłonach zalążni pełniących funkcję ochronną zarodka. W trakcie prowadzenia badań byłam odpowiedzialna za zbiór tkanki - izolowanych zalążni ekotypu Col-0 oraz mutantu *wei8 tar1 (taal tar1)* przed, oraz po 24 i 48 godzinach po zapyleniu, w celu dokonania analizy metabolomu auksynowego. Auksyna produkowana właśnie przez tkanki mateczne jest transportowana przez suspensor i niezbędna do prawidłowego wczesnego rozwoju zarodka zygotycznego. Ektopowa synteza auksyny w zarodkach zygotycznych na bardzo wczesnym etapie rozwoju jest w stanie skompensować brak matczynej biosyntezy, co wskazuje, że auksyna matczyna stanowi źródło hormonu

akumulowanego w zarodku zygotycznym. Przedstawione badania wskazują, że tkanki sporofitu żeńskiego koordynują rozwój zarodka zygotycznego na wczesnych etapach jego rozwoju.

- Robert, H.S., Park, C., Gutiérrez, C.L. Wójcikowska B., Pěnčík, A., Novák, O., Chen, J., Grunewald, W., Dresselhaus, T., Friml, J., Laux, T. 2018. Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 4, 548-553.

IF<sup>1</sup> 13.3<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 15<sup>2a</sup>, 200<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 140<sup>3a</sup>, 184<sup>3b</sup>

**Regulacja genów kodujących czynniki transkrypcyjne kontrolujące tranzycję embriogeniczną w komórkach somatycznych *Arabidopsis thaliana* za pośrednictwem acetylacji histonów (niezwiązane z osiągnięciem naukowym).**

Posttranslacyjne modyfikacje histonów, takie jak acetylacja histonów są przeprowadzane przez antagonistycznie działające enzymy – acetylotransferazy (HAT) oraz deacetylasy (HDAC) histonowe. Enzymy HAT i HDAC regulują poziom acetylacji histonów w wielu procesach rozwojowych *in vivo*, są także uznawane za elementy kontrolujące procesy *in vitro*, jak SE. Jednakże funkcje poszczególnych HAT/HDAC oraz geny poddawane regulacji zależnej od acetylacji histonów podczas SE pozostają w dużej mierze nieznane. W pracy (**Morończyk i in., 2022, P7**) przedstawiliśmy globalne (ELISA, immunohistochemia) i genowo specyficzne (ChIP-qPCR) zmiany w acetylacji histonów w eksplantatach *Arabidopsis thaliana* poddawanych SE. Podczas procesu SE indukowanego TSA wykazaliśmy, że acetylacja histonów H3 i H4 może regulować ekspresję kluczowych genów czynników transkrypcyjnych, odgrywających zasadniczą rolę w SE, takich jak *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* oraz *MYB118*. Większość HAT zaangażowanych w SE, w tym HAG2, HAC1, HAC4, HAC5, HAF1 i HAF2, wydaje się pozytywnie wpływać na indukcję SE, podczas gdy HAG1/GCN5 może negatywnie kontrolować ten proces. Wśród HDAC, zidentyfikowaliśmy HDA19 jako element negatywnie wpływający na SE poprzez regulację genów *LEC1*, *LEC2* i *BBM*. Mój wkład w powstanie pracy obejmował przeprowadzenie doświadczenia RNA-Seq podczas procesu SE oraz dostarczenie danych o profilach ekspresji genów kodujących enzymy HAT/HDAC, na podstawie których wytypowano geny potencjalnie zaangażowane w proces SE do dalszych analiz funkcjonalnych oraz pomoc w kolekcjonowaniu materiału roślinnego dla analiz ELISA oraz ChIP-qPCR. Uzyskane wyniki ujawniają kluczową funkcję acetylacji histonów w epigenetycznych mechanizmach kontrolujących geny *TF*, które pełnią istotną rolę w tranzycji embriogenicznej somatycznych komórek roślinnych.

- Morończyk, J., Brąszewska, A., Wójcikowska, B., Chwiałkowska, K., Nowak, K., Wójcik, A.M., Kwaśniewski, M., Gaj, M.D. 2022. Insights into the histone acetylation-mediated

regulation of the transcription factor genes that control the embryogenic transition in the somatic cells of *Arabidopsis*. *Cells*, 11, 863.

IF<sup>1</sup> 6.0<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 140<sup>2a</sup>, 140<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 22<sup>3a</sup>, 26<sup>3b</sup>

### **Wpływ azacytydyny (5-AzaC) oraz mutacji w genach kodujących metylazy DNA na odpowiedź embriogeniczną u *Arabidopsis thaliana*.**

Metylacja DNA, odgrywa ważną rolę w regulacji genów kontrolujących rozwój roślin. Metylacja DNA roślin obejmuje dodanie grupy metylowej do piątego węgla tworzącego pierścień pirymidynowy cytozyny, w sekwencjach CpG, CpNpG oraz CpNpN (gdzie N może być dowolnym nukleotydem oprócz G), co skutkuje zwiększeniem zawartości 5-metylocytozyny (5mC) w DNA genomowym. W roślinach wyróżniono trzy typy metylaz DNA: METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) oraz DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM1 i DRM2). U *Arabidopsis thaliana* enzymy DRM są niezbędne do metylacji *de novo*, podczas gdy MET1 i CMT3 utrzymują wzorzec metylacji podczas replikacji DNA (metylacja zachowawcza). W przeciwieństwie do rozwoju *in planta*, znaczenie metylacji DNA w procesach morfogenetycznych indukowanych *in vitro* jest znacznie mniej poznane. W badaniach analizowaliśmy wpływ metylacji DNA na proces SE indukowany u *Arabidopsis thaliana*. Nasze badania wykazały spadek globalnego poziomu metylacji DNA podczas SE, w kontrze do zwiększonej ekspresji genów kodujących metylazy DNA: *MET1* i *CMT3* oraz obniżonej ekspresji demetylaz DNA (*DEMETER (DME)*, *REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1)*, *DEMETER-LIKE PROTEIN 2 (DML2)*). W związku z tym globalny poziom metylacji DNA nie wydaje się korelować z aktywnością transkrypcyjną genów kodujących metylazy i demetylazy DNA, co sugeruje złożoność mechanizmów regulacyjnych kontrolujących status metylacji DNA w epigenomie SE. Ponadto w kulturach traktowanych 5-AzaC oraz w mutantach metylaz DNA stwierdziliśmy wyraźne zmiany poziomu ekspresji genów regulujących SE. W szczególności, w kulturze traktowanej 5-AzaC, która była niezdolna do indukcji SE, zaobserwowaliśmy istotne zahamowanie ekspresji genów *LEC1*, *LEC2* i *BBM*. Natomiast w mutantach *drm1drm2* oraz *drm1drm2cmt3*, charakteryzujących się polepszoną odpowiedzią embriogeniczną, odnotowaliśmy wyraźną indukcję ekspresji tych genów. Zróznicowana ekspresja genów kodujących metylazy DNA oraz istotnie zmieniona odpowiedź embriogeniczna mutantów sugerują, że metylacja DNA jest zaangażowana w regulację procesu SE u *Arabidopsis thaliana*. Mój wkład w powstanie publikacji (Grzybkowska i in., 2018, P12)

obejmował pomoc w zbiorze materiału roślinnego dla globalnych analiz metylacji DNA oraz selekcję pojedynczych homozygotycznych mutantów.

- Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., Gaj, M.D. 2018. Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation* 85, 243-256.  
IF<sup>1</sup> 2.5<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 30<sup>2a</sup>, 70<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 74<sup>3a</sup>, 84<sup>3b</sup>

### **Analiza funkcjonalna genu *LEAFY COTYLEDON 2* podczas procesu somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*.**

Podczas doktoratu badałam rolę genu *LEC2* w procesie SE. Uzyskane w pracy dane potwierdziły, że aktywność genu *LEC2* jest stymulowana egzogenną auksyną oraz specyficzna dla procesu SE. Wykazano bowiem, że podczas alternatywnych do SE szlaków morfogenetycznych indukowanych w kulturze *in vitro* IZE, w tym podczas organogenezy pędów oraz rozwoju siewek, dochodzi do wyciszenia ekspresji genu *LEC2* (Kraut i in., 2011, P19). Na podstawie tych obserwacji zarekomendowano system kultury *in vitro* eksplantatów IZE *Arabidopsis* na różnych pożywkach do identyfikacji mechanizmu genetycznego specyficznego dla indukcji SE.

Biorąc pod uwagę opisane w procesie zygotycznej embriogenezy związki *LEC2* z metabolizmem i sygnalizacją hormonów przeprowadzono, w odpowiedzi na nadekspresję genu *LEC2*, analizę poziomu czterech podstawowych grup hormonów: IAA, cytokinin (CK), kwasu salicylowego i kwasu abscysynowego. Wykazaliśmy, że nadekspresja *LEC2* skutkuje istotnymi zmianami w poziomie analizowanych hormonów w siewkach oraz eksplantatach IZE indukowanych na pożywce auksynowej (Wójcikowska i Gaj, 2015, P16). Stwierdzono, że akumulacji IAA w tkankach z nadekspresją *LEC2* towarzyszy wzrost poziomu SA i istotny spadek zawartości ABA oraz większości z dziesięciu badanych typów CK. Wyniki te wskazują na szerokie przemiany hormonalne zachodzące w tkankach pod wpływem aktywacji *LEC2* i towarzyszące indukcji SE. Dodatkowo, badania wskazują, że także poziom etylenu wydaje się być pod kontrolą *LEC2* podczas indukcji SE. Wykazano bowiem, że negatywny regulator poziomu etylenu, czynnik transkrypcyjny ERF022, jest podczas indukcji SE kontrolowany przez *LEC2*, jednak natura tej interakcji pozostaje do zbadania (Nowak i in., 2015, P18). Podsumowując tę część badań wykazano, że indukcji SE towarzyszą istotne, *LEC2*-zależne zmiany w poziomie endogennych hormonów jednak mechanizm tych interakcji i uczestniczące w nich elementy genetyczne pozostają do określenia. W badaniach objętych pracą skupiono się

także na określeniu mechanizmu działania LEC2 podczas indukcji SE w powiązaniu z auksyną. W zgodzie z wykazanim pozytywnym związkiem aktywności LEC2 z akumulacją endogennej auksyny stwierdzono, że nadekspresja genu *LEC2* prowadzi do indukcji SE na pożywce bezauksynowej. Z kolei wywołanie nadekspresji tego genu w kulturze IZE na pożywce auksynowej skutkuje zahamowaniem SE i produkcją kalusa, w wyniku zbyt wysokiego poziomu akumulacji auksyny (Wójcikowska i in., 2013, P17). Obserwowana akumulacja endogennej IAA przy nadekspresji genu *LEC2* stała się podstawą do postawienia hipotezy o kontroli przez ten gen biosyntezy auksyny jako mechanizmu promującego indukcję SE. Dane mikromacierzowe dotyczące genów docelowych dla LEC2 w siewkach sugerowały związek regulatorowy z genami *YUC1-11*. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy wskazały, że podczas indukcji SE LEC2 aktywuje ekspresję trzech, spośród jedenastu, genów *YUC* (*YUC1*, *YUC4*, *YUC10*) (Wójcikowska i in., 2013, P17). Ponadto, stwierdzono obniżony potencjał embriogeniczny w kulturze mutantów *yucca* - *yuc2* oraz *yuc4*. W zgodzie z tym wynikami, ostatnie analizy przy użyciu linii reporterowych potwierdziły ekspresję genów *YUC* w rejonach eksplantatu uczestniczących w procesie SE. Podsumowując, opisane w doktoracie wyniki dowodzą, że jednym z mechanizmów wyzwalających odpowiedź embriogeniczną w komórkach somatycznych *Arabidopsis thaliana* jest YUC-zależny i kontrolowany przez LEC2 szlak biosyntezy auksyny.

- Wójcikowska, B.<sup>\*✉</sup>, Gaj, M.D. 2015. LEAFY COTYLEDON2-mediated control of the endogenous hormone content: implications for the induction of Somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121, 255-258.  
IF<sup>1</sup> 2.4<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 40<sup>2a</sup>, 100<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 18<sup>3a</sup>, 32<sup>3b</sup>
- Nowak, K., Wójcikowska, B., Gaj, M.D. 2015. ERF022 controls the induction of SE in *Arabidopsis* through the ethylene-related pathway. *Planta*, 241, 967-985.  
IF<sup>1</sup> 3.2<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 30<sup>2a</sup>, 100<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 64<sup>3a</sup>, 79<sup>3b</sup>
- Wójcikowska, B.<sup>\*</sup>, Jaskóła, K., Meus, M., Gąsiorek, P., Nowak, K., Gaj, M.D. 2013. LEAFY COTYLEDON2 (*LEC2*) promotes embryogenic induction in somatic tissue of *Arabidopsis* via *YUCCA*-mediated auxin biosynthesis. *Planta* 238, 425-440.  
IF<sup>1</sup> 3.4<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 40<sup>2a</sup>, 100<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 135<sup>3a</sup>, 190<sup>3b</sup>
- Kraut, M., Wójcikowska, B., Ledwoń, A., Gaj, M.D. 2011. Immature zygotic embryo cultures of *Arabidopsis*. A model system for molecular studies on morphogenic pathways induced *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 53, 59-67.  
IF<sup>1</sup> 0.61<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 0<sup>2a</sup>, 70<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 10<sup>3a</sup>, 19<sup>3b</sup>

**Synteza wiedzy o systemach indukcji SE u *Arabidopsis thaliana*, opracowanie systemu identyfikacji zarodków somatycznych z prawidłowo wykształconymi merystemami biegunowymi tzw. prawdziwych zarodków, oraz oszacowanie skuteczności różnych systemów indukcji SE w ich formowaniu.**

Proces somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana* może być indukowany z wykorzystaniem chemicznych induktorów *in vitro*, ale zachodzi także spontaniczne *in planta*, pod wpływem nadekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, tj. *LEC1*, *LEC2*, *BBM*, *AGL15*, *WUS*, *WOX*, *MYB115/118* (Wójcikowska i Gaj 2016, P14). W analizach wykorzystaliśmy cztery systemy indukcji SE *in vitro* (dwa bezpośrednio z różnymi stężeniami 2,4-D oraz dwa pośrednie z użyciem kombinacji roślinnych regulatorów wzrostu) oraz jeden *in planta* z użyciem linii p35S::*LEC2-GR*. Badania wykazały, że analizowane systemy indukcji procesu SE charakteryzują się zróżnicowaną wydajnością embriogeniczną w zakresie formowania zarodków z prawidłowo wykształconymi merystemami. Do oszacowywania efektywności formowania prawdziwych zarodków użyto linii reporterowej pDR5::*GUS*, identyfikującej tzw. maksima auksyny, a zatem merystemy apikalne. Najwyższy odsetek prawdziwych zarodków (75%) stwierdzono wśród struktur zarodko-podobnych formowanych podczas nadekspresji genu *LEC2* w siewkach. Analiza systemów indukcji SE *in vitro* wykazała, że w zarodkach somatycznych powstających w odpowiedzi na egzogenne traktowanie auksyną często dochodzi do zaburzeń w formowaniu bieguna korzeniowego. Brak prawidłowo uformowanego merystemu korzeniowego obserwowano u 35–80% zarodków somatycznych indukowanych *in vitro*, w zależności od stężenia auksyny i czasu jej aplikacji. Mój udział w prezentowanej publikacji (Nowak i in., 2012, P18) obejmował współudział w analizie zdolności do procesu somatycznej embriogenezy w badanych systemach indukcji oraz badaniu linii pDR5::*GUS* służącej do oszacowania zarodków z wykształconym apikalnym i bazalnym biegunem.

- Nowak, K., Wójcikowska, B., Szyrajew, K., Gaj, M.D. 2012. Evaluation of different embryogenic systems for production of true somatic embryos in *Arabidopsis*. *Biologia Plantarum*, 56, 401-408.

IF<sup>1</sup> 1.7<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 10<sup>2a</sup>, 70<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 6<sup>3a</sup>, 12<sup>3b</sup>

- Wójcikowska, B.\*, Gaj, M.D. 2016. Somatic embryogenesis in *Arabidopsis*, in “Somatic embryogenesis. fundamental aspects and applications”, (Loyola Vargas V.M. and Ochoa-Alejo N., eds.). Springer, Switzerland, pp. 185 -199.

IF<sup>1</sup> 1.7<sup>1</sup>; MNiSW<sup>2</sup>: 5<sup>2a</sup>, 5<sup>2b</sup>; Cytowania<sup>3</sup>: 11<sup>3a</sup>, 25<sup>3b</sup>

**PLANY BADAWCZE**

Moje najbliższe plany badawcze skupiają się na czterech kluczowych zagadnieniach:

**Zbudowanie sieci regulacyjnej MP/ARF5 oraz MP11ir podczas tranzykcji embriogenicznej.**

W najbliższym czasie wraz z zagranicznymi partnerami planujemy zidentyfikować geny pozostające pod bezpośrednią kontrolą izoformy MP11ir oraz kanonicznego białka MP/ARF5 w procesie tranzykcji embriogenicznej. Z wykorzystaniem metody greenCUT&RUN zostaną przeanalizowane miejsca wiązania DNA przez izoformę MP11ir oraz kanoniczne białko MP/ARF5, dzięki temu zidentyfikowane zostaną promotory genów, do których przyłączają się MP11ir i MP/ARF5. Analiza zostanie przeprowadzona w 5. dniu indukcji embriogenicznej zależnej od auksyny (EA) oraz w 5. dniu kontrolnej kultury nieembriogenicznej (E0), przy użyciu linii reporterowych pMP::MP11ir-GFP (MR) *mpS319* oraz pMP::MP-GFP *mpS319*. Doprowadzi to do stworzenia listy promotorów, do których wiąże się (i) wyłącznie MP11ir, (ii) wyłącznie MP, oraz (iii) zarówno MP11ir, jak i MP. Listy bezpośrednich genów docelowych MP11ir i MP/ARF5 zostaną porównane z dostępnymi danymi transkryptomycznymi podczas procesu SE u *Arabidopsis thaliana* u ekotypu kontrolnego Col-0 (Wójcikowska i in., 2024, H3, P4) oraz u mutantu *mpS319*, linii p35S::bdl-GR, pXVE::ΔARF5 pDR5::GFP, pMP::MP, pMP::MP11ir, pMP::MP x pMP::MP11ir (Wójcikowska i in., w przygotowaniu). Dane uzyskane metodą greenCUT&RUN i RNA-seq zostaną zintegrowane w celu identyfikacji genów do promotorów których, bezpośrednio wiążą się MP/ARF5 i/lub MP11ir oraz ulegających zróżnicowanej ekspresji w trakcie procesu SE, zatem te geny, które są kontrolowane przez MP11ir lub MP/ARF5 i jednocześnie kluczowe dla przejścia embriogenicznego. Pozwoli to na budowę potencjalnej sieci zależności między MP11ir, MP/ARF5, a genami o zróżnicowanej ekspresji w procesie SE, a także na identyfikację nowych genów pełniących kluczową rolę w nadawaniu plastyczności rozwojowej roślin. Spośród genów bezpośrednio regulowanych przez MP11ir, MP/ARF5 i zaangażowanych w proces SE zostanie wybranych kilkanaście genów do dalszej analizy funkcjonalnej obejmującej ocenę zdolności mutantów, linii z indukowaną nadekspresją do procesu somatycznej embriogenezy, a także analizę transkrypcyjnych i translacyjnych linii reporterowych. Dodatkowo planujemy opracowanie narzędzia molekularnego do równoczesnego monitorowania izoformy MP11ir i białka kanonicznego MP/ARF5 w komórkach roślinnych.

**Określenie wpływu orientacji eksplantatów na transkryptom podczas indukcji SE.**

Prowadzone do tej pory przeze mnie badania doprowadziły do potwierdzenia, że ten sam eksplantat (liścień) ułożony stroną adaksjalną lub abaksjalną do pożywki indukcyjnej (EA lub ET) daje zupełnie inną odpowiedź embriogeniczną, wskazując, że polarność tkanki odgrywa fundamentalną rolę w tranzycji embriogenicznej (Wójcikowska i in., 2024, H3, P4). By zrozumieć obserwowaną reakcję planuję przeanalizować transkryptom eksplantatów różnie zorientowanych na podłożu, o przeciwstawnych reakcjach embriogenicznych, które wydają się być doskonałym modelem badawczym zmierzającym do identyfikacji SE-zaangażowanych genów.

**Zbadanie roli kwasu fenylooctowego, fenyloacetonitrylu oraz NITRYLAZ w procesie SE.**

Podrodzina genów *NITRILASE 1* składająca się z trzech członków: *NIT1–NIT3* wyewoluowała poprzez duplikację genu *NIT4*. Przeprowadzone przez nas badania wskazują na udział *NIT1–NIT3* w procesie SE (Wójcikowska i in., 2024, H3, P4), chociaż mechanizm ich działania podczas przejścia embriogennego pozostaje nieznan. Dane literaturowe sugerują, że *NIT1–NIT3* biorą udział w biosyntezie IAA i potencjalnie kwasu fenylooctowego (PAA). Jednak mutanty *nit* nie wykazują znaczących różnic w zawartości IAA, co prowadzi do hipotezy, że enzymy NIT mogą brać potencjalny udział w syntezie PAA. PAA jest syntetyzowany z prekursora fenyloalaniny poprzez zależną od CYP79A2 ścieżkę fenyloacetaldoxymu, który jest następnie przekształcany w fenyloacetonitryl/cyjanek benzylu (PAN/BnCN) lub fenyloacetamid. PAN/BnCN służy jako substrat dla enzymów *NIT1–NIT3*, które potencjalnie mogą przekształcać go w PAA. Przeprowadzone przez nas badania wstępne wykazały, że traktowanie eksplantatów PAA, jak i substratem *NIT1–3* PAN/BnCN indukuje proces SE w niskich stężeniach, a analiza transkryptomu sugeruje, że traktowanie PAN/BnCN aktywuje szereg genów o potwierdzonej i udokumentowanej roli w procesie SE, w tym główne regulatory SE (Falińska i in., w przygotowaniu). Dodatkowo, zwiększoną odpowiedź auksynową po traktowaniu PAN/BnCN potwierdzono za pomocą linii reporterowych pDR5::GUS. Hamowanie aktywności *NIT1–3* przez inhibitor heatin, negatywnie wpływa na zdolność eksplantatów do tranzycji embriogenicznej. Nasze obserwacje sugerują, że rola *NIT1–3* w procesie SE może być potencjalnie związana z ich funkcją w biosyntezie PAA.

**Analiza wpływu wariantów histonowych na zdolność do procesu somatycznej embriogenezy.**

W dalszej perspektywie planuję kontynuować zagadnienia związane z epigenetyczną kontrolą tranzykcji embriogenicznej. Moim naukowym celem jest dążenie do zrozumienia dlaczego jedne komórki, tkanki, organy – odpowiadają w kulturze *in vitro*, a inne nie. Chciałabym, zrozumieć i wyjaśnić, pewien znany fenomen związany z kulturami *in vitro* – im młodsza tkanka roślinna, tym lepiej odpowiada w kulturze *in vitro*. Móc odpowiedzieć na proste pytanie: dlaczego? Czy odpowiedź embriogeniczna młodych tkanek może mieć związek z dużą aktywnością podziałową komórek, z deponowaniem specyficznych wariantów histonowych i znaczników epigenetycznych? Wstępne badania transkryptomyczne wskazały na zróżnicowaną ekspresję genów kodujących specyficzne białka histonowe jak H1.2, H2.A.Z, H3.3-like – które w komórkach zwierzęcych mają potwierdzoną rolę w procesach embriogenicznych [107, 108].

**Spis literatury:**

- [1] Huang B, Yeoman M. Formation of somatic embryos in tissue cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Arab Inf Serv*. 1983;20:73-7.
- [2] Belova K, Dushina E, Popov S, Zlobin A, Martinson E, Vityazev F, et al. Enrichment of 3D-printed kappa-carrageenan food gel with callus tissue of narrow-leaved lupin *Lupinus angustifolius*. *Gels*. 2023;9:45.
- [3] Ochoa-Alejo N. The uses of somatic embryogenesis for genetic transformation. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*: Springer; 2016. p. 415-34.
- [4] Olomola D, Aguda S, Olorode E, Oyediran R, Adekunle E. The application of biotechnology in biodiversity conservation. *Intl J Adv Acad Res Sci Technol Eng*. 2019;5:55-63.
- [5] Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019;51:11-7.
- [6] Tresas T, Isaoglou I, Roussis A, Haralampidis K. A Brief Overview of the Epigenetic Regulatory Mechanisms in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26:4700.
- [7] Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013;20:259-66.
- [8] Shen Y, Wei W, Zhou D-X. Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends in Plant Science*. 2015;20:614-21.
- [9] Wang L, Wang M, Guo H, Zhao H. Emerging Role of Garcinol in Targeting Cancer Stem Cells of Non-small Cell Lung Cancer. *Current Pharmacology Reports*. 2019;5:14-9.
- [10] Shanmugam G, Rakshit S, Sarkar K. HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. *Translational Oncology*. 2022;16:101312.
- [11] Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*. 1995;17:423-30.
- [12] Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 1999;401:188-93.
- [13] Venturelli S, Belz RG, Kämper A, Berger A, von Horn K, Wegner A, et al. Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors. *The Plant Cell*. 2015;27:3175-89.
- [14] Mengel A, Ageeva A, Georgii E, Bernhardt J, Wu K, Durner J, et al. Nitric oxide modulates histone acetylation at stress genes by inhibition of histone deacetylases. *Plant Physiology*. 2017;173:1434-52.
- [15] Kurita K, Sakamoto T, Yagi N, Sakamoto Y, Ito A, Nishino N, et al. Live imaging of H3K9 acetylation in plant cells. *Scientific Reports*. 2017;7:45894.
- [16] Qiu X, You H, Xiao X, Li N, Li Y. Effects of Trichostatin A and PXD101 on the In Vitro Development of Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell Reprogram*. 2017;19:1-9.
- [17] Al-Ghadi MQ, Alhimaidi AR, Iwamoto D, Al-Mutary MG, Ammari AA, Saeki KO, et al. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with scriptaid and trichostatin (A). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27:2280-6.

- [18] Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2018;172:881-7. e7.
- [19] Choi SH, Lee MH, Jin DM, Ju SJ, Ahn WS, Jie EY, et al. TSA Promotes CRISPR/Cas9 Editing Efficiency and Expression of Cell Division-Related Genes from Plant Protoplasts. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
- [20] Wickramasuriya AM, Dunwell JM. Global scale transcriptome analysis of Arabidopsis embryogenesis in vitro. *BMC Genomics*. 2015;16:301.
- [21] Rodríguez-Sanz H, Moreno-Romero J, Solís M-T, Köhler C, Risueño MC, Testillano PS. Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in *Brassica napus*. *Cytogenetic and Genome Research*. 2014;143:209-18.
- [22] Yakovlev IA, Carneros E, Lee Y, Olsen JE, Fossdal CG. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta*. 2016;243:1237-49.
- [23] Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H. The Arabidopsis histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant physiology*. 2008;146:149-61.
- [24] Zhou Y, Tan B, Luo M, Li Y, Liu C, Chen C, et al. HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*. 2013;25:134-48.
- [25] Chhun T, Chong SY, Park BS, Wong ECC, Yin J-L, Kim M, et al. HSI2 repressor recruits MED13 and HDA6 to down-regulate seed maturation gene expression directly during Arabidopsis early seedling growth. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57:1689-706.
- [26] Horstman A, Bemer M, Boutilier K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration (Oxf)*. 2017;4:201-16.
- [27] Williams L, Zhao J, Morozova N, Li Y, Avivi Y, Grafi G. Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2003;228:113-20.
- [28] Görisch SM, Wachsmuth M, Tóth KF, Lichter P, Rippe K. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of cell science*. 2005;118:5825-34.
- [29] Uddenberg D, Valladares S, Abrahamsson M, Sundström JF, Sundås-Larsson A, von Arnold S. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta*. 2011;234:527-39.
- [30] Abrahamsson M, Valladares S, Merino I, Larsson E, von Arnold S. Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2017;53:86-96.
- [31] Martínez Ó, Arjones V, González MV, Rey M. Histone Deacetylase Inhibitors Increase the Embryogenic Potential and Alter the Expression of Embryogenesis-Related and HDAC-Encoding Genes in Grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Mencía). *Plants (Basel)*. 2021;10.
- [32] Awada R, Verdier D, Froger S, Brulard E, de Faria Maraschin S, Etienne H, et al. An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Sci Rep*. 2020;10:810.
- [33] Li H, Soriano M, Cordewener J, Muiño JM, Riksen T, Fukuoka H, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell*. 2014;26:195-209.
- [34] Castillo AM, Valero-Rubira I, Burrell MÁ, Allué S, Costar MA, Vallés MP. Trichostatin A affects developmental reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic route. *Plants*. 2020;9:1442.
- [35] Jiang F, Ryabova D, Diedhiou J, Hucl P, Randhawa H, Marillia E-F, et al. Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant cell reports*. 2017;36:1701-6.
- [36] Bie XM, Dong L, Li XH, Wang H, Gao X-Q, Li XG. Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. *Plant Signaling & Behavior*. 2020;15:1820681.
- [37] Liu C, Song G, Zhao Y, Fang B, Liu Z, Ren J, et al. Trichostatin A Induced Microspore Embryogenesis and Promoted Plantlet Regeneration in Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Horticulturae*2022. p. 790.
- [38] Park SH, Jeong YJ, Kim S, Lee J, Kim CY, Jeong JC. Trichostatin A promotes de novo shoot regeneration from Arabidopsis root explants via a cytokinin related pathway. *Scientific Reports*. 2025;15:978.
- [39] Pan Q, Huang R, Xiao Q, Wu X, Jian B, Xiang Y, et al. Inhibition of histone deacetylase in Arabidopsis root calli promotes de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 2025;Volume 15 - 2024.
- [40] Lee K, Park O-S, Jung S-J, Seo PJ. Histone deacetylation-mediated cellular dedifferentiation in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*. 2016;191:95-100.
- [41] Zhang H, Guo F, Qi P, Huang Y, Xie Y, Xu L, et al. OshDA710-Mediated Histone Deacetylation Regulates Callus Formation of Rice Mature Embryo. *Plant and Cell Physiology*. 2020;61:1646-60.
- [42] Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics*. 2009;2009:835608.

- [43] Simon S, Petrášek J. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*. 2011;180:454-60.
- [44] Vanneste S, Pei Y, Friml J. Mechanisms of auxin action in plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2025;26:648-66.
- [45] Shiu S-H, Lehti-Shiu MD. Assessing the evolution of research topics in a biological field using plant science as an example. *PLOS Biology*. 2024;22:e3002612.
- [46] Prusinska J, Uzunova V, Schmitzer P, Weimer M, Bell J, Napier RM. The differential binding and biological efficacy of auxin herbicides. *Pest Management Science*. 2023;79:1305-15.
- [47] Petrášek J, Zažímalová E. The BY-2 Cell Line as a Tool to Study Auxin Transport. In: Nagata T, Matsuoka K, Inzé D, editors. *Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 107-17.
- [48] Stasolla C, Bozhkov PV, Chu TM, Van Zyl L, Egertsdotter U, Suarez MF, et al. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol*. 2004;24:1073-85.
- [49] van Zyl L, Bozhkov PV, Clapham DH, Sederoff RR, von Arnold S. Up, down and up again is a signature global gene expression pattern at the beginning of gymnosperm embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2003;3:83-91.
- [50] Sharma SK, Millam S, Hedley PE, McNicol J, Bryan GJ. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Mol Biol*. 2008;68:185-201.
- [51] Li H-Z, Wu H, Song K-K, Zhao H-H, Tang X-Y, Zhang X-H, et al. Transcriptome analysis revealed enrichment pathways and regulation of gene expression associated with somatic embryogenesis in *Camellia sinensis*. *Scientific Reports*. 2023;13:15946.
- [52] Wang Y, Li H-L, Zhou Y-K, Guo D, Zhu J-H, Peng S-Q. Transcriptomes analysis reveals novel insight into the molecular mechanisms of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *BMC genomics*. 2021;22:183.
- [53] Wu G, Wei X, Wang X, Wei Y. Changes and transcriptome regulation of endogenous hormones during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain. *Front Plant Sci*. 2023;14:1121259.
- [54] Grzyb M, Kalandyk A, Waligórski P, Miłkowska A. The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2017;129:387-97.
- [55] Jiménez VM, Bangerth F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol Plant*. 2001;111:389-95.
- [56] Karami O, Philipsen C, Rahimi A, Nurillah AR, Boutilier K, Offringa R. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2023;113:7-22.
- [57] Wójcik AM, Nodine MD, Gaj MD. miR160 and miR166/165 Contribute to the LEC2-Mediated Auxin Response Involved in the Somatic Embryogenesis Induction in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*. 2017;8:2024.
- [58] Karami O, de Jong H, Somovilla VJ, Villanueva Acosta B, Sugiarta AB, Ham M, et al. Structure-activity relationship of 2,4-D correlates auxinic activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2023.
- [59] Ribnicky DM, Ilic N, Cohen JD, Cooke TJ. The Effects of Exogenous Auxins on Endogenous Indole-3-Acetic Acid Metabolism (The Implications for Carrot Somatic Embryogenesis). *Plant Physiol*. 1996;112:549-58.
- [60] Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 2007;446:640-5.
- [61] Calderón Villalobos LIA, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, et al. A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature chemical biology*. 2012;8:477-85.
- [62] Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*. 1996;198:532-41.
- [63] Schulz L, Ung KL, Zuzic L, Koutnik-Abele S, Schiøtt B, Stokes DL, et al. Transport of phenoxyacetic acid herbicides by PIN-FORMED auxin transporters. *Nature Plants*. 2025;11:1049-59.
- [64] Michalczyk L, Cooke TJ, Cohen JD. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry*. 1992;31:1097-103.
- [65] Charrière F, Sotta B, Miginiac É, Hahne G. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1999;37:751-7.
- [66] Karami O, Saidi A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep*. 2010;37:2493-507.
- [67] Loschiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*. 1989;77:325-31.

- [68] Fraga HP, Vieira LN, Caprestano CA, Steinmacher DA, Micke GA, Spudeit DA, et al. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep.* 2012;31:2165-76.
- [69] Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep.* 2004;23:120-7.
- [70] Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, et al. New insights into somatic embryogenesis: leafy cotyledon1, baby boom1 and WUSCHEL-related homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One.* 2013;8:e72160.
- [71] Osorio-Montalvo P, Sáenz-Carbonell L, De-la-Peña C. 5-Azacytidine: A Promoter of Epigenetic Changes in the Quest to Improve Plant Somatic Embryogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
- [72] Xiao W, Custard KD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, et al. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell.* 2006;18:805-14.
- [73] Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant physiology.* 2002;129:1807-19.
- [74] Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology.* 2010;13:12-3.
- [75] Karami O, de Jong H, Somovilla VJ, Villanueva Acosta B, Sugiarta AB, Ham M, et al. Structure–activity relationship of 2,4-D correlates auxinic activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* 2023;116:1355-69.
- [76] Teale WD, Paponov IA, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2006;7:847-59.
- [77] Martin-Arevalillo R, Thévenon E, Jégu F, Vinos-Poyo T, Vernoux T, Parcy F, et al. Evolution of the Auxin Response Factors from charophyte ancestors. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008400.
- [78] Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Hagen G. The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:619-27.
- [79] Boer DR, Freire-Rios A, van den Berg WA, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, et al. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell.* 2014;156:577-89.
- [80] Cancé C, Martin-Arevalillo R, Boubekour K, Dumas R. Auxin response factors are keys to the many auxin doors. *New Phytol.* 2022;235:402-19.
- [81] Guilfoyle TJ, Hagen G. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol.* 2007;10:453-60.
- [82] Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell.* 2001;13:2809-22.
- [83] Guilfoyle TJ. The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell.* 2015;27:33-43.
- [84] Kurczyńska EU, Gaj MD, Ujczak A, Mazur E. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta.* 2007;226:619-28.
- [85] Odat O, Gardiner J, Sawchuk MG, Verna C, Donner TJ, Scarpella E. Characterization of an allelic series in the MONOPTEROS gene of *Arabidopsis*. *Genesis.* 2014;52:127-33.
- [86] Hardtke CS, Kukurshumova W, Vidaurre DP, Singh SA, Stamatiou G, Tiwari SB, et al. Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development.* 2004;131:1089-100.
- [87] Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J, Wójcik AM, Nowak K, Szczygieł-Sommer A, et al. MicroRNAs Are Intensively Regulated during Induction of Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2017;8:18.
- [88] Weijers D, Wagner D. Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annu Rev Plant Biol.* 2016;67:539-74.
- [89] Xie M, Huang L, Song L, O'Neil R, Lewsey M, Chen H, et al. Defining in vivo transcriptional responses to auxin. *Research Square;* 2022.
- [90] O'Malley RC, Huang SC, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, et al. Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell.* 2016;165:1280-92.
- [91] Freire-Rios A, Tanaka K, Crespo I, van der Wijk E, Sizentsova Y, Levitsky V, et al. Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:24557-66.
- [92] Long JA, Ohno C, Smith ZR, Meyerowitz EM. TOPLESS Regulates Apical Embryonic Fate in *Arabidopsis*. *Science.* 2006;312:1520-3.
- [93] Chen H, Qi L, Zou M, Lu M, Kwiatkowski M, Pei Y, et al. TIR1-produced cAMP as a second messenger in transcriptional auxin signalling. *Nature.* 2025;640:1011-6.
- [94] Weiste C, Dröge-Laser W. The *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery. *Nat Commun.* 2014;5:3883.

- [95] Wu MF, Yamaguchi N, Xiao J, Bargmann B, Estelle M, Sang Y, et al. Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *Elife*. 2015;4:e09269.
- [96] Korasick DA, Westfall CS, Lee SG, Nanao MH, Dumas R, Hagen G, et al. Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:5427-32.
- [97] Powers SK, Holehouse AS, Korasick DA, Schreiber KH, Clark NM, Jing H, et al. Nucleo-cytoplasmic Partitioning of ARF Proteins Controls Auxin Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*. 2019;76:177-90.e5.
- [98] Nanao MH, Vinos-Poyo T, Brunoud G, Thévenon E, Mazzoleni M, Mast D, et al. Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat Commun*. 2014;5:3617.
- [99] Przemeck GK, Mattsson J, Hardtke CS, Sung ZR, Berleth T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta*. 1996;200:229-37.
- [100] Cucinotta M, Cavalleri A, Guazzotti A, Astori C, Manrique S, Bombarely A, et al. Alternative Splicing Generates a MONOPTEROS Isoform Required for Ovule Development. *Curr Biol*. 2021;31:892-9.e3.
- [101] Cavalleri A, Astori C, Truskina J, Cucinotta M, Farcot E, Chrysanthou E, et al. Auxin-dependent post-translational regulation of MONOPTEROS in the *Arabidopsis* root. *Cell Rep*. 2024;43:115083.
- [102] Schulz B, Segobye K. 2, 4-D transport and herbicide resistance in weeds. *Journal of experimental botany*. 2016;67:3177-9.
- [103] Tsugafune S, Mashiguchi K, Fukui K, Takebayashi Y, Nishimura T, Sakai T, et al. Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Scientific Reports*. 2017;7:13992.
- [104] Li M, Wrobel-Marek J, Heidmann I, Horstman A, Chen B, Reis R, et al. Auxin biosynthesis maintains embryo identity and growth during BABY BOOM-induced somatic embryogenesis. *Plant Physiol*. 2022;188:1095-110.
- [105] Bai B, Su YH, Yuan J, Zhang XS. Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local YUCCA expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. *Mol Plant*. 2013;6:1247-60.
- [106] González-García MP, Sáez A, Lanza M, Hoyos P, Bustillo-Avendaño E, Pacios LF, et al. Synthetically derived BiAux modulates auxin co-receptor activity to stimulate lateral root formation. *Plant Physiology*. 2024;195:1694-711.
- [107] Liu M, Yue Y, Chen X, Xian K, Dong C, Shi M, et al. Genome-coverage single-cell histone modifications for embryo lineage tracing. *Nature*. 2025;640:828-39.
- [108] Turinetto V, Giachino C. Histone variants as emerging regulators of embryonic stem cell identity. *Epigenetics*. 2015;10:563-73.

## **5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.**

Ważnym elementem mojej działalności naukowej jest współpraca z zagranicznymi i krajowymi ośrodkami naukowymi, czego efektem są liczne publikacje. Należy podkreślić, że pięć z ośmiu publikacji wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia zostało przygotowanych we współpracy z różnymi instytucjami naukowymi.

Aktywność naukowa:

### **1. Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University (MU), Brno, Republika Czeska**

Nawiązałam współpracę z Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University (MU), Brno, Republika Czeska, w 2015 roku, kiedy to za zgodą Jiri Fimla i pod opieką Hélène Robert Boisivon odbyłam trzymiesięczny staż (05.01.2015-31.03.2015) w ramach projektu pt. „Zwiększenie udziału osób dorosłych w kształceniu w zakresie narzędzi

informatycznych i technologii - NITKA” zadanie nr 9 „Staże i szkolenia w wiodących zagranicznych i krajowych ośrodkach akademickich i naukowo-badawczych” w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, realizowanego w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Podczas stażu uczestniczyłam w projekcie naukowym, "Unravelling the regulation of the local auxin production in Arabidopsis: a trigger for embryo patterning" (SOMOPRO COFUND MSCA to HSR, 2014-2016). W trakcie stażu zdobyłam doświadczenie w technikach służących do analizy lokalnej biosyntezy auksyn i polarnego transportu auksyn w roślinach oraz pozyskałam materiał do dalszych badań w jednostce macierzystej. Efektem tej współpracy poza poszerzeniem wiedzy oraz doświadczenia, jest wspólna publikacja (**Robert i in., 2018, P11**) opublikowana na łamach prestiżowego czasopisma Nature Plants.

W wyniku nawiązanej współpracy w 2015 roku, możliwe było odbycie wizyty studyjnej w roku 2017 w grupie Tomasza Nodzyńskiego (24-25.04.2017) oraz wykorzystanie zaplecza naukowego CEITEC, MU, Brno, do przeprowadzenia analiz linii reporterowych przy użyciu mikroskopów konfokalnych. W trakcie wizyty studyjnej dokonano analizy czasowo-przestrzennej genów *YUCCA* podczas procesu somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis thaliana*, indukowanej trichostatyną A - wskazując na zaangażowanie procesu acetylacji histonów w regulację biosyntezy auksyny i plastyczność rozwojową roślin. Analizy te pozwoliły na opublikowanie wspólnej pracy (**Wójcikowska i in., 2018, H2, P10**) na łamach czasopisma Frontiers in Plant Science.

W roku 2021 zostałam zaproszona do wygłoszenia wykładu „The power of auxin: a molecular mechanism that governs somatic embryogenesis in Arabidopsis” w ramach Mendel Centre Semester Spring 2021-VIRTUAL, CEITEC, MU, Brno, Czechy (18.05.2021) dla społeczności akademickiej.

Następnie w latach: 2021 (27.04.2021) oraz 2022 (15.12.2022) wspólnie z Hélène Robert Boisivon, złożyłyśmy w Narodowym Centrum Nauki wnioski grantowe Weave-UNISONO, które nie otrzymały finansowania. Przy wsparciu Hélène Robert Boisivon złożyłam i otrzymałam w roku 2022 finansowanie na odbycie rocznego, podoktorskiego stażu w CEITEC, MU, Brno, Czechy, (01.02.2022 - 01.03.2023), w ramach programu im. Mieczysława Bekkera; Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej (NAWA) (BPN/BEK/2021/1/00278). Podczas stażu prowadziłam badania związane z poznaniem roli czynnika transkrypcyjnego MP/ARF5 w procesie SE. Badania z jednej strony, skupiały się na poznaniu roli izoformy czynnika transkrypcyjnego o nazwie MP11ir w tranzycji embriogenicznej poprzez kontrolę ekspresji genów związanych z syntezą auksyny, a z drugiej na weryfikacji hipotezy o ARF5/MP-zależnej ekspresji genów *MIR390A* i *B*. Badania nad

izoformą MP11ir pozwoliły na zgromadzenie wyników wstępnych, które zostały użyte we wniosku grantowym OPUS LAP 26 „Nieznane oblicze sygnalizacji auksynowej - izoforma MONOPTEROS MP11ir i jej rola w niezależnej od auksyny regulacji ekspresji genów podczas procesu somatycznej embriogenezy”, który otrzymał finansowanie NCN na łączną kwotę 2 600 000.00 PLN i jest w trakcie realizacji (02.01.2025 - 01.01.2028). Podczas stażu sprawowałam tutoring doktoratki Samii Belaidi oraz zostałam powołana przez szkołę doktorską CEITEC, MU, Brno, do pełnienia funkcji członka komisji Thesis Advisory Committee (TAC) weryfikującej postępy realizacji pracy doktorskiej studentki Samii Belaidi. Pokłosiem stażu podoktorskiego było opublikowanie dwóch publikacji: przeglądowej na łamach czasopisma *Journal of Experimental Botany* (**Wójcikowska i in., 2023, H7, P6**) oraz eksperymentalnej w *Plant Physiology* (**Wójcikowska i in., 2025, H8, P2**). Badania nad genami *MIR390A* i *B* (generowanie podwójnego mutanta *mir390a mir390b* z wykorzystaniem techniki CRISPR-Cas; analiza ekspresji *MIR390A, B* oraz poziomu dojrzałej cząsteczki miR390 w liniach z różnym poziomem ARF5/MP z użyciem qPCR, linii reporterowych oraz techniki WISH) ich ARF5/MP-zależnej ekspresji są w trakcie realizacji i w najbliższym czasie zostaną opracowane i wysłane do recenzji, będą także podstawą rozprawy doktorskiej studentki Samii Belaidi.

Podczas trwania stażu podoktorskiego wzięłam udział w dwóch konferencjach naukowych. Pierwsza z nich, międzynarodowa, renomowana, konferencja poświęcona auksynie: tj. AUXIN 2022, 2-7 październik 2022, Cavtat, Chorwacja. MONOPTEROS isoform MP11ir transcript is present during auxin-induced somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. W trakcie prezentacji posteru możliwe było nawiązanie, znajomości, dialogu, a także przedyskutowanie otrzymanych wyników z czołowymi naukowcami zajmującymi się zagadnieniami syntezy, transportu, czy też sygnalizacji auksynowej. Uczestnictwo w ww. konferencji oraz możliwość wysłuchania prezentacji światowej sławy naukowców bez wątplenia poszerzyło moją wiedzę, a także stało się inspiracją do dalszych badań. Z kolei uczestnictwo w konferencji The 3rd Annual CEITEC Postdoc Retreat, w ramach International Postdoc Appreciation Week 22-23 wrzesień 2022, Brno, Czechy oraz wygłoszenie referatu “The power of auxin - an investigation of the basic auxin signaling component AUXIN RESPONSE FACTOR5 role in embryogenic transition using modern tools of molecular biology” pozwoliło na poszerzenie kontaktów zawodowych w obrębie pracowników CEITEC, MU Brno. W trakcie trwania konferencji wygłosiłam prezentację ustną, która została dodatkowo nagrana i poddana analizie przez Samuela Lagier, dzięki czemu poznałam swoje mocne i słabe strony wystąpień publicznych. Udział w warsztatach technik wygłaszania referatów, radzenia sobie ze stresem, cenne uwagi wskazujące jak poprawić wizerunek podczas

przemówień publicznych z pewnością zaowocuje w przyszłości, zwiększając umiejętności prezentowania podczas wystąpień naukowych, popularnonaukowych, czy zajęć dydaktycznych. W czasie realizacji projektu nabyłam nowych kompetencji zawodowych. Dzięki udziałowi w kursie organizowanym w ramach programu INTEG-RNA, Introduction to Statistics with R; University of Edinburgh, Online, 03-06.05.2022; Szkoleniowiec: Ezra Herman; Współpraca: Hannes Becher, Shrey Bhardwaj poznałam podstawy pracy w środowisku R, dzięki czemu mogę stosować to narzędzie w dalszych badaniach, a także przekazać zdobytą wiedzę przyszłym studentom w trakcie zajęć i realizacji prac dyplomowych. Brałam udział w licznie organizowanych przez CEITEC, MU Brno seminariach PI, Mendel Centre Seminars Spring 2022, a także spotkaniach grupy co poszerzyło moją wiedzę nie tylko naukową, ale także poznałam metody promowania jednostki badawczej oraz zwiększenia jej widzialności.

Podczas realizacji projektu zapoznałam się z nowymi technikami tj. CRISPR-Cas9, klonowanie z użyciem systemu MoClo, przejściowa transformacja liści tytoniu z wykorzystaniem infiltracji, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, ClearSee, do głębokiego obrazowania morfologii i ekspresji genów w tkankach roślinnych. Te metody badawcze będą mogły zostać zaimplementowane w modułach kształcenia uatrakcyjniając ofertę edukacyjną macierzystej jednostki. Współpraca z ośrodkiem badawczym ma charakter ciągły, a w dniach 05-06.05.2025 gościłam Héléne Robert Boisivon oraz Samii Belaidi. Podczas krótkiej wizyty studyjnej został wygłoszony wykład "Temperature effects during seed development in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*" w ramach Scientific Meetings, IBBIOS, WNP, UŚ.

## **2. Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institute Jean-Pierre Bourgin for Plant Sciences (IJPB), Wersal, Francja.**

Nawiązałam współpracę z Sylvie Citerne z wyżej wymienionej jednostki w 2019 roku, która jest specjalistką z zakresu analizy hormonów w tkankach roślinnych oraz chromatografii cieczowej (UPLC-ESI-MS/MS). W wyniku tej współpracy powstały trzy publikacje na przestrzeni ostatnich lat (**Wójcikowska i in., 2024, H3, P4; Wójcikowska i in., 2025, H8, P2; Nowak i in., 2024, H4, P5**), w których opisano poziomy hormonów podczas tranzycji embriogenicznej indukowanej trichostatyną A, podczas regeneracji jęczmienia (różne odmiany) w warunkach kultury *in vitro*, a także w liniach transgenicznych o różnym poziomie ekspresji i/lub aktywności białka MP oraz MP11ir.

### **3. Radboud University, Department of Plant and Animal Biology, Radboud Institute for Biological and Environmental Sciences (RIBES), Nijmegen, Holandia.**

Kooperacja z Victorią Mironova, która rozpoczęła się w roku 2023 pozwoliła na zlokalizowanie elementów *cis*-regulatorowych AuxRE, jak i określenie ich rodzaju, w promotorach badanych przeze mnie genów. Współpraca zaowocowała wspólną publikacją (Wójcikowska i in., 2025, H8, P2).

### **4. Centre for Bioinformatics and Data Analysis, Medical University of Białystok, Białystok, Polska**

Kooperacja z Karoliną Chwiałkowską oraz Mirosławem Kwaśniewskim rozpoczęła się w roku 2021 nad pracami związanymi z badaniem transkryptomu *Arabidopsis thaliana* podczas tranzykcji embriogenicznej indukowanej egzogenną auksyną oraz trichostatyną A. Współdziałanie dotyczyło poznania protokołu przygotowania bibliotek do RNA-Seq, a także procesu analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników. Efektem współpracy jest artykuł naukowy (Wójcikowska i in., 2024, H3, P4).

### **5. The Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (MPI-MP), Poczdam, Niemcy**

Jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych, odbyłam trzymiesięczny staż naukowy w ww. jednostce pod okiem Berndta Müeller-Röhebera, gdzie zapoznałam się z technikami biologii molekularnej, które służą badaniu interakcji pomiędzy białkami oraz DNA, takimi jak EMSA oraz ChiP-qPCR. W trakcie pobytu uczyłam się technik klonowania genów oraz zdobyłam wiedzę z zakresu inżynierii białek (budowa wektorów służących produkcji rekombinowanych białek w komórkach bakterii, Western Blot, przygotowanie żeli poliakrylamidowych do rozdzielania białek, oczyszczanie białek, a także projektowanie sond do metody EMSA). Poszerzenie warsztatu laboratoryjnego, poznanie nowoczesnych rozwiązań technologicznych oraz organizacji pracy, a także nawiązanie nowych kontaktów naukowych przyczyniło się do rozwoju naukowego oraz osobowego.

### **6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKE.**

#### **a) Osiągnięcia dydaktyczne**

##### ***Zajęcia dydaktyczne***

Od momentu rozpoczęcia Studiów Doktoranckich na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach w 2009 roku prowadzę zajęcia laboratoryjne oraz wykłady ze studentami

studiów zarówno I, jak i II stopnia, kierunków biotechnologia, biotechnolog, biologia, ochrona środowiska realizując następujące moduły: biotechnologia roślin – kurs rozszerzony, biotechnologia roślin – kurs podstawowy, podstawy biotechnologii, biotechnologia dla biologów, biotechnologia w praktyce, kultury *in vitro* w biotechnologii, mikropropagacja roślin, GMO – korzyści i zagrożenia, genetyczne modyfikacje organizmów, mechanizmy rozmnażania roślin użytkowych, rozmnażanie generatywne roślin i embriologia eksperymentalna, zagrożenia cywilizacyjne i zrównoważony rozwój, podstawy genetyki, podstawy biologii molekularnej, bioinformatyka, analiza genetyczna, plant biotechnology, basics of plant biotechnology, bioinformatic, GMO – benefits and threats. Dodatkowo prowadziłam zajęcia na studiach III stopnia Plant morphogenesis *in vivo* and *in vitro* w ramach modułu: Advanced methods in biotechnology and biodiversity (2016-2018). Na przestrzeni lat koordynowałam moduły oraz współtworzyłam sylabusy i programy zajęć dydaktycznych: biotechnologia roślin – kurs rozszerzony, biotechnologia dla biologów, kultury *in vitro* w biotechnologii, mikropropagacja roślin, GMO – korzyści i zagrożenia, genetyczne modyfikacje organizmów, plant biotechnology, basics of plant biotechnology, GMO – benefits and threats.

Dodatkowo, aktywnie uczestniczę w edukacji studentów pełniąc rolę opiekuna, jak i promotora prac dyplomowych. Do chwili obecnej byłam promotorem 12 studentów studiów licencjackich, opiekunem 19 studentów studiów licencjackich i magisterskich, recenzentem i członkinią komisji 5 studentów studiów licencjackich i magisterskich.

### ***Kierowanie i udział w projektach dydaktycznych***

Pełniłam funkcję kierownika zadania 2 projektu dydaktycznego Akcja Popularyzacja (Społeczna Odpowiedzialność Nauki – Popularyzacja Nauki i Promocja Sportu, SON) finansowanego przez Ministerstwo Edukacji Narodowej (MEN) skierowanego do młodzieży o dofinansowaniu wielkości 689 791.95 PLN realizowanego w okresie od 01.01.2021 do 31.12.2022 roku (<https://us.edu.pl/wydzial/wnp/wspolpraca/projekt-akcja-popularyzacja/>). Projekt realizowany był przez Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych (zadanie 1, 3) we współpracy z Wydziałem Nauk Przyrodniczych (zadanie 2) Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach i składał się on z 3 zadań: Zadanie 1: Interdyscyplinarne wykłady dla szkół “Nauka wokół nas”; Zadanie 2: Wykłady popularnonaukowe w konwencji TED “Zawód naukowiec”; Zadanie 3: Warsztaty dla dzieci i młodzieży. Celem projektu była popularyzacja nauk ścisłych i przyrodniczych oraz wskazanie Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, jako miejsca, w którym studiując można zdobywać wysokie kwalifikacje, pracować

w nowoczesnych laboratoriach, współuczestniczyć w międzynarodowych projektach, co przekłada się na sukces zawodowy. Zadanie 2 miało charakter cyklu spotkań w konwencji wydarzeń organizowanych przez TED, a zaproszeni goście prezentowali wysokiej jakości, inspirujące i popularnonaukowe wykłady z dziedziny nauk ścisłych oraz przyrodniczych. Do moich zadań należało pozyskanie wykładowców, w przypadku gości z zagranicy organizacja ich pobytu w Polsce, koordynacja zadań związanych z przygotowaniem transmisji online, opracowaniem napisów, tłumaczeniem części wykładów na język angielski oraz migowy. W czasie dwóch lat, przeprowadzono dwadzieścia wykładów, które w większości moderowałam. Wydarzenie udostępniano w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem transmisji wykładów online, promowano w mediach społecznościowych, a także udostępniano informacje na stronach internetowych Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Istotny jest fakt, że wykłady były dostępne dla szerokiego grona odbiorców również dlatego, że zostały dostosowane dla osób z niepełnosprawnościami – doposażone w tłumaczenie na język migowy, oraz w napisy w języku polskim oraz angielskim. Wśród zaproszonych gości, absolwentów Wydziału Nauk Przyrodniczego Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach – cztery osoby były gośćmi pracującymi w renomowanych ośrodkach naukowych za granicą:

- Dr Magdalena Stolarek-Januszkiewicz „Szukanie igły w stogu siana – wykrywanie krążącego DNA nowotworowego” Dyrektor Rozwoju Technologii, Biofidelity Ltd., Wielka Brytania, <https://youtu.be/3cAezkEq68g>
- Dr Danuta Jeziorska „Praca zrodzona z pasji: od badań podstawowych do firmy biotechnologicznej, której misją jest rozszyfrowanie genomu na potrzeby medycyny personalizowanej” Dyrektor Generalny i współzałożycielka Nucleome Therapeutics, założycielka Innovation Forum Oxford, Wielka Brytania, <https://youtu.be/tbQo1xG2Iqk>
- Dr Artur Deditius „Mineralne surowce krytyczne – źródła, produkcja i znaczenie dla przyszłych pokoleń” pracownika Murdoch University, Sustainable Geochemistry and Mineral Science (GeMS) Australia, [youtu.be/ITp2irjmh88](https://youtu.be/ITp2irjmh88)
- Dr Paweł Wąsowicz „Inwazje biologiczne w Arktyce” pracownik Icelandic Institute of Natural History (IINH) Islandia, <https://youtu.be/VS0b-yKIQhc>

Pozostali goście, to absolwenci Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach związani z jednostkami naukowymi w Polsce lub założyciele firm biotechnologicznych, a także popularyzatorzy nauki:

- Dr Marcelina Firkowska „Naukowiec = wynalazca? Czyli transfer wiedzy w praktyce”, pracownik Fundacji Nauki Polskiej, Polska, <https://youtu.be/JJqGLKpyXf8>
- Dr Karolina Chwiałkowska „Eksom, mikrotranskryptom, metylom – jak nie utonąć w oceanie danych” kierownik działu biotechnologicznego w firmie genetycznej IMAGENE.ME oraz naukowiec w Centrum Bioinformatyki i Analizy Danych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska, <youtu.be/yy1zimwliH8>
- Dr Patrycja Sitek „Od biotechnologa do businesswoman” właścicielka firmy CR Konsulting (CRK), Polska, <https://youtu.be/n-4s1Vmtusg>

Wśród wykładowców znaleźli się także pasjonaci nauki na stałe związani z Wydziałem Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach:

- Dr hab. Marek Marzec „Wykorzystanie mutagenyzy jęczmienia w badaniach aplikacyjnych”, <YJn4LDQaUH0>
- Dr Michał Sobala „Co pozostawili Majowie beskidzkich polan?” <https://youtu.be/TCPbMsEgLE0>
- Dr hab. Jolanta Burda „Superwulkany – ognisty oddech Ziemi” <https://youtu.be/1AmZoPCSVpc>
- Dr Dariusz Ignatiuk „Jak szybko znikają lodowce w Arktyce i skąd to wiemy?” [https://youtu.be/mbcN\\_Yp\\_1-g](https://youtu.be/mbcN_Yp_1-g)
- Wojciech Krawczyński „Skamieniałości i ich praktyczne zastosowanie” <https://youtu.be/8ws1Eq1qjz0>
- Dr Maciej Mendecki „Jak określić drgania na Górnym Śląsku i nie tylko tu? – czyli o hazardzie sejsmicznym dla laików” <https://youtu.be/sE7niYDK3WE>
- Dr Sławomir Sułowicz „Małe jest piękne – cudowny świat mikrobów” <https://youtu.be/GG-8GfrKoQ4>
- Dr Artur Piński „Przetnij napraw DNA – molekularne nożyce. Jak największe odkrycie XXI wieku wpływa na Twoje życie” <https://youtu.be/OnilboTfcsE>
- Dr Jacek Francikowski „Dlaczego badamy owady?” <https://youtu.be/WazZ8T1J7ZI>
- Dr Małgorzata Rudnicka „Buntownicy z wyboru – rośliny środowisk eksperymentalnych” <https://youtu.be/-Zwt1xh8WyY>
- Dr Łukasz Chajec „Komórki zwierzęce obiektem fascynacji naukowców” <https://youtu.be/PCMqkOue7xQ>
- Prof. dr hab. Monika Fabiańska „Antropominerały” <https://youtu.be/IFLHQNTV6Zc>
- Dr Dawid Surmik: „Na co chorowały dinozaury? – interdyscyplinarne badania prowadzone na Uniwersytecie Śląskim” <https://youtu.be/LKOFb2pv-5Y>

Wykłady mają do dnia dzisiejszego niemal 4000 wyświetleń oraz stanowią platformę edukacyjną, która może być wykorzystana wielokrotnie przy akcjach popularyzujących naukę, ale także do wykorzystania na zajęciach dydaktycznych powiązanych tematycznie dla młodzieży szkolnej.

Podczas trwającego dwa lata projektu Akcja Popularyzacja współorganizowałam także dziesięć ogólnopolskich konkursów skierowanych dla dzieci i młodzieży – współtworzyłam zakres tematyczny konkursów, cykl infografik, odpowiadałam za wprowadzenie odpowiednich regulacji prawnych, przygotowanie regulaminów konkursów, koordynowałam prace jury, odpowiadałam za zakup i wysłanie nagród konkursowych oraz dyplomów, a także byłam zaangażowana w promowanie wydarzenia w mediach społecznościowych. Konkursy zmierzały do aktywizacji dzieci i młodzieży, stymulacji ich kreatywności, ale także do szerzenia wiedzy o problemach ekologicznych współczesnego świata, a tym samym zwiększenia świadomości dotyczącej zmian klimatu. Spośród uczestników czteroosobowe jury złożone z pracowników Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, której pracami kierowałam, wyłoniło 47 zwycięzców. Ogółem sumaryczna liczba zgłoszeń prac konkursowych wynosiła 171. Tematyka konkursów była zróżnicowana i dotyczyła różnych aspektów ochrony środowiska: ochrony wód, powietrza, gleby, fauny, flory, segregacji odpadów, odnawialnych źródeł energii, zapobieganiu zmian klimatu w najbliższym otoczeniu, jak w skali globalnej. Przewidziane były różne formy konkursów:

- plastyczne „Mój zielony dom. Jak zamienić beton w puszcę?”, „Stwórz dom dla naszych małych przyjaciół”, „Nie ma, nie ma wody na pustyni” – zmiany klimatu na naszych oczach”, „Recykling w sztuce. Jak z niczego stworzyć arcydzieło”, „Zagraj z przyrodą”, „W naturze drzemie siła – odnawialne źródła energii”,
- fotograficzne „Obiektywem w chmury!”, „Rzadki gość - śnieg”,
- literackie „Eko Silesia. Co zrobić by Śląsk był zielony?”, „Jestem Greta – moje małe sukcesy w zapobieganiu zmianom klimatu”.

Uczestniczyłam w projektach dydaktycznych współfinansowanych ze środków Unii Europejskiej, gdzie opracowałam sylabusy, przygotowywałam i prowadziłam warsztaty praktyczne w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Opracowałam materiały do realizacji Zadania. 3.43 Wizyta studyjna i warsztaty praktyczne prowadzone w UŚ: „Analiza fitosanitarna roślin i produktów roślinnych”, „Molekularne metody identyfikacji roślin ziemniaka wolnych od wirusa Y – zastosowanie techniki RT-PCR” oraz Zadania. 1.7-8 „Obsługa sterylizatorów parowych” w ramach projektu „Innovative Start. Podniesienie kompetencji zawodowych studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w odpowiedzi

na oczekiwania przyszłych pracodawców” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, Oś priorytetowa: III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju. Działanie: 3.1 Kompetencje w szkolnictwie wyższym POWR.03.01.00-00 -K313/16. Okres realizacji projektu: od: 2017-02-01 do: 2020-01-31. W ramach tych działań pozyskałam materiał badawczy: niezależnie wyprowadzone 5-tygodniowe kultury *in vitro* tetraploidalnego ziemniaka porażonego wirusem Y (Wi (PVY N-Wi ) EF 558545) z Zakładu Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie, Pracownia Zasobów Genowych i Kultur *In Vitro* oraz bulwy ziemniaka porażonych ww. szczepem wirusa Y. Materiał wzrastający w kulturze *in vitro* posłużył do przeprowadzenia techniki odwirusowania z wykorzystaniem chemioterapii tj. traktowania związkami przeciwwirusowymi tj. rybawiryną. Dodatkowo, z liści roślin porażonych wirusem Y wyizolowano RNA, przeprowadzono syntezę cDNA, a następnie z użyciem reakcji PCR dokonano detekcji wirusa w materiale roślinnym. Podczas zajęć z obsługi autoklawów parowych prezentowałam obsługę urządzeń do sterylizacji szkła i sprzętu laboratoryjnego oraz podłoży biologicznych.

W roku 2017 (19-23.06.2017) uczestniczyłam w projekcie "POWER NEW. Zwiększenie konkurencyjności studentów (WBBiOŚ, UŚ) na rynku pracy poprzez rozwój ich kompetencji zawodowych", w ramach Programu operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego, gdzie opracowywałam i prowadziłam warsztaty praktyczne dla Studenckich Zespołów Projektowych: ilościowe sprawdzenie obecności transgenu (35S/NOS) w różnych produktach żywnościowych zawierających soję i kukurydzę w tym w miodach i olejach roślinnych z wykorzystaniem reakcji RT-qPCR. Studenci zaprezentowali wyniki badań podczas I Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej „Aktualne Problemy Ochrony Środowiska” organizowanej w dniu 19.06.2017 roku w Katowicach, a ich doniesienie zostało wyróżnione.

Rozwijam umiejętności uczestnicząc w szkoleniach związanych z technikami mikroskopowania oraz bioinformatyką:

- szkolenie prowadzone przez data2biology Sp. z o.o. „Analiza danych pochodzących z NGS (ang. Next Generation Sequencing)”, Online, (30.05-20.06.2022)
- kurs organizowany w ramach programu INTEG-RNA, “Introduction to Statistics with R”; University of Edinburgh, Online, Szkoleniowiec: Ezra Herman; Współpraca: Hannes Becher, Shrey Bhardwaj, (03-06.05.2022)

- kurs „Akredytacja laboratoriów badawczych zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005”, Katowice, Polska; Szkoleniowic: Rahmund Michalski, Joanna Mytych (19.03.2016)

Podnoszę swoje kwalifikacje i kompetencje dydaktyczne uczestnicząc w szkoleniach, a także biorąc udział w konferencjach dydaktycznych tj.:

- wprowadzenie do mindfulness dla nauczycieli akademickich (06-27.07.2023)
- szkolenie z zakresu zaburzeń psychicznych i całościowych w tym zespołu Aspergera (23.02.2021)
- szkolenie z zakresu pracy ze studentami z niepełnosprawnościami - praca z platformą MS TEAMS na poziomie zaawansowanym (22.10.2020)
- szkolenie z zakresu metod dydaktycznych w pracy ze studentami niepełnosprawnymi – praca z platformą MOODL na poziomie podstawowym (09.10.2020)
- konferencja dydaktyczna IDEATORIUM, Gdańsk, Polska, (16-17.06.2016)
- warsztat „Dobrze uczyć” (26.11.2009)

#### **b) Osiągnięcia organizacyjne**

Od lutego 2020 roku jestem członkinią Zespołu ds. Promocji Wydziału Nauk Przyrodniczych UŚ, który działa z ramienia Pani Prodziekana ds. Promocji Badań i Umiejętności dr hab. Agaty Daszkowskiej-Golec, prof. UŚ. W zespole tym byłam odpowiedzialna za tworzenie infografik promujących kierunki studiów na WNP, UŚ w Katowicach, tworzenie not popularnonaukowych publikowanych na stornach wydziału, instytutu oraz w mediach społecznościowych, współtworzenie opisów kierunków do promocji rekrutacji, współopiniowaniu Poradnika Komunikacyjnego Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz recenzowaniu spotu promującego kierunki studiów na WNP, UŚ (22.06.2023) <https://www.youtube.com/watch?v=R89QcJIHEq4>. Dodatkowo biorę udział w kampaniach reklamowych promujących wydarzenia popularnonaukowe na WNP, UŚ (konsultuję grafiki uniwersyteckie oraz redaguję teksty do płatnej reklamy). W latach 2025, 2024 jako członek Zespołu ds. Promocji brałam udział w pracach komitetu organizacyjnego Ogólnopolskiej Nocy Biologów, a moja rola związana była z przygotowaniem: pism o patronat honorowy i medialny, listy potencjalnych sponsorów, grafik, planu komunikacji medialnej, not na stronie instytutu oraz w mediach społecznościowych. W lutym 2023 roku w ramach podnoszenia swoich kompetencji do pracy w Zespole ds. Promocji brałam udział w szkoleniach pt.: „Sztuka wystąpień publicznych w popularyzacji nauki” (26.09.2023), “Wyjaśnić świat

przez media” (28.06.2023) oraz „Rolkowanie” (30.07.2025). W uznaniu osiągnięć organizacyjnych na rzecz WNP, UŚ Prace Zespołu ds. Promocji zostały nagrodzone Nagrodą Zespołową Rektora I stopnia (01.10.2024) oraz Nagrodą Zespołową Rektora II stopnia (01.10.2022).

Dodatkowo pełnię funkcję Kierownika Zakładu Inżynierii Genetycznej GMO I kategorii DPL-VI.431.99.2016 nr w Rejestrze Zakładów Inżynierii Genetycznej 04-63/2016, 15.12.2016 - do chwili obecnej, a także Przewodniczącej Wydziałowej Komisji ds. GMO/GMM oraz Wydziałowej Komisji ds. Bezpieczeństwa Biologicznego Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych, 22.01.2015 - do chwili obecnej. Uczestniczę w przygotowaniach wniosków o utworzenie zakładów inżynierii genetycznej, a także zamkniętego użycia GMO, GMM I i II kategorii, jestem obecna podczas kontroli służb sanitarnych, inspektoratu ochrony środowiska oraz państwowej inspekcji pracy, regularnie nadzorujących warunki pracy z GMO/GMM. W roku 2020 (21.10.2020) brałam udział w szkoleniu „Przepisy prawa i informacje praktyczne dla wnioskodawców i użytkowników GMM i GMO celem podniesienia swoich kompetencji”.

### **c) Osiągnięcia popularyzujące naukę**

Od początku kariery naukowej intensywnie angażuję się w popularyzację nauki, współpracując ze szkołami, spotykając się z dziećmi i młodzieżą przy okazji ogólnopolskich, jak i lokalnych wydarzeń naukowych. Przybliżam społeczeństwu tematykę związaną z szeroko rozumianą biotechnologią roślin oraz genetyką, udowadniając, że pełni w codziennym życiu fundamentalną rolę m.in. w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego. Szczególnie intensywnie udzielam się w coroczne wydarzenie Nocy Biologów. W roku 2016 pełniłam funkcję wydziałowego koordynatora V Nocy Biologów. Dodatkowo brałam udział w Nocy Biologów w latach: 2025, 2024, 2021, 2020, 2018, 2017, gdzie prowadziłam/współprowadziłam laboratoria: „Znaczenie grup krwi na nasze zdrowie w kontekście zmian klimatu”, „Las w probówce”, „Osmoza od kuchni”, „Życie roślin w szklanej kapsule” oraz wykłady: „Czy życie bez organizmów genetycznie modyfikowanych jest możliwe”, „Leczenie roślin - czyli jak zwalczać wirusy u naszych zielonych przyjaciół” (<https://www.youtube.com/watch?v=EDDAfaO7Zy0>), „Czy żywność Frankensteina może ratować życie?” (<https://www.youtube.com/watch?v=jADRb7V-C8k&t=23s>).

Brałam także udział w Śląskim Festiwalu Nauki (ŚFN) 2023 jako prelegent: „Czy życie bez organizmów genetycznie modyfikowanych jest możliwe?”, a także wystawca: „GMO – czy

wiesz, co jesz?” (09-11.12.2023), oraz w edycji ŚFN 2020 jako wykładowca: „Czy żywność Frankensteina może ratować życie?” (25-27.01.2020).

Pozostałe aktywności:

- udział w projekcie Science SPARK – Szkoła, Pasja, Aktywność, Rozwój, Kreatywność współfinansowanego ze środków Ministra Edukacji w ramach programu „Odkrywczy” poprzez prowadzenie warsztatów z młodzieżą (08.11.2025, 15.11.2025, 29.11.2025) oraz warsztatów podczas konferencji Mosty do Przyszłości dla nauczycieli (22-23.11.2025)
- udzielenie komentarza redakcji FAKTÓW w sprawie osiągnięcia firmy COLOSSAL BIOSCIENCES o "wskrzeszeniu" wilka straszego (08.04.2025)
- prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla młodzieży: „Krwawe warsztaty - oznaczanie grup krwi i ich dziedziczenie” ramach Uniwersyteckiego Miasteczka Naukowego (18.01.2025)
- pozyskanie środków (5000 zł) w ramach grantu "Popularyzacja Nauki" Europejskie Miasto Nauki Katowice 20204 (EMNK2024), organizacja wykładu dla licealistów („Bloody lecture, wszystko co chciałbyś wiedzieć o karminowej płynnej tkance łącznej. Wykład, który rozpali Ci krew w żyłach”) oraz organizacja i poprowadzenie warsztatów "Krzyżówki genetyczne mrozą Ci krew w żyłach? Odkryj tajemnice dziedziczenia grup krwi" (21.11.2024). Z okazji 140 rocznicy urodzin polskiego uczonego Ludwika Hirszfelda zorganizowano dla młodzieży licealnej warsztaty, w których wzięło udział 70 uczniów szkół licealnych regionu. Podczas wykładu uczniowie dowiedzieli się o składzie oraz funkcji krwi, a podczas warsztatu młodzież przeprowadziła doświadczenie z oznaczaniem grupy krwi (układ ABO/antygen Rh). Uczestnicy warsztatów opanowali umiejętność rozwiązywania krzyżówek genetycznych związanych z dziedziczeniem grup krwi lub antygeny Rh. Dodatkowo grając w internetową grę edukacyjną BloodTypingGame utrwalili zdobytą wiedzę. (<https://us.edu.pl/institut/ibbios/2024/12/02/krwiste-wyklady-i-krwawe-warsztaty-dla-licealistow/>)
- udział w projekcie „Science Inspires! Eksperymentuj, Odkrywaj, Inspiruj”, poprowadzenie wykładu popularnonaukowego: „Czy życie bez organizmów genetycznie modyfikowanych jest możliwe?” oraz warsztatu „Czy klony są potrzebne? Czyli jak kopiować rośliny”, którego celem było poszerzenie wiedzy o bezpieczeństwie żywnościowym oraz zdobycie praktycznych umiejętności pracy w laboratorium przez

uczestników. Wydarzenie było realizowane w paśmie Miasto-Region-Akademia, w ramach obchodów EMNK2024 i dofinansowane ze środków Województwa Śląskiego – Współorganizatora EMNK2024 (30.10.2024)

- wygłoszenie wykładu: „Czy życie bez organizmów genetycznie modyfikowanych jest możliwe?” w partnerskim, Uniwersyteckim I Liceum Ogólnokształcącym im. Juliusza Słowackiego w Chorzowie podczas Nocy Naukowców (19.04.2024)
- udział w podcaście Mateusza Grzeszczuka Podróż bez Paszportu: Globalna rozgrywka o rynek GMO. Jaka będzie przyszłość żywności? <https://www.youtube.com/watch?v=IJvpMibVE5k&t=467s> (1400 wyświetleń) (14.03.2024)
- wystąpienie w ramach Sceny Premier Naukowych <https://us.edu.pl/spn-gmo-to-genetyczna-puszka-pandory-dr-barbara-wojcikowska/>; <https://youtu.be/Y1A-XJ-7c2w> (28.03.2024)
- przygotowanie tekstu popularnonaukowego: "GMO nadzieja czy droga do zatracenia" do czasopisma NoLimits ISSN 2719-2830 #2(8)/2023 <https://us.edu.pl/no-limits-gmo-nadzieja-czy-droga-do-zatracenia/> (27.11.2023)
- prowadzenie wykładu „Jak śledzić geny? – wykorzystanie genów reporterowych we współczesnej nauce” w ramach akcji #LicealiściNaWNP (20.10.2023)
- udzielenie wypowiedzi dla Agencja Informacji Naukowej UŚ-serwisu informacji eksperckiej dla mediów z okazji Światowego Dnia Żywności <https://ain.us.edu.pl/swiatowy-dzien-zywnosci> (13.10.2023)
- prowadzenie wykładu „Organizmy genetycznie modyfikowane – wykorzystanie w przemyśle i rolnictwie” w ramach akcji #LicealiściNaWNP (31.03.2023)
- prowadzenie wykładów popularnonaukowych "Genetyka XXI wieku" w ramach Uniwersyteckiego Miasteczka Naukowego "Oko w oko z biologią" (20-24.09.2021)
- laboratorium biologii molekularnej WNP UŚ - wirtualny spacer - w ramach Wirtualnych Dni Otwartych <https://www.youtube.com/watch?v=F9a-jlXX9DQ&t=35s> (23.06.2020)
- „Klonowanie roślin” – wirtualny warsztat (2800 wyświetleń)- w ramach Wirtualnych Dni Otwartych <https://www.youtube.com/watch?v=IEn-b7m4yPQ> (23.06.2020)
- cykl wykładów popularnonaukowych w ramach Uniwersytetu Otwartego "Wykorzystanie DNA w medycynie i nanotechnologii" (09-27.09.2019)

- udział w Studenckim Festiwalu Nauki – organizacja warsztatów oraz wykładów w ramach „Dnia DNA” organizowanego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska (25.04.2018)
- udział w organizowanych warsztatach dla uczniów LO im. Adama Mickiewicza w Katowicach, przygotowujących się do Olimpiady Biologicznej (22.03.2018)
- koordynowanie trójstronną współpracą naukowo-dydaktyczną z ramienia Uniwersytetu Śląskiego (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) pomiędzy Uniwersytetem Śląskim, Gminą Sławków i Zespołem Szkół im. Jana Pawła II w Sławkowie – Liceum Ogólnokształcącym im. Jana Pawła II w Sławkowie (02.03.2018 – do teraz)
- wygłoszenie wykładu dla uczniów II LO im Emilii Plater w Sosnowcu w ramach XXIV Dni Ziemi (27.04.2016)
- artykuł w Gazecie Uniwersyteckiej UŚ, „Jak nocą odkrywano kod natury” <https://gazeta.us.edu.pl/sites/gazeta.us.edu.pl/files/PDF/GU%20lutny%20po%20korektach%202016.pdf> (10.02.2016)
- prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla uczniów II Liceum Ogólnokształcącego im. Emilii Plater w Sosnowcu (20.05.2015)
- artykuł w Gazecie Uniwersyteckiej UŚ, „Etiuda i preludium a genetyka roślin” <https://gazeta.us.edu.pl/node/277952> (17.11.2014)
- współprowadzenie wraz z artystą Michałem Brzezińskim oraz pracownikami UŚ warsztatów BIODIVERSITY dla młodzieży gimnazjalnej (24.10.2013)

**7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.**

Za działalność naukową otrzymałam następujące nagrody:

1. Wyróżnienie za poster: Falińska J, Wójcikowska B., Marzec M. 2025. Does the role of nitrilases in the embryogenic transition process involve the synthesis of PAA? 12 Polish Society of Experimental Plant Biology, Warszawa, Polska, (09-12.09.2025)
2. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za artykuły w 2025 roku
3. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za projekty krajowe w 2023 roku

4. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za artykuły w 2023 roku
5. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za najwyżej punktowane artykuły w dyscyplinach w 2023 roku
6. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za najlepsze osiągnięcie publikacyjne w 2022 roku
7. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za złożenie grantu w 2021 roku
8. Nagroda I stopnia za poster: Wójcikowska B., Nowak K., Wójcik A.M., Morończyk J., Kiwior-Wesołowska A., Citerne S., Gaj M.D. 2021. Trichostatin A induce stress-related genes during induction of somatic embryogenesis process in Arabidopsis. Polish Society of Experimental Plant Biology, Katowice, Poland, Wirtualna, (20-23.09.2021)
9. Dodatek projakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za działania naukowe NAWA w 2021 roku
10. Travel Grant na pokrycie kosztów uczestnictwa w EMBO Workshop przez organizatorów. Wójcikowska B., Chwiałkowska K., Nowak K., Wójcik A.M., Morończyk J., Kiwior-Wesołowska A., Kwaśniewski M., Gaj M.D. In the search for histone acetylation-regulated genes controlling somatic embryogenesis in Arabidopsis. EMBO Workshop: International Plant Systems Biology 2021, Wirtualna, (26-27.04.2021)
11. Travel Grant przyznany przez American Society of Plant Biologists (ASPB) na pokrycie kosztów uczestnictwa w konferencji. Wójcikowska B., Chwiałkowska K., Nowak K., Wójcik A.M., Morończyk J., Kwaśniewski M., Gaj M.D. 2019. Transcriptome changes and hormone accumulation associated with TSA-induced somatic embryogenesis. Plant Biology, American Society of Plant Biologists, San Jose, USA, (03-07.08.2019)
12. Nagroda I stopnia za poster Wójcikowska B., Chwiałkowska K., Nowak K., Wójcik A.M., Morończyk J., Kwaśniewski M., Gaj M.D. 2019. RNA-seq analysis of differential gene expression during somatic embryogenesis induced by trichostatin A in Arabidopsis explants. 9 Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin, Toruń, Polska, (09-12.09.2019)
13. Indywidualna nagroda naukowa III stopnia za działalność naukowo-badawczą w 2016 roku

14. Nagroda I stopnia za plakat Wójcikowska B., Gaj M.D. 2013. Gen *AUXIN RESPONSE FACTOR2*-negatywny regulator procesu somatycznej embriogenezy u *Arabidopsis*. IV Polski Kongres Genetyki, Poznań, Polska, (10-13.09.2013)

A handwritten signature in dark ink, reading "Barbara Wójcikowska", written over a horizontal dotted line.

(podpis wnioskodawcy)