

Załącznik nr2

AUTOREFERAT

Dr Joanna Jankowicz-Cieślak

Plant Breeding and Genetics Laboratory
Joint FAO/IAEA Division on Nuclear Techniques in Food and Agriculture
Department of Nuclear Applications
International Atomic Energy Agency
Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria |
Email: j.jankowicz@iaea.org
T: (+43-1) 2600-28275

Wiedeń, 2019

1. Podstawowe informacje o kandydacie

Imię i nazwisko: Joanna Jankowicz - Cieślak

Nazwisko panińskie: Jankowicz

Dr Joanna Jankowicz- Cieślak

Plant Breeding and Genetics Laboratory

Joint FAO/IAEA Division on Nuclear Techniques in Food and Agriculture Department of Nuclear Applications

International Atomic Energy Agency

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria

Email: j.jankowicz@iaea.org T: (+43-1) 2600-28275

1.1. Przebieg pracy naukowej.

Moja praca naukowa jest związana z kilkoma uczelniami oraz ośrodkami badawczymi w kraju i za granicą. Jestem absolwentką studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, na kierunku biologia, specjalność biologia molekularna. Dyplom magistra uzyskałam w 2000 roku za pracę magisterską pt. "*Zastosowanie metody in situ PCR do badania latencji wirusa opryszczki typu 1*" napisaną pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Kosz-Vnenchak w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UJ. Od września 2000 r. przebywałam na Uniwersytecie Wiedeńskim w ramach stażu podyplomowego i uczestniczyłam w kursach praktycznych prowadzonych przez prof. dr Mary Rosabella Samuel z Zakładu Systematyki Roślin Wyższych i Ewolucji Instytutu Botaniki, Uniwersytetu Wiedeńskiego. W trakcie odbywania praktyk podjęłam pracę w projekcie naukowym badającym relacje filogenetyczne między południowoamerykańskimi gatunkami *Hypochoeris* (Asteraceae) przy zastosowaniu techniki AFLP. W późniejszym okresie zajęłam się też badaniem gatunku *Hepatica maxima* (Ranunculaceae) przy zastosowaniu tej samej techniki.

Podczas pobytu na Uniwersytecie Wiedeńskim grupa prof. dr Mary Rosabella Samuel nawiązała współpracę z Austriackim Centrum Naukowym (*Austrian Research Center*) w Seibersdorfie (obecnie Austriacki Instytut Technologii, *Austrian Institute of Technology*) w zakresie identyfikacji markerów SSR dla gatunku *Hypochoeris*. W związku z moim zaangażowaniem w badania nad tym gatunkiem w czerwcu 2001, rozpoczęłam pracę nad izolacją regionów mikrosatelit oraz opracowania markerów molekularnych do analiz filogenetycznych.

We wrześniu 2001 pod opieką dr. Kornela Burga, rozpoczęłam badania wchodzące w zakres mojej pracy doktorskiej w Austriackim Centrum Naukowym w Seibersdorfie, będąc tam na trzyletnim kontrakcie badawczym. Ponieważ placówka, w której podjęłam badania naukowe, nie posiadała uprawnień do nadawania stopni naukowych, opiekunem pracy został prof. dr hab. Jerzy Kruk z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod którego opieką rozpoczęłam pisanie pracy doktorskiej.

W 2004 roku, uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie plakatu na prestiżowym konkursie organizowanym przez Austriackie Centrum Naukowe. Praca zajęła pierwsze miejsce i została nagrodzona specjalnym stypendium.

Po zakończeniu części doświadczalnej pracy doktorskiej, z sukcesem przeszłam procedury aplikacyjne i rekrutacyjne w Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (*International Atomic Energy Agency - IAEA*), gdzie w październiku 2004 roku rozpoczęłam pracę w Laboratorium Genetyki i Hodowli Roślin (*Plant Breeding and Genetics Laboratory*), kierowanym przez dr. Chikelu Mba. Pracę tę kontynuuję do chwili obecnej.

Ze względów osobistych, pracę doktorską pt. "*Identification of adaptation specific differences in the mRNA expression profile of drought stressed sweet potato (Ipomea batatas)*", obroniłam w październiku 2011 roku. Uchwałą Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie otrzymałam dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Szczegółowe zestawienie moich osiągnięć przedstawiam poniżej oraz w załącznikach nr 3 i 4 do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

9 czerwca 2000 - uzyskanie tytułu naukowego magistra w zakresie specjalności biologia molekularna. Dyplom ukończenia 5-letnich studiów wyższych na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, na kierunku: Biologia.

28 października 2011 - dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biochemia, nadany uchwałą Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1 września 2000 do 31 sierpnia 2001, praktyka oraz zatrudnienie na część etatu na stanowisku asystenta w Laboratory of Molecular Biology, Department of Systematics of Higher Plants and Evolution, Institute of Botany, University of Vienna, Wiedeń, Austria.

1 września 2001 do 30 września 2004, stypendium doktorskie przyznane na zasadzie umowy o dzieło w Department of Biotechnology, Austrian Research Center, Seibersdorf, Austria.

od 1 października 2004, zatrudnienie w Plant Breeding and Genetics Laboratory, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, International Atomic Energy Agency, Wiedeń, Austria.

2. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.).

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stanowi cykl 7 powiązanych tematycznie publikacji, dotyczących opracowania technik indukcji i detekcji zmienności genetycznej dla potrzeb genomiki funkcjonalnej i hodowli roślin. Cykl zawiera 5

prac oryginalnych oraz 2 rozdziały monografii będące pracami przeglądowymi. Prace te zostały opublikowane w latach 2012 – 2018. Dotyczą one zarówno badań podstawowych jak i ich zastosowań aplikacyjnych w doskonaleniu upraw roślin ważnych ekonomicznie.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania **IF** prac składających się na osiągnięcie wynosi **19,083**. Łączna liczba punktów **MNiSW** prac składających się na osiągnięcie wynosi **155**.

2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Techniki indukcji i detekcji zmienności genetycznej w badaniach genomiki funkcjonalnej i hodowli roślin o szczególnym znaczeniu w krajach rozwijających się”.

2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Lp.	Tytuł i autorstwo publikacji	IF ¹	Punkty MNiSW ²	Udział procentowy
1.	<p>Jankowicz-Cieslak J., Huynh O. A., Brozynska M., Nakitandwe J., Till B. J., 2012. Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated banana. <i>Plant Biotechnology Journal</i> 10(9): 1056-1066. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00733.x.</p> <p><i>Mój udział procentowy szacuję na 80%. Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy i zaplanowaniu wszystkich badań. Wybrałam materiał wyjściowy oraz opracowałam technikę mutagenезy chemicznej dla triploidalnego banana w warunkach in vitro. Dokonałam wyboru genów ważnych w badaniach banana i zaplanowałam część starterów. Kluczowym wkładem w tę pracę było opracowanie przeze mnie techniki TILLING dla roślin rozmnażanych wegetatywnie. Następnie, przy zastosowaniu tej metody dokonałam detekcji nowych mutacji punktowych indukowanych w bananie. Ponadto opracowałam hipotezę selekcji dyplontycznej zachodzącej w zmutowanym materiale in vitro. Przeprowadziłam także badania potwierdzające stabilność mutacji w kolejnych pokoleniach. Zidentyfikowałam mutacje oraz określiłam ich wpływ na sekwencję kodowanego polipeptydu, wykonałam analizy bioinformatyczne, oraz walidacje mutacji przy zastosowaniu sekwencjonowania Sangera. Wykonałam wszystkie ryciny oraz przygotowałam manuskrypt i dokonałam jego ostatecznej redakcji po recenzjach.</i></p>	IF ₂₀₁₂ 6,279	40	80%
2.	<p>Jankowicz-Cieslak J. and Till B. J., 2015. Forward and reverse genetics in crop breeding. In: Al-Khayri J. M., S. M. Jain, D. V. Johnson (Eds) <i>Advances in plant breeding strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular</i></p>	-	5	70%

	<p>Tools, Springer International Publishing AG Switzerland, pp. 215-240. DOI: 10.1007/978-3-319-22521-0_8.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji szacuję na 70%. Polegał on na opracowaniu koncepcji manuskryptu, przeglądzie literatury oraz analizie baz danych. Ponadto przygotowałam cały tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również redagowałam manuskrypt po recenzjach.</i></p>			
3.	<p>Maghuly F., Jankowicz-Cieslak J., Pabinger S., Till B. J., Laimer M., 2015. Geographic origin is not supported by the genetic variability found in a large living collection of <i>Jatropha curcas</i> with accessions from three continents. Biotechnology Journal 10(4): 536-551. DOI: 10.1002/biot.201400196.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji szacuję na 35%. Polegał on na opracowaniu koncepcji badań z wykorzystaniem strategii EcoTILLING. Ponadto, zaplanowałam oraz wykonałam doświadczenia EcoTILLING, przeprowadziłam analizę bioinformatyczną wyników i ich interpretację a także uczestniczyłam w przygotowaniu rycin, manuskryptu, i w ostatecznym jego redagowaniu po recenzjach.</i></p>	IF ₂₀₁₅ 3,704	35	35%
4.	<p>Jankowicz-Cieslak J. and Till B. J., 2017. Chemical mutagenesis and chimera dissolution in vegetatively propagated banana. In: Jankowicz-Cieslak J., Tai T.H., Kumlehn J. and Till B.J. (Eds) Biotechnologies for Plant Mutation Breeding, Protocols. Springer International Publishing AG Switzerland, pp. 39-54. DOI: 10.1007/978-3-319-45021-6_3.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tego rozdziału szacuję na 90%. Złożyło się na niego opracowanie metodyki chemicznej mutagenyzy materiału in vitro triploidalnego banana. Dokonałam też analizy spektrum mutacji indukowanych oraz przeprowadziłam eksperymenty wskazujące na szybkie utrwalenie i stabilizację mutacji już w trakcie pierwszego pasażowania. Opracowałam koncepcję manuskryptu i przegląd literatury. Ponadto przygotowałam cały tekst oraz wszystkie ryciny, jak również redagowałam manuskrypt po recenzjach.</i></p>	-	5	90%
5.	<p>Maghuly F., Bado S., Jankowicz-Cieslak J., Laimer M., 2017. Chemical and Pphysical mutagenesis in <i>Jatropha curcas</i>. In: Jankowicz-Cieslak J., T.H. Tai, J. Kumlehn and B.J. Till (Eds) Biotechnologies for Plant Mutation Breeding, Protocols. Springer International</p>	-	5	30%

	<p>Publishing, Switzerland, pp 91-111. DOI: 10.1007/978-3-319-45021-6_2.</p> <p><i>Mój udział procentowy szacuję na 30%. Na mój wkład w powstanie tego rozdziału składają się: opracowanie techniki chemicznej mutagenyzy jatrofy, wykonanie eksperymentów oraz przygotowanie części rozdziału opisującej te procedury. Ponadto wzięłam udział w redagowaniu całości rozdziału przed i po jego recenzji.</i></p>			
6.	<p>Datta S.,* Jankowicz-Cieslak J.,* Nielen S., Ingelbrecht I., Till B. J., 2018. Induction and recovery of copy number variation in banana through gamma irradiation and low coverage whole genome sequencing. <i>Plant Biotechnology Journal</i>; 16(9): 1644-1653. DOI: 10.1111/pbi.12901.</p> <p><i>*Posiadam status pierwszego autora tej publikacji (equal contribution). Mój udział procentowy w jej powstanie szacuję na 35%, a wkład polegał na zainicjowaniu współpracy naukowej (sieci badawczej) w zakresie selekcji banana odpornego na stres biotyczny (<i>Fusarium oxysporum</i> TR4) i opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu mutagenyzy fizycznej materiału banana w warunkach <i>in vitro</i> oraz selekcji zmutowanego materiału do opracowania techniki „copy number variation”. Przeprowadziłam selekcję mutantów wykazujących zwiększoną odporność na atak patogenu, uczestniczyłam w identyfikacji mutacji przy użyciu techniki „next generation sequencing” (NGS), a także w identyfikacji markerów molekularnych. Ponadto uczestniczyłam w analizie, opracowaniu i interpretacji wyników uzyskanych w powyższych eksperymentach. Partycypowałam w przygotowaniu koncepcji publikacji i dokonałam selekcji wyników, które zostały zaprezentowane w tej pracy. Wykonałam wszystkie ryciny i uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu oraz w jego ostatecznym redagowaniu po recenzjach.</i></p>	IF ₂₀₁₇ 6,305	45	35%
7.	<p>Till J. B., Datta S., Jankowicz-Cieslak J., 2018. TILLING: The next generation. In: Varshney R., Pandey M., Chitikineni A. (eds) <i>Plant Genetics and Molecular Biology. Part of the Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology book series (ABE vol 164)</i>, Springer International Publishing AG, pp 139-160. DOI: 10.1007/10_2017_54.</p> <p><i>Mój udział procentowy szacuję na 40%, a wkład w powstanie tego rozdziału polegał na opracowaniu jego koncepcji i struktury. Ponadto przygotowałam wszystkie</i></p>	IF ₂₀₁₇ 2,795	20	40%

	<i>ryciny oraz redagowałam treści tego rozdziału przed i po jego recenzji.</i>			
--	--	--	--	--

¹Impact Factor

²Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **19,083**.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **155**.

Przedstawione prace były cytowane **40** razy wg Web of Science i **61** razy wg Scopus, sumaryczna liczba cytowań z obydwu baz danych wynosi **62**.

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załączniku nr5 do Wniosku.

2.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z opisem ich zastosowań aplikacyjnych.

Liczne czynniki takie jak wzrost populacji ludności, obniżenie jakości gleby, zmiany klimatu czy rosnący popyt na diety oparte na mięsie, mają negatywny wpływ na światowe bezpieczeństwo żywnościowe. Aby w ciągu następnych dziesięcioleci możliwe było zaspokojenie zapotrzebowania na zwiększoną produkcję żywności, konieczne jest wieloaspektowe podejście do tego problemu. Obejmuje ono między innymi wdrażanie zrównoważonych praktyk agronomicznych, zmniejszanie strat żywności oraz poprawę infrastruktury upraw. Jednym z podstawowych elementów bezpieczeństwa żywnościowego jest doskonalenie genetyczne roślin użytkowych w celu zwiększenia ich odporności na szkodniki i choroby oraz na czynniki abiotyczne, a przede wszystkim w celu zwiększenia plonów. Tradycyjne metody hodowli są ograniczone, ze względu na niejednokrotnie limitowany dostęp do zasobów genetycznych roślin oraz ze względu na długi okres wymagany do wyprowadzenia nowych odmian. Mutageneza indukowana oferuje alternatywną, dla tradycyjnych metod hodowli, sprawdzoną opcję uzyskiwania nowych odmian ze zwiększoną odpornością na stresy biotyczne i abiotyczne, ze zwiększonym plonem, oraz z dużym bogactwem innych, ulepszonych cech. Tworzenie kolekcji mutantów nie tylko umożliwia wyprowadzanie nowych i ulepszonych linii, ale przede wszystkim odgrywa znaczącą rolę w badaniach podstawowych, jako kluczowe narzędzie, umożliwiające analizę funkcjonalną genów w regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych.

Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej w Wiedniu jest kuratorem bazy danych mutantów (Mutant Varieties Database), w której do dzisiaj zamieszczono 3299 zarejestrowanych oficjalnie odmian roślin użytkowych, które uzyskano przy zastosowaniu technik mutacyjnych. Większość umieszczonych w niej odmian to rośliny jednoroczne, a szczególnie zboża. Spośród wszystkich zarejestrowanych odmian mutacyjnych, aż 63% zostało wyselekcjonowanych w sposób bezpośredni bez przeprowadzania dalszych introgresji. Wskazuje to na skuteczność odmian elitarnych powstałych w drodze mutagenezy. Intrygujący jest fakt, że jedynie 12% zarejestrowanych odmian reprezentują rośliny rozmnażane wegetatywnie. Może to być częściowo spowodowane faktem, że główne rośliny uprawne spożywane przez człowieka to rośliny nasienne, ale może być to również wynikiem dodatkowych trudności, jakie wiążą się z hodowlą roślin rozmnażanych wegetatywnie. Reasumując, programy badawcze stosujące mutagenezę indukowaną są dla materiału rozmnażanego generatywnie (w szczególności dla zbóż) znacznie bardziej zaawansowane i rozwinięte. Dotyczy to głównie roślin jednorocznych, w przypadku których, w przeciągu kilku lat, można wyprowadzić nowe linie mutantów. Niestety, o wiele mniej osiągnięto w stosowaniu mutagenezy dla materiału rozmnażanego wegetatywnie, a także dla roślin wieloletnich lub drzewiastych. W dużej mierze wynika to ze znacznego stopnia trudności, jaki wiąże się z metodologią generowania zmienności genetycznej na tego typu roślinach. Czynności indukcji mutacji są bardziej złożone i czasochłonne dla materiału rozmnażanego wegetatywnie niż dla nasion, co powoduje, że do tej pory, efektywne metody indukcji oraz identyfikacji zmian wywołanych mutagenami chemicznymi i fizycznymi dla tych roślin nie były dostępne.

Objektami modelowymi moich badań przedstawionych w Osiągnięciu są banan (*Musa*

spp.) oraz jatrofa (*Jatropha curcas* L.). Banan zajmuje czwartą pozycję wśród upraw w krajach rozwijających się oraz stanowi jeden z dziesięciu najważniejszych artykułów żywnościowych w Azji Południowo-Wschodniej, Afryce i Ameryce Łacińskiej. Bananowce, łącznie z odmianami deserowymi (*dessert banana*) i do gotowania (*plantain*), uprawiane są przez drobnych rolników w niskonakładowych systemach rolniczych, jak również przez światowych plantatorów. Są również ważnym towarem eksportowym dla wielu krajów rozwijających się. Połączenie niekiedy słabo rozwiniętych systemów rolnych i warunków środowiska w krajach produkujących te rośliny sprawia, że są one wrażliwe na szybko zmieniające się warunki klimatyczne. Większość jadalnych odmian banana to klony pochodzące z między- i wewnątrz-specyficznej hybrydyzacji diploidalnych form: *Musa acuminata* i *Musa balbisiana*. Ogromna większość jadalnych bananów jest sterylna, partenokarpiczna i triploidalna, co w znaczącym stopniu utrudnia ich ulepszanie. Banan dostępny w sprzedaży, to głównie odmiana deserowa Cavendish stanowiąca aż 45% upraw wszystkich bananów na świecie. Jest ona produkowana na skalę masową przy zastosowaniu kultur *in vitro*, które opracowane zostały w latach 70. dwudziestego wieku. Konsekwencją komercjalizacji produkcji banana na skalę światową jest utrata różnorodności genetycznej i ograniczenie produkcji do jednej odmiany, w której wszystkie rośliny genetycznie są niemal identycznymi klonami. Od 1970 roku odnotowuje się niskie i ciągle spadające plony bananów. Jak dotąd, niekorzystne warunki pogodowe wraz z przypadkami masowego występowania chorób i szkodników zostały określone jako główne ograniczenia uprawy bananowców. Tendencję tę częściowo tłumaczy się zmianami klimatycznymi występującymi coraz częściej na obszarach uprawy banana. Doskonalenie genetyczne rodzaju *Musa* ma na celu tworzenie elity genotypów, które będą wykorzystane w kontekście zrównoważonego i zintegrowanego systemu produkcji roślinnej. Również udoskonalenie uprawy poźniwej i marketingu jest ogólnym celem poprawy życia producentów, przetwórców i konsumentów bananów w regionach tropikalnych, w tym w regionie Afryki Subsaharyjskiej, gdzie brak bezpieczeństwa żywnościowego jest nadal zjawiskiem powszechnym.

Ze względu na ogromne zagrożenie, jakie niesie zmiana warunków klimatycznych dla produkcji banana oraz brak alternatywnych rozwiązań pozwalających na generowanie nowych kombinacji allelicznych, banan jest idealnym kandydatem do zastosowania mutagenyzy indukowanej.

Jatropha curcas L. to wieloletni, jednopienny krzew, należący do rodziny Euphorbiaceae, pochodzący z Ameryki, ale rozproszony na obszarach tropikalnych i subtropikalnych. Jatrofa jest szeroko uprawiana dla nasion, z których tłoczy się olej. Znajduje on główne zastosowanie w przemyśle, w produkcji biopaliw. Nasiona jatrofy mogą też być spożywane po upieczeniu. Interesującym jest fakt, że różne części jatrofy są bogate w metabolity oraz lecznicze składniki. Dzięki temu, jatrofa ma zastosowanie w produkcji oleju stosowanego w lampach, produkcji mydła, farb a przede wszystkim jest wykorzystywana w lecznictwie. Ponadto, tzw. *press-cake* będący pozostałością z produkcji oleju, jest bardzo bogaty w proteiny (60-63%) i może stanowić alternatywę dla innych produktów o ich niższej zawartości. Dzikie typy *J. curcas* mogą dobrze rosnąć nawet w bardzo niekorzystnych warunkach klimatycznych i glebowych. Wytwarzanie kontrolowane ulepszonych typów jatrofy jest trudne ze względu na ograniczoną zmienność genetyczną, a także na wydłużony okres oczekiwania na kolejne pokolenia. Ponadto,

jatrofa należy do grupy tzw „*neglected crops*”, roślin słabo poznanych i zaniedbanych przez badaczy. Kombinacja metod *in vitro* oraz mutagenyzy indukowanej może ułatwić generowanie nowych odmian. Pracę nad jatrofą rozpoczęłam w wyniku długoletniej współpracy z dr hab. Fatemeh Maghuly, ze względu na możliwość adaptacji u jatrofy metod opracowanych na bananie.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki oraz możliwości, jakie niesie ze sobą stosowanie mutagenyzy indukowanej u roślin rozmnażanych wegetatywnie, a także u roślin wieloletnich oraz drzewiastych, a zarazem z uwagi na ubogie informacje na temat efektywności i stabilności mutacji indukowanych w materiale *in vitro*, do celów prowadzonych badań, stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe, należały:

1. Opracowanie nowych technik ulepszania roślin rozmnażanych wegetatywnie oraz roślin wieloletnich, przez otrzymanie nowej zmienności w drodze mutagenyzy chemicznej oraz detekcji mutacji przy zastosowaniu metod odwrotnej genetyki.
2. Identyfikacja procesu utrwalenia mutacji indukowanych w materiale rozmnażanym w sposób wegetatywny oraz określenie częstotliwości mutacji i ich dziedziczenia w genomie banana.
3. Wykorzystanie mutagenyzy chemicznej i fizycznej do tworzenia platform analizy funkcjonalnej genów oraz do zastosowań aplikacyjnych.
4. Identyfikacja naturalnej zmienności genetycznej roślin uprawnych ważnych ekonomicznie przy zastosowaniu metod molekularnych.

2.4. Szczegółowy opis prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedstawiono poniżej.

Opracowanie nowych technik ulepszania roślin rozmnażanych wegetatywnie oraz roślin wieloletnich, przez otrzymanie nowej zmienności w drodze mutagenyzy chemicznej oraz detekcji mutacji przy zastosowaniu metod odwrotnej genetyki (Jankowicz-Cieslak et al., 2017 i Maghuly et al., 2017).

Kluczowymi narzędziami umożliwiającymi analizę funkcjonalną genów w regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych są kolekcje mutantów. W cyklu prezentowanych publikacji przedstawiam opracowane przeze mnie metody wykorzystujące mutagenzę jako źródło zmienności genetycznej roślin rozmnażanych wegetatywnie, na przykładzie banana jak również roślin wieloletnich, na przykładzie jatrofy, których ulepszenie może być efektywnie prowadzone dzięki wprowadzeniu metod *in vitro* do programu mutagenyzy indukowanej. Ta strategia umożliwiła powstanie szerokiej kolekcji mutantów, zarówno dla banana jak i jatrofy, i w dalszych etapach mojej kariery naukowej została zaadaptowana w licznych projektach wewnętrznych prowadzonych przez zespół badawczy Plant Breeding and Genetics Laboratory (mutageneza manioka, cytrusa, kawy).

W pierwszym etapie opracowania metody skoncentrowałam się na wyborze czynnika mutagennego. Wybór ten jest jednym z kluczowych elementów wpływających na powstanie kolekcji mutantów oraz spektrum indukowanych mutacji. Ponieważ jednym z moich celów badawczych było przeprowadzenie analiz populacji z zastosowaniem odwrotnej genetyki (TILLING), wybór mutagenu zawężyłam do mutagenów chemicznych. Spośród obecnie stosowanych mutagenów chemicznych na uwagę zasługuje siarczan etylowo-metylowy (*ethyl methanesulfonate* - EMS), którego skuteczność w uzyskaniu mutacji genowych o charakterze punktowym jest opisana w licznych publikacjach dotyczących tworzenia populacji mutacyjnych do celów funkcjonalnej genomiki dla roślin rozmnażanych generatywnie. W związku z faktem, że wielkość efektu mutagennego zależy od stężenia mutagenu w roztworze, czasu działania, jak również genotypu oraz ploidalności rośliny jak i użytego do badań rodzaju materiału wyjściowego, wszystkie te czynniki przeanalizowałam i uwzględniłam w trakcie opracowania metodyki mutagenezy chemicznej. Czynniki takie jak stężenie oraz czas inkubacji dobrałam na drodze eksperymentalnej. Ponieważ moja praca była pionierska, najpierw skoncentrowałam się na poznaniu zachowania się materiału *in vitro* w trakcie przeprowadzania eksperymentu.

Wrażliwość merystemów triploidalnego banana na działanie EMS oszacowałam poprzez dwu- oraz czterogodzinną inkubację materiału *in vitro* w 4 różnych stężeniach mutagenu (0,25%, 0,5%, 1%, i 1,5%) oraz pomiarach wykonanych 30 dni po wykonaniu mutagenezy. Dawkę śmiertelną mutagenu uzyskano dla najwyższej koncentracji (1,5%) EMS oraz czterogodzinnej inkubacji. W przypadku inkubacji dwugodzinnej uzyskano 100% przeżywalności dla wszystkich testowanych koncentracji. Drugim parametrem, który wybrano do oszacowania wrażliwości materiału *in vitro* na działanie mutagenu chemicznego był procent redukcji świeżej masy materiału zmutowanego w porównaniu do niezmutowanej kontroli. Opracowanie stężeń ramowych EMS pozwoliło na wybranie koncentracji mutagenu do przeprowadzenia eksperymentu w populacji *in vitro* banana liczącej 4000 merystemów. Mutagenezę zdywersyfikowano poprzez kombinacje stężenia i czasu inkubacji, dzieląc populację na cztery partie, każda licząca 1000 merystemów. Dawka wyjściowa, oparta o badania wstępne, wynosiła 1% i trzygodzinny czas inkubacji dla pierwszej partii, dla następnych zmniejszono stężenie i zwiększono czas inkubacji. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyprowadzenie hipotezy dotyczącej efektu toksyczności, jaki może mieć czas absorpcji EMS, przy pewnych jego stężeniach, na przeżywalność komórek w kulturach *in vitro*.

W efekcie, uzyskano populację banana generacji M1V1 liczącą 3004 zmutowanych merystemów. Tę populację wykorzystywałam między innymi do analiz zmienności przeprowadzonych przy zastosowaniu metody odwrotnej genetyki, po wcześniejszej adaptacji tej techniki dla materiału wegetatywnie rozmnażanego. W celu przygotowania zmutowanego materiału triploidalnego banana do dalszych analiz, wykonałam 3 cykle mikrorozmnażania. Krok ten wykonano w celu zmniejszenia wielkości sektorów chimeralnych, niosących różne mutacje, tak, aby rośliny pochodzące z tych materiałów były genotypowo jednorodne ze wszystkimi tkankami zawierającymi indukowane mutacje. Aby dokonać obserwacji, kiedy merystemy przestają być w stanie chimeralnym, wprowadziłam system pozwalający na śledzenie w sposób precyzyjny powiązań pomiędzy roślinami wygenerowanymi z tego samego wyjściowego mutantu generacji M1V1.

Opracowanie techniki mutagenyzy materiału w warunkach *in vitro* było pionierskie i zapoczątkowało dalsze badania, które były istotne dla rozwoju mojej kariery naukowej. Mutagenyza chemiczna w warunkach *in vitro* może mieć zastosowanie w ulepszaniu szeregu gatunków roślin rozmnażanych wegetatywnie, w sposób obligatoryjny, a także fakultatywny oraz dla roślin, dla których systemy *in vitro* umożliwiają szybszą produkcję materiału, w tym gatunków o znaczeniu handlowym i tych, które mają znaczenie dla bezpieczeństwa żywnościowego w krajach rozwijających się. Jedną z kolejnych roślin, dla których przeprowadziłam adaptacje mutagenyzy chemicznej przy zastosowaniu systemu *in vitro* była jatrofa.

W serii publikacji stanowiących moje osiągnięcie, opisuję opracowane przez mnie metody przeprowadzenia mutagenyzy w warunkach *in vitro* na przykładzie banana i jatrofy. Ze względu na wysoką toksyczność mutagenów chemicznych, moje opracowania zawierają też omówienie koniecznych środków bezpieczeństwa i ochrony w trakcie przeprowadzania eksperymentów, jak również neutralizacji oraz usuwania mutagenu.

Identyfikacja procesu utrwalenia mutacji indukowanych w materiale rozmnażanym w sposób wegetatywny oraz określenie częstotliwości mutacji i ich dziedziczenia w genomie banana (Jankowicz-Cieslak et al., 2012).

Za najbardziej wartościowe i znaczące osiągnięcie mojego dorobku naukowego uważam badania zaprezentowane w *Jankowicz-Cieslak et al., 2012*, gdzie wykazałam, że mutacje mogą być indukowane i stabilnie dziedziczone w materiale wegetatywnie rozmnażanym. Badania te prowadziłam z zastosowaniem strategii odwrotnej genetyki przy zastosowaniu techniki TILLING. W tym celu wykorzystałam populację M1V1 triploidalnego banana.

Do analizy wybrano 11 genów biorących udział w różnych procesach biologicznych. W drodze reakcji odwrotnej genetyki, zidentyfikowano 33 mutacje punktowe. Po przeprowadzonej walidacji z zastosowaniem sekwencjonowania Sangera wykazano, że wszystkie mutacje są zmianami o charakterze substytucji G/C-A/T. Po przeprowadzeniu analizy spektrum indukowanych mutacji wykazano, że mutacje ciche stanowiły 36% wszystkich zmian, natomiast mutacje zmiany sensu 49%. Mutacje powodujące tzw. zmianę „*truncation*” (mutacje nonsense i splice junction) stanowiły 15%. Wszystkie zmiany poddane sekwencjonowaniu Sangera miały charakter heterozygotyczny. Z wcześniejszych badań nad działaniem mutagenów chemicznych jednoznacznie wynika, że EMS powoduje głównie zmiany typu G/C do A/T. Wykazano zatem, że zmiany genetyczne zaobserwowane w populacji triploidalnego banana powstały w wyniku aktywności mutagenu.

Ilość mutacji jest uzależniona od ploidalności i dotychczasowe wyniki wskazywały na dodatnią korelację tych wielkości. W wyniku analizy mutantów banana, przy zastosowaniu metody TILLING, teoria ta została potwierdzona. Dla określenia częstotliwości mutacji w przypadku triploidalnego banana wprowadzono nową terminologię Mitotic Mutation Density (MMD). MMD dla banana oszacowano na 1/57 kb. Biorąc pod uwagę wielkość genomu banana 520 Mb, oraz częstotliwość mutacji 1/57 kb, średnio każda roślina zawiera około 10 000 indukowanych alleli. Wynik ten sygnalizuje, że optymalizacja procedury indukcji mutacji dla materiału banana jest wysoce efektywna.

Poprzez pomiar dziedziczności mutacji w kolejnych pokoleniach wykazano, że większość komórek totipotentnych była genetycznie homogeniczna już w trakcie pierwszego cyklu mikropropagacji zmutowanego materiału banana, czyli około miesiąca po przeprowadzeniu eksperymentu. Wniosek ten był raczej zaskakujący i ostatecznie doprowadził do sformułowania przez mnie nowej teorii, wyjaśniającej zachowanie się komórek merystematycznych pod wpływem czynnika mutagennego. Według tej teorii, wszystkie komórki materiału w wyniku działania EMS, gromadzą mutacje substytucyjne w genomie jądrowym w sposób losowy. Tak powstałe komórki charakteryzują się wysokim poziomem zróżnicowania genotypowego i różną zdolnością do podziałów. Komórki dzielące się najszybciej mogą zdominować region merystemu wierzchołkowego, prowadząc do utrwalenia się pojedynczego genotypu.

Trzy zmutowane allele dwóch genów, MALSYN (*Malate synthase*) oraz FTSJMT (*Ftsj-like methyltransferase family protein*) zostały wybrane do oceny stopnia dziedziczności oraz stabilności indukowanych zmian w warunkach kultur *in vitro*. Rośliny ze zmutowanymi allelami mikropropagowano przez kolejne 12 miesięcy i poddano analizie na obecność/brak zmutowanych alleli. Sekwencjonowanie Sangera wykazało obecność zmian w 100% analizowanego materiału banana. W ten sposób wykazano, że utrwalone nowe genotypy są stabilnie dziedziczone w kolejnych, wegetatywnych pokoleniach.

Mutacje indukowane, takie jak te wywołane przez EMS, powodują akumulację zmian o charakterze heterozygotycznym, w wyniku których zmienia się tylko jedna kopia genu. W przypadku roślin rozmnażanych generatywnie tworzenie homozygot osiąga się poprzez samozapylanie lub krzyżowanie z roślinami rodzicielskimi. W przypadku banana i innych roślin rozmnażanych wegetatywnie jedynie fenotypy dla cech dominujących mogą być widoczne. W związku z tym, jeśli roślina jest heterozygotyczna (np. Aaa), to mutacja allelu dominującego 'A' w kolejny recesywny 'a' może spowodować ujawnienie fenotypu. Potencjał mutacji wywołanych w moim materiale badawczym zaobserwowano na etapie analizy fenotypowej grupy mutantów. Analizę tę przeprowadziłam w warunkach szklarniowych dla 109 mutantów triploidalnego banana. Zmiany fenotypowe zanotowano dla 91% analizowanych roślin co sugeruje efektywność mutagenu chemicznego w indukowaniu mutacji punktowych w materiale triploidalnego banana w warunkach *in vitro*.

Poza analizą TILLING, w populacji mutacyjnej przeprowadzono analizę obecności naturalnej zmienności nukleotydów, która wykazała wysoki stopień kumulacji potencjalnie szkodliwych alleli w stanie heterozygotycznym w materiale banana. Analizę przeprowadzono na 8 genach, dla których zaobserwowano 132 zmiany, w 75% ciche (*silent*), w 25% zmiany sensu (*missense*). Osiem procent zmian sensu miało potencjalnie charakter negatywny dla funkcji białka. Pięćdziesiąt pięć procent mutacji zmian sensu wykazało heterozygotyczność w porównaniu do sekwencji referencyjnej. Allele w stanie heterozygotycznym wykryto w 4 z 8 analizowanych genów.

Wykorzystanie mutagenezy chemicznej i fizycznej do tworzenia platform analizy funkcjonalnej genów oraz do zastosowań aplikacyjnych (Datta et al., 2018).

Choroby roślin stanowią poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego na świecie. Przewiduje się, że zmieniające się warunki klimatyczne mogą korzystnie wpłynąć na

pojawienie się nowych odmian patogenów, a co za tym idzie, zwiększoną podatność roślin na choroby, powodując ogromne straty plonów. Banany Cavendish są szczególnie wrażliwe na choroby, między innymi Fusarium wilt wywołane przez *Fusarium oxysporum* (Foc) rasy TR4 (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race four). Fusarium wilt jest najpowszechniejszą chorobą atakującą banany, która jest uważana za jedną z najbardziej destrukcyjnych chorób roślin uprawnych. W roku 1900, Foc rasa 1 niemal całkowicie wyniszczyła przemysł eksportu bananów oparty na bananach Gros Michel. Zniszczenie komercyjnych plantacji eksportowych w Ameryce Środkowej pociągnęło za sobą straty najlepszych gruntów rolnych przewyższające 40 468 ha. Produkcja eksportowa odzyskała swój dawny poziom dopiero wtedy, gdy Gros Michel został zastąpiony bananami Cavendish w latach 60-tych. Banany Cavendish wykazują odporność na rasę Foc 1. i obecnie stanowią 44% wszystkich bananów uprawianych na świecie. Niestety, nowa rasa Foc TR4 poważnie zagraża ich uprawom. Do tej pory obecność Foc TR4 potwierdzono w 9 krajach. Dalsze rozprzestrzenianie się patogenu stanowi ogromne zagrożenie dla światowej produkcji banana, głównie z powodu braku komercyjnego zamiennika dla odmiany Cavendish, który byłby odporny na TR4 (Fusarium wilt nie można kontrolować za pomocą innych środków niż stosowanie odmian odpornych na choroby). Wszystkie słodkie odmiany bananów uprawiane na świecie są podatne na Foc TR4, a ponieważ bananów Cavendish nie można udoskonalić dzięki konwencjonalnej hodowli roślin, alternatywne sposoby typu mutageneza indukowana wydają się być jedynym możliwym rozwiązaniem.

W oparciu o wcześniejsze doświadczenie w efektywnym indukowaniu mutacji w materiale rozmnażanym wegetatywnie celem zwiększenia różnorodności genetycznej, uzyskano nową populację mutacyjną. Pięć tysięcy merystemów banana Cavendish poddano mutagenezie chemicznej oraz fizycznej przy zastosowaniu odpowiednio EMS oraz promieniowania jonizującego gamma i X. Proces identyfikacji nowych mutacji jest procesem długotrwałym, szczególnie, gdy jest on połączony z fenotypową selekcją skierowaną na izolację udoskonalonych linii mutantów. Moje wcześniejsze badania wykazały wysoką skuteczność oraz efektywne działanie mutagenu chemicznego EMS w kulturach *in vitro*. Jeśli chodzi o promieniowanie jonizujące gamma i X, dopiero nowe techniki sekwencjonowania pozwalają na precyzyjne określenie spektrum mutacji wywołane ich działaniem. Nie wiemy jednak jak stabilne jest dziedziczenie takich mutacji w przypadku materiału rozmnażanego wegetatywnie. W celu ustalenia skuteczności działania mutagenów fizycznych oraz wykazania, czy mutacje te są stabilne przez kolejne pokolenia, wykonano dwuetapowe badania z zastosowaniem sekwencjonowania DNA nowej generacji. We wcześniejszych badaniach wykazano, że banan charakteryzuje się wysoką kumulacją naturalnych alleli w stanie heterozygotycznym. W związku z tym oraz aby ułatwić analizę bioinformatyczną wyników sekwencjonowania, do analizy efektów działania promieniowania jonizującego gamma zaadaptowano technikę *low-coverage whole-genome sequencing* (LC WGS) oraz analizę *copy number variation* (CNV). W pierwszym etapie, do analizy użyto odmianę 'Novaria' (triploid AAA). Jest to odmiana, która w roku 1995 została wyprowadzona w procesie mutagenezy indukowanej z zastosowaniem promieniowania jonizującego gamma i jak dotąd stanowi jedyną komercyjną odmianę banana będącą mutantem. Cechy ulepszone, jakie charakteryzują 'Novarię' to wczesne dojrzewanie oraz lepsza jakość owoców.

W wyniku analizy LC WGS wykryto 10 dużych delecji genomowych wielkości od 0,3 do

3,8 milionów par zasad (Mbs). Badanie ontologii genów regionów zmutowanych wykazało szereg genów dotkniętych zmianą liczby kopii z 3 do 2 (ze stanu triploidalnego do diploidalnego). Wykazano, że 189 genów straciło jedną kopię. Geny te zaangażowane są w różne procesy, takie jak: ekspresja genów, biogeneza komórkowa, fosforylacja białek, wiązanie białek i DNA oraz składniki błonowe. Walidacji zmian dokonano przy zastosowaniu metody ilościowego PCR.

Na podstawie wyników, jakie uzyskano dla oficjalnie zarejestrowanej odmiany mutacyjnej banana 'Novaria', analizy LC WGS wykonano także dla podgrupy gamma-mutantów wchodzących w skład nowo przygotowanej populacji mutacyjnej. Mutacje delecyjne zidentyfikowano dla 70% linii mutantów wygenerowanych w drodze mutagenyzy fizycznej przy zastosowaniu dawki 20 Gy oraz 60% linii, dla dawki 40 Gy. Wynik ten wskazuje na dużą skuteczność procesu indukcji mutacji przy zastosowaniu promieniowania gamma.

W celu weryfikacji mojej teorii wyjaśniającej zachowanie się komórek merystatycznych po potraktowaniu czynnikiem mutagennym, dwa klony jednego z mutantów poddano sekwencjonowaniu (LC WGS) i wykazano obecność 18 delecji wielkości około 20,5 Mbp w obydwu zanalizowanych osobnikach.

W ramach współpracy z dr. Chih-Ping Chao, blisko 600 osobników reprezentujących dwie populacje mutacyjne (podgrupę wygenerowaną przy zastosowaniu EMS jak i drugą, wygenerowaną przy zastosowaniu mutagenu fizycznego) wysłano do Tajwanu w celu identyfikacji poziomów odporności banana na stres biotyczny z wykorzystaniem Foc TR4. Analizę fenotypową przeprowadzono w warunkach *ex vitro* w specjalnie do tego celu przystosowanych szklarniach spełniających warunki kwarantanny. Spośród materiału jaki został poddany analizom, 23 linie mutantów nie wykazały symptomów infekcji. Jedynie cztery procent spośród 23 linii mutantów stanowiły mutanty pochodzące z mutagenyzy chemicznej, pozostałe natomiast były mutantami wytworzonymi przy zastosowaniu mutagenu fizycznego.

W wyniku wieloletniej pracy nad bananem wykazałam, że techniki indukcji mutacji przy zastosowaniu mutagenów fizycznych i chemicznych są wysoce skuteczne we wprowadzaniu nowej zmienności genetycznej w materiale rozmnażanym wegetatywnie. Wynik, który uzyskano w badaniach na populacji wyżej opisanej sugeruje, że odporność na Foc TR4 można zwiększyć stosując mutagenezę indukowaną. Interesującym zagadnieniem jest różnica pomiędzy liczbą mutantów niewykazujących symptomów infekcji Foc TR4, wyprodukowanych przy zastosowaniu mutagenu chemicznego (EMS) i fizycznego (promieniowanie gamma). EMS indukuje tylko zmiany pojedynczych nukleotydów stanowiące mutacje ciche lub zmiany sensu, co u triploidalnego banana może nie dawać skutków fenotypowych. Natomiast promieniowanie jonizujące generuje głównie delecje, co może usuwać większe fragmenty genomu. Delecja niekorzystnego allelu może dać możliwość ujawnienia się pozostałych alleli w danym locus, np. jak w danym przypadku, odpowiadające za odporność na tę rasę. Dlatego w trakcie przeprowadzania testu odpowiedzi na Foc TR4, większa liczba mutantów z populacji napromieniowanej wykazała odporność na Foc TR4. Jak zaobserwowano w przypadku mutacyjnej odmiany 'Novaria', delecja milionów par zasad objęła ponad 100 genów powodując drastyczny wpływ na ekspresję genów i w efekcie większe spektrum konsekwencji fenotypowych.

Identyfikacja naturalnej zmienności genetycznej roślin ważnych ekonomicznie przy zastosowaniu metod molekularnych (Maghuly et al., 2015).

Zagadnienie zmienności naturalnej znajdowało się w centrum moich zainteresowań od początku kariery naukowej. Pracując w dziedzinie mutagenyzy indukowanej, wiedza na temat poziomu zmienności naturalnej jest krytyczna i dlatego poziom tej zmienności powinien być oszacowany dla każdego organizmu przed przystąpieniem do programu mutagenyzy.

Głównym celem genetycznej poprawy jatrofy jest wyprodukowanie nowych odmian charakteryzujących się wysoką wydajnością nasion, wysoką zawartością oleju i niską ilością toksyn. Aby przyczynić się do procesu poprawy wydajności nasion, identyfikacja naturalnej zmienności genów odpowiedzialnych za te cechy jest ważna. W tym celu przeprowadzono badania z wykorzystaniem metody EcoTILLING w kierunku analizy naturalnej zmienności populacji składającej się z 907 osobników jatrofy. Analizy oparto na sekwencjach 12 genów kodujących takie cechy jak produkcja oleju, produkcja toksyn, a także rozwój nasion. Ponieważ *single nucleotide polymorphism* (SNP) w regionach kodujących są na ogół rzadsze niż w regionie niekodującym, w trakcie planowania par starterów zastosowano kombinację regionów kodujących i niekodujących, co miało na celu zwiększenie liczby zidentyfikowanych SNP. Wśród różnych strategii grupowania pojedynczych próbek, DNA osobników jatrofy zgrupowano w pulach zawierających 8 DNA. Pulowanie tej wielkości pozwoliło na łatwą detekcję SNP. W trakcie analizy wykazano, że liczba polimorficznych SNP była dla badanych osobników bardzo niska, jednak EcoTILLING pozwolił na rozdzielenie osobników pochodzących z Meksyku od innych jatrof, jak również na oddzielenie grupy zawierającej osobniki toksyczne od nietoksycznych. Co ciekawe, wysoką zmienność wykazano jedynie w genie kodującym kurcyny (białko podobne do rycyny).

Wyniki badań EcoTILLING wskazały, że jatrofa charakteryzuje się bardzo niską zmiennością genetyczną. W związku z tym, mutagenyza indukowana zwiększająca zmienność wydaje się być najlepszym rozwiązaniem dla programów hodowlanych wymagających dostępności różnorodności genetycznej. Dalsze badania w zakresie indukowania nowej zmienności zainicjowano przy zastosowaniu materiału jatrofy w warunkach *in vitro*. Populację mutantów liczącą 1200 osobników wykorzystano do analizy poziomu zmienności indukowanej. Analizę wykonano przy zastosowaniu metody TILLING by Sequencing (TbS). Bioinformatyczne analizy wykazały wysoką liczbę indukowanych zmian. Wyniki są obecnie walidowane.

Poza wyżej opisanymi pracami badawczymi, w skład mojego Osiągnięcia wchodzi dwie prace przeglądowe, *Jankowicz-Cieslak et al., 2015* oraz *Till et al., 2018*, które w sposób bardzo wyraźny demonstrują ewolucję metodyki detekcji mutacji w ostatnich latach, oraz dyskutują potencjał jaki niesie ze sobą technika sekwencjonowania nowej generacji.

Najważniejsze osiągnięcia metodyczne, poznawcze i aplikacyjne zaprezentowanych badań:

- a. Opracowanie metod mutagenyzy chemicznej i fizycznej materiału roślinnego w

warunkach *in vitro* dla roślin rozmnażanych wegetatywnie i wieloletnich.

- b. Wykazanie, że, zastosowanie mutagenu chemicznego EMS indukuje w genomie banana mutacje genowe typu substytucji G/C do A/T z wysoką częstotliwością. Powstałe sektory chimeralne mogą być szybko rozwiązane w drodze mechanizmu selekcji wewnątrzsomaticznej. Ponadto wykazano, że indukowane mutacje punktowe są stabilnie dziedziczone w liniach rodzeństwa przez wiele wegetatywnych pokoleń.
- c. Ustalenie, że chimeralność powstała w wyniku mutagenezy *in vitro* zanika już w trakcie pierwszego cyklu mikropropagacji zmutowanego materiału, na skutek działania mechanizmu selekcji wewnątrzsomaticznej.
- d. Wykazanie, że mutanty banana zidentyfikowane w ramach opracowanych protokołów *forward genetics*, charakteryzują się fenotypowymi różnicami, co świadczy o efektywności procesu mutagenezy.
- e. Wykazanie, że mutageneza fizyczna powoduje duże delecje o wielogenowym efekcie, które są stabilnie klonowane przez wiele pokoleń wegetatywnego rozmnażania. Delecje te mają wpływ na zmienność liczby kopii alleli w triploidalnym genomie.
- f. Opracowanie metody LC WGS z wykorzystaniem technologii NGS, umożliwiającej detekcję dużych delecji genomowych u triploidalnego banana.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

3.1. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora.

Studia rozpoczęłam w 1995 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Na czwartym roku studiów rozpoczęłam praktyki w Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii przygotowujące do wykonania pracy magisterskiej. Jej część doświadczalną rozpoczęłam w październiku 1999 roku pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Kosz-Vnenchak. Celem moich doświadczeń było opracowanie techniki *in situ* PCR oraz zastosowanie jej w diagnostyce wirusa opryszczki typu 1. Dodatkowo, rozpoczęłam badania nad optymalizacją metody *in situ* RT-PCR, które były kontynuowane przez kolejnych magistrantów. Pracę magisterską pt. "*Zastosowanie metody in situ PCR do badania latencji wirusa opryszczki typu 1*" obroniłam 9 czerwca 2000 roku uzyskując tym samym tytuł magistra w zakresie specjalności biologia molekularna.

We wrześniu 2000 r. rozpoczęłam staż naukowy w Zakładzie Systematyki Roślin Wyższych i Ewolucji Instytutu Botaniki Uniwersytetu Wiedeńskiego. W trakcie stażu zostałam zatrudniona w charakterze pracownika naukowego (asystenta) w projekcie badawczym prowadzonym przez prof. Samuel. Po odbyciu szkolenia z zakresu metodyki AFLP prowadziłam samodzielnie badania dotyczące analizy filogenetycznej południowoamerykańskich gatunków *Hypochoeris* (Asteraceae), a w późniejszym okresie

także gatunku *Hepatica maxima* (Ranunculaceae). Wyniki tych badań zostały przedstawione w postaci monografii [A1.1], artykułu w czasopiśmie z listy filadelfijskiej [A.1] oraz zaprezentowane na konferencji [C1.1].

Rozwijając swoje zainteresowania naukowe we wrześniu 2001 roku rozpoczęłam badania w kierunku pracy doktorskiej w Austriackim Centrum Naukowym w Seibersdorfie. Temat mojej rozprawy doktorskiej został sformułowany jako: „*Identification of adaptation specific differences in the mRNA expression profile of drought stressed sweet potato (Ipomea batatas)*”. Moja praca doktorska dotyczyła konstrukcji mikromacierzy cDNA do celów analizy ekspresji genów w odpowiedzi na stres suszy oraz przeprowadzenia takiego stresu u batata z zastosowaniem do analiz opracowanych przeze mnie mikromacierzy [A.2 i C1.2 – C1.6, C1.8 – C1.10]. Rozprawę doktorską przygotowaną pod opieką dr Kornela Burga oraz opieką uniwersytecką prof. dr. hab. Jerzego Kruka, obroniłam na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie i uchwałą Rady Wydziału z 28 października 2011 uzyskałam dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

W międzyczasie, po zakończeniu pracy nad częścią doświadczalną mojego doktoratu oraz po upływie trzyletniego kontraktu badawczego na wykonanie badań doktorskich, z sukcesem przeszłam procedury aplikacyjne i rekrutacyjne i w październiku 2004 roku rozpoczęłam pracę w Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (International Atomic Energy Agency - IAEA) w grupie kierowanej przez dr. Chikelu Mba. Od początku zatrudnienia brałam udział w interdyscyplinarnych badaniach eksperymentalnych dotyczących mutagenetyki oraz mających na celu efektywną identyfikację zmian wywołanych mutagenami. W trakcie mojej pracy odegrałam znaczącą rolę w tworzeniu i organizacji nowego laboratorium naukowo-badawczego w zakresie współczesnych technik biologii molekularnej, laboratorium odwrotnej genetyki (*reverse genetics*) oraz laboratorium sekwencjonowania nowej generacji (*next generation sequencing*, NGS). Od początku zatrudnienia brałam także udział w modernizacji innych laboratoriów należących do Plant Breeding and Genetics Laboratory, we wprowadzaniu innowacyjnych rozwiązań w sferze eksperymentalnej a także w przeprowadzaniu szkoleń indywidualnych oraz kursów grupowych. Przed moim zatrudnieniem zespół dr. Mba zajmował się głównie badaniami z zakresu fenotypowania mutantów oraz aplikacji markerów molekularnych takich jak AFLP lub RAPD do szacowania poziomu zmienności indukowanych. Metody te były nieefektywne i nie spełniały swojej roli w zakresie określania zmienności indukowanej. Pragnę dodać, że od początku mojego zatrudnienia do roku 2007 byłam jedynym biologiem molekularnym w grupie. W tym też okresie znacząco ukierunkowałam badania wykonywane w zespole Plant Breeding and Genetics Laboratory.

Od 2004 roku, moja praca naukowa skupiała się na roślinach rozmnażanych wegetatywnie. Do 2011 roku zespół Plant Breeding and Genetics pracował wyłącznie na trzech gatunkach: bananie (*Musa acuminata*), manioku (*Manihot esculenta*) oraz ryżu (*Oryza sativa*), które stanowiły materiał stosowany do opracowywania nowych technik oraz do prowadzenia badań interdyscyplinarnych. Od początku moje zainteresowania naukowe skupiły się na bananie. Ze względu na interdyscyplinarny charakter moich badań, miałam możliwość znacznego poszerzenia wiedzy oraz doświadczenia praktycznego o nowe dziedziny biologii i biotechnologii. Między innymi opanowałam technikę zakładania i prowadzenia kultur *in vitro*, które stały się jedną z ważniejszych metod stosowanych w moich dalszych badaniach.

Pracując w zespole dr. Mba byłam też nadal ściśle związana z interesującą mnie od czasu pracy nad doktoratem tematyką stresu suszy. W tym okresie nawiązałam współpracę z prof. Marcinem Rapaczem, której celem była analiza fenotypowa banana w odpowiedzi na stres suszy. Projekt ten był finansowany ze środków wewnętrznych Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej i częściowo stanowił również temat pracy magisterskiej dr Marty Brożyńskiej.

Celem badawczym tego projektu była obserwacja odpowiedzi fizjologicznych na warunki suszy glebowej zestawu 37 genotypów banana (*Musa sp.*) stosowanych na całym świecie, jako odmiany referencyjne w genomice oraz doskonaleniu genetycznym tych roślin. Jednocześnie chciano ustalić, czy pośród badanych odmian istnieje zróżnicowanie odporności na suszę w oparciu o jej wpływ na procesy regulujące uwodnienie tkanek, wymianę gazową, fotochemiczną aktywność fotosystemu II oraz zróżnicowanie izotopów węgla. W trakcie badań wykazano, że odmiany bananowca charakteryzują się bardzo zróżnicowanymi fizjologicznymi reakcjami na suszę glebową. Mimo ostrego stresu wodnego bananowce odznaczają się wysokim stanem względnego turgoru w liściach. Bananowiec jest bardzo wrażliwy nawet na małe niedobory wody w glebie i już przy 80% połowej pojemności wodnej wykazuje ograniczenia parametrów wymiany gazowej. U bananowców, tak jak u większości roślin C3, zróżnicowanie izotopów węgla oscyluje wokół wartości 20%. Wyniki analiz zróżnicowania izotopów węgla wskazują na możliwość zwiększania intensywności karboksylacji do PEP w warunkach suszy u części genotypów bananowca. Najistotniejszym wynikiem tych badań było wykazanie braku udziału genomu B bananowca w zwiększonej odporności na warunki suszy glebowej. Wyniki z tej pracy przedstawiono na konferencjach naukowych w formie plakatu oraz wystąpień [C1.13, C1.18, C1.23, C1.26, C1.29, C2.3, C2.17, C2.18, C2.28].

Kolejnym zagadnieniem, nad którym zaczęłam pracować przed uzyskaniem tytułu doktora była analiza naturalnej zmienności wyżej omówionych genotypów banana przy zastosowaniu techniki EcoTILLING, którą zaadaptowano dla potrzeb identyfikacji zmienności naturalnej występującej wśród odmian o różnej ploidalności. Dla oceny zależności pomiędzy odmianami banana wykonano ocenę poziomu heterozygotycznego polimorfizmu. Następnie zgrupowano materiał badany w bloki haplotypu, które wykazały wysoki poziom różnorodności nukleotydów w badanym materiale. Przeanalizowano 14 genów dla 80 odmian banana. Wykryto ponad 6000 polimorficznych zmian przedstawiających 870 unikatowych alleli. Odkryte SNPs poddano walidacji przy zastosowaniu sekwencjonowania Sangera. W przeanalizowanych sekwencjach wykazano obecność jedynie SNPs. Nie zaobserwowano ani InDels (*insertions and deletions*), ani powtórzeń satelitarnych. W trakcie walidacji pojedynczych SNPs, zidentyfikowano dwa, które mogą być szkodliwe dla funkcji genu związanego z procesem fototropizmu. Wyniki tych badań zaprezentowano w [A.3] oraz w trakcie wystąpień konferencyjnych [C1.11, C1.15].

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych po doktoracie.

Poza przedstawionym cyklem publikacji powiązanych tematycznie, mój dorobek obejmuje inne badania, z których najbardziej istotne opisuję poniżej.

4.1. Mapowanie zmian wywołanych w genomie ryżu przez mutagenезę promieniowaniem

gamma i X.

W trakcie realizacji projektu IAEA D2.40.12 pt *“Enhancing the Efficiency of Induced Mutagenesis through an Integrated Biotechnology Pipeline”* rozpoczęłam badania naukowe na ryżu. Celem moich badań było utworzenie kolekcji mutantów oraz wyprowadzenie nowych linii dla analiz przy zastosowaniu techniki *„forward genetics”*. Populacje mutantów wytworzyłam stosując mutageny fizyczne: promieniowanie jonizujące gamma oraz X. W początkowej fazie, celem moich badań było opracowanie metod efektywnego fenotypowania mutantów i szybkiej selekcji nowych linii. W efekcie, opracowałam niedestruktywną technikę fenotypowania, *Near Infrared Reflectance Spectroscopy* (NIRS), którą opisano w rozdziale monografii [B3.4] oraz w publikacji pokonferencyjnej [B5.2]. Przez zintegrowanie metod mutagenyzy, analizy morfologicznej mutantów, jakościowej i ilościowej techniki NIRS jak również metod analizy metabolomu oraz proteomu udało mi się wyselekcjonować 11 nowych linii mutantów ryżu scharakteryzowanych między innymi pod kątem zmienionych cech jakości ziarna. W celu dalszej charakterystyki podłoża zmian fenotypowych, mutanty ryżu zostały zsekwencjonowane przy zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji. Wziąwszy pod uwagę, że promieniowanie gamma może powodować szersze spektrum zmian niż mutageneza chemiczna, analizy bioinformatyczne skupiłam na metodach pozwalających na identyfikację wszelkiego rodzaju mutacji. Niestety, narzędzia bioinformatyczne, pozwalające na tego typu analizy, są wciąż ograniczone dla roślin. Jest to prawdopodobnie wynikiem tego, że większość naukowców stosujących NGS skupia się przede wszystkim na identyfikacji zmian punktowych. W moich badaniach podjęłam trudne zadanie określenia całkowitego spektrum zmian. W trakcie analiz bioinformatycznych wykazano obecność zarówno zmian strukturalnych, jak i mutacji punktowych. Ponad 80% mutacji punktowych oraz małych InDels zlokalizowano w regionach międzygenowych natomiast jedynie 0,1% (SNPs) oraz 2% (InDels) w genach. Przez analizę możliwych konsekwencji mutacji na funkcję genów wykazano, że wiele zmian może leżeć u podstaw zaobserwowanych cech widocznych w mutantach ryżu. Jednym z ważniejszych wniosków moich badań jest stwierdzenie, że zarówno promieniowanie gamma jak i X indukują podobne spektra i częstotliwości zmian, przeważnie SNPs oraz małe InDels. Najbardziej interesującym wynikiem, który uzyskałam w trakcie tych badań, jest funkcjonalna analiza dużych delecji wykazująca, ponad 90% tych regionów jest podobnych do regionów transpozonów w genomie referencyjnym. Wyniki moich badań przedstawiłam na wielu konferencjach [C2.10, C2.13, C2.19, C2.42, C2.44], jestem też w trakcie przygotowywania na ich temat publikacji.

4.2. Sekwencjonowanie genomu zaawansowanych linii mutantów pomidora odpornych na stres cieplny.

Pracę na pomidorze (*Lycopersicon esculentum* L.) rozpoczęłam w okresie współkierowania projektem rozwojowym IAEA numer MAR5018 *„Improvement of Banana and Tomato Varieties through the Use of Nuclear techniques for Mutation Induction and Biotechnology”* na Mauritiusie, w ramach którego sprawowałam opiekę naukową stażu mgr Binity Saraye (Agricultural Research and Extension Unit, Mauritius), zajmującej się wdrażaniem programu mutagenyzy do programów hodowlanych pomidora. Pomidor jest jedną z najważniejszych roślin użytkowych na Mauritiusie, jest także bardzo ważnym komponentem kultury ludności

zamieszkującej tę wyspę. Na Mauritiusie są uprawiane trzy typy pomidora, a mianowicie, sałatowy, koktajlowy oraz użytkowany w kuchni. Pomidor sałatowy oraz koktajlowy jest uprawiany w uprawach hydroponicznych, natomiast trzeci typ, wyłącznie na otwartych polach, co sprawia, że uprawa jego jest narażona na zmienne warunki klimatyczne, w tym stres cieplny. W ramach programu rozwojowego MAR5018, z zastosowaniem indukcji zmienności genetycznej promieniowaniem gamma, zostało wytworzonych ponad 3000 mutantów i w kolejnych pokoleniach poddano je selekcji w oparciu o cechy agronomiczne. W wyniku selekcji wyizolowano 150 linii mutantów pomidora, które przeznaczono do oceny tolerancji na sters cieplny. Stres cieplny wykonano na siewkach i na roślinach znajdujących się w fazie kwitnienia. W trakcie trwania stresu wykonano pomiary fizjologiczne oraz morfologiczne. W wyniku tych badań wyizolowano dwa mutanty L5P12 oraz L25P10 wykazujące znaczną odporność na stres cieplny, których genomy poddano pełnym analizom molekularnym. Do analizy bioinformatycznej sekwencjonowania NGS wykorzystano zestaw metod, które zostały opracowane w wyżej omówionych badaniach na ryżu. Zmiany zaobserwowane w genomie mutantów pomidora to: warianty strukturalne, delecje, duplikacje oraz inwersje, a także i zmiany punktowe i małe InDels. Wykazano, że mutant L25P10 charakteryzował się dwukrotnie wyższą liczbą mutacji w porównaniu do L5P12. Przeprowadzono krzyżowania między liniami rodzicielskimi i mutantami w celu identyfikacji mutacji odpowiedzialnych za zaobserwowane zmiany agronomiczne. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych [C2.22, C2.23, C2.26, C2.35, C2.37, C2.43].

4.3. Efekt promieniowania jonizującego na wernalizację, wzrost i rozwój pszenicy ozimej.

W ramach współpracy z dr hab. Iłoną Czyczyło-Myszą z Instytutu Fizjologii Roślin, Polskiej Akademii Nauk wykonano badania dotyczące stymulacji rozwoju generatywnego pszenicy ozimej przy pomocy promieniowania jonizującego gamma. Celem doświadczenia było zbadanie czy napromieniowanie zmieni wymagania wernalizacyjne roślin. W tym celu suche ziarniaki pszenicy ozimej 'Kobra' zostały napromieniowane dawką 300 Gy promieniowania emitowanego przez bombę kobaltową. Zaobserwowano, że napromieniowanie suchych ziarniaków spowodowało wzrost i rozwój roślin wyprowadzonych z tych nasion, niezależnie od tego czy temperatura wegetacji indukowała kwitnienie. Nie udało się jednak zastąpić wernalizacji ani przyspieszyć kwitnienia roślin po napromieniowaniu ziarniaków. Wyniki tych badań opisano w publikacji [B.1].

4.4. Adaptacja metod *low-cost* EcoTILLING i TILLING do badania zmienności naturalnej oraz indukowanej.

W trakcie opieki naukowej i pracy z wieloma naukowcami odwiedzającymi Plant Breeding and Genetics Laboratory w ramach projektów finansowanych przez Dział Współpracy Technicznej IAEA (*Technical Cooperation Department*), napotkałam wiele trudności związanych z transferem metod, które opracowywałam, do laboratoriów krajów rozwijających się. Wynikało to głównie z braku potrzebnej infrastruktury oraz z powodu limitowanego finansowania badań naukowych w tychże laboratoriach. Dlatego rozpoczęłam badania nad opracowaniem metod, które wcześniej zaadaptowałam dla roślin rozmnażanych wegetatywnie, do celów aplikacyjnych z zastosowaniem tak zwanej opcji „*low-cost*”. W

swoich badaniach skupiłam się głównie na metodyce umożliwiającej badanie zmienności naturalnej oraz indukowanej. Ze względu na wcześniejsze doświadczenie i zainteresowania, materiałem wykorzystanym do tych badań była populacja banana. Pochodziła ona z Mauritiusa, a w jej skład wchodziły odmiany, które znane są jedynie pod ich lokalną nazwą i są bardzo cenione ze względu na smak. Opierając się jedynie na opisie morfologii tych odmian, wydawały się one należeć do głównych grup bananów: grupy „Mamoul” charakteryzującej się żółtą woskową skórką i miękką konsystencją lub grupy „Gingeli”, z błyszczącą kanarkowo-żółtą skórką o słodko zakwaszonym smaku i suchej teksturze dojrzałego owocu. Określenie przynależności grupowej jest bardzo istotne nie tyle ze względów poznawczych, co aplikacyjnych. Historyczne wzmianki opisujące te odmiany nie zgadzały się jednak z cechami fenotypowymi.

W celu zidentyfikowania dokładnej przynależności lokalnych odmian, określono poziom ploidalności wybranych bananów oraz wykonano molekularne analizy na 48 odmianach (20 lokalnych i 28 o znanej przynależności grupowej) poprzez zastosowanie *low-cost agarose gel-based Ecotilling*. We wcześniejszych badaniach wykazano, że banan charakteryzuje się wysoką heterozygotycznością i z tego względu można było założyć, że jedynie system LI-COR oparty na żelach poliakrylamidowych zapewni odpowiednią rozdzielczość, pozwalającą na analizę naturalnego polimorfizmu z wykorzystaniem metody Ecotilling. Należy podkreślić, że system Li-COR wymaga stosowania znakowanych starterów, co ogranicza jego wykorzystanie w krajach rozwijających się. Po opracowaniu odpowiednich proporcji reakcji PCR i enzymu tnącego heterodupleksy oraz stężeń żeli agarozowych, uzyskano bardzo wyraźny rozdział prążków. Silne polimorfizmy zostały wykryte na wszystkich poziomach ploidalności badanego materiału. Analizie poddano 10 genów, które umożliwiły porównanie podobieństwa lokalnych odmian do odmian referencyjnych. Odmiany z grupy Mamoul znalazły się blisko osobników Pisang Awak (ABB), podczas gdy Gingeli okazały się podobne do osobników Silk (AAB). Badania te ustaliły różnorodność genetyczną wśród odmian bananów typu deserowego uprawianych na wyspie Mauritius oraz pozwoliły na określenie przynależności na poziomie grupy, a przede wszystkim podgrupy. Przy zastosowaniu techniki *low-cost* udało się też zidentyfikować warianty somaklonalne. Omówione wyniki zaprezentowano w publikacji [B1.2] oraz na konferencjach [C2.2, C2.15, C2.20, C2.21]. Dzięki opracowaniu techniki *low-cost* Ecotilling i zastosowaniu jej do analizy lokalnych odmian banana pochodzących z wyspy Mauritius wykazano, że można ją z powodzeniem stosować do wykrywania naturalnego polimorfizmu nawet w przypadku gatunków o złożonych polipoidalnych genomach, takich jak banan.

We współpracy z mgr Babią Jhurree-Dussoruth (Agricultural Research and Extension Unit, Mauritius) wykonałam również test pilotażowy, w którym wyżej opisana technika została zastosowana dla populacji 89 mutantów bananów odmiany Gingeli [D2.38]. Metoda okazała się być skuteczna i niezawodna, może więc być stosowana w krajach rozwijających się z ograniczonymi możliwościami wykonywania badań molekularnych. Jest to także istotne w przypadku prac na populacjach mutantów.

4.5. Opracowywanie protokołów oraz metod detekcji mutacji.

Opracowanie metod efektywnej indukcji oraz detekcji mutacji należy do zadań IAEA, a w

związku z tym też Plant Breeding and Genetics Laboratory. Transfer wiedzy do krajów rozwijających się jest najbardziej efektywny poprzez kursy oraz indywidualne szkolenia w których biorę aktywny udział jako szkoleniowiec/wykładowca. Dla tych potrzeb, wraz z współpracownikami Plant Breeding and Genetics Laboratory jak i w ramach międzynarodowego projektu „*Enhancing the efficiency of induced mutagenesis through an integrated biotechnology pipeline*” (D2.40.12), opracowałam szereg protokołów pozwalających na aplikacje metod indukcji i detekcji mutacji w jednostkach naukowych zajmujących się tą tematyką. Zostały one opublikowane w formie artykułów i publikacji pokonferencyjnych [B1.1, B5.1], rozdziałów monografii [B3.1, B3.2], monografii [B2.1, B2.2] oraz dla projektu D2.40.12 w formie edytowanej książki [B4.1] w której jestem współautorem szeregu protokołów nie wchodzących w skład osiągnięcia [B3.4-B3.8].

Zagadnienia indukowanej zmienności genetycznej, zastosowania strategii TILLING oraz nowych metod sekwencjonowania do identyfikacji genów zostały opisane w szeregu rozdziałów monografii, które obejmują aspekty teoretyczne i aplikacyjne [A.4, B.2, B3.3, B3.9, B3.10].

6. Udział w międzynarodowych i krajowych projektach badawczych.

6.1 Projekty badawcze realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

- 2003-2009; „*Effects of mutagenic agents on the DNA sequence in plants*” (D2.40.11); instytucja finansująca - International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu; **wykonawca.**
- 2005-2010; „*Molecular tools for quality improvement in vegetatively propagated crops including banana and cassava.*”, (D2.30.27); instytucja finansująca - International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu; **główny wykonawca.**
- 2009-2011; „*Lokalizacja loci genów warunkujących cechy ilościowe (QTL) związane z odpornością pszenicy na suszę z wykorzystaniem mapy markerów i populacji linii podwojonych haploidów w korelacji ze wskaźnikami fizjologicznymi*” (479/N-COST/2009/0); akcja COST FA0604 (TRITIGEN); **wykonawca.**

6.2 Projekty badawcze realizowane po uzyskaniu stopnia doktora:

- 2009-2014; „*Enhancing the efficiency of induced mutagenesis through an integrated biotechnology pipeline*” (D2.40.12); instytucja finansująca - International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu; **główny wykonawca.**
- 2011-2014; „*SNPs discovery for targeted genotyping in *Jatropha curcas**”(P 23836-B16); Fonds zur Forderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF); **główny wykonawca.**

- 2015-2020; “Efficient screening techniques to identify mutants with disease resistance for coffee and banana” (D2.20.05); instytucja finansująca - International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu; **główny wykonawca**.

7. Współpraca międzynarodowa i krajowa.

Dr hab. inż. Ilona Czyczyło-Mysza, Instytut Fizjologii Roślin imienia Franciszka Górskiego, Polska Akademia Nauk, Kraków, Polska; 2007 – 2011.

Współpracę nawiązaną w celu zbadania wpływu promieniowania jonizującego na wymagania wernalizacyjne odmiany ozimej pszenicy [**B.1**] kontynuowano w ramach projektu numer 479/N-COST/2009/0 „Lokalizacja loci genów warunkujących cechy ilościowe (QTL) związane z odpornością roślin pszenicy na suszę z wykorzystaniem mapy markerów i populacji linii podwojonych haploidów w korelacji ze wskaźnikami fizjologicznymi”.

Prof. dr hab. inż. Marcin Rapacz, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy, Kraków, Polska; 2008 – 2012.

Współpraca została nawiązana w celu opracowania metody fenotypowania odpowiedzi bananów na stres suszy. Wyniki badań zostały przedstawione w wystąpieniach konferencyjnych [**C1.13, C1.23, C1.26, C2.3, C2.17, C2.18**]. W ramach tego tematu powstała praca magisterska Pani Marty Brożyńskiej, pod tytułem: „Zróżnicowanie fizjologicznych reakcji na suszę glebową wybranych odmian bananowca (*Musa sp.*)”.

Dr Kornel Burg, dr Silvia Fluch, Austrian Institute of Technology, Tulln, Austria; 2010 – 2013.

Współpraca dotyczyła analizy ekspresji genów w trakcie odpowiedzi banana na stres suszy [**C2.17, C2.18**]. Badania w ramach tej współpracy były kontynuacją działań badawczych wykonanych w ramach projektu D2.30.27 „Molecular tools for quality improvement in vegetatively propagated crops including banana and cassava”.

Dr Theresa Scharl, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna (BOKU), Austria; 2010-2013.

Nawiązana współpraca dotyczyła analizy statystycznej wyników pochodzących z wykonanych pomiarów fizjologicznych odpowiedzi banana na stres suszy [**C2.3**].

Dr Kamila Kozak-Stankiewicz, Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o. w Straszku, Polska; 2010 – 2015.

Współpraca z dr Kozak-Stankiewicz rozpoczęła się w okresie, gdy byłam opiekunem naukowym jej stażu w Plant Breeding and Genetics Laboratory w latach od 2010 do 2012. Praca dr Kozak-Stankiewicz była ściśle zintegrowana z moimi badaniami ukierunkowanymi na wyprowadzenie i analizę linii mutantów ryżu [**C2.6, C2.10, B5.2**]. Ponadto prowadziłyśmy badania z zakresu jej zainteresowań naukowych, a mianowicie indukcje zmienności genetycznej oraz adaptacji metod molekularnych do celów analizy zmienności naturalnej łubinu [**A2.4, C1.24, C1.30, C1.31**]. Po rozpoczęciu pracy dr Kozak-Stankiewicz w

Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego nasza współpraca dotyczyła opracowania techniki analizy molekularnej podwojonych haploidów (DH) wytworzonych metodą ginogenezy do selekcji wartościowych linii homozygotycznych buraka cukrowego.

Prof. Dipl.-Ing. Dr hab. Johann Vollmann, Division of Plant Breeding, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Tulln, Austria; 2011 – 2017.

Współpracę tę nawiązałam w ramach projektu D2.40.12 (*Enhancing the Efficiency of Induced Mutagenesis through an Integrated Biotechnology Pipeline*). Podjęte badania dotyczyły opracowania ilościowej i jakościowej metody NIRS o charakterze niedestruktywnym dla oceny jakości ziarna u mutantów ryżu. Została ona zastosowana do selekcji linii wykazujących zmienione wartości cech mierzonych w ziarnach (skrobia, proteiny, woda, minerały). Wyniki badań zostały opublikowane między innymi w [B3.4, B5.2, C2.10, C2.13, C2.19].

Prof. dr hab. Wolfrma Weckwerth, University of Vienna, Dept for Molecular Systems Biology, Vienna, Austria; 2012-2016.

Podjęta współpraca dotyczyła analizy metabolomu ziarniakówa u wybranych linii ryżu jak również analizy metabolomu banana w odpowiedzi na stres suszy. Wyniki badań zostały przedstawione na konferencjach [C2.13, C2.19, C2.28].

Dr Sini Junttila, Turku Centre for Biotechnology, Turun yliopisto, Finland; od 2014 - nadal.

Współpracę tę rozpoczęłam w celu analizy danych sekwencjonowania DNA wygenerowanych przez platformę HiSeq, między innymi do opracowania schematu identyfikacji mutacji punktowych oraz małych InDeli, jak również opracowania jak najbardziej skutecznej identyfikacji strukturalnych zmian w zmutowanym materiale. Prace prowadzono na materiale ryżu oraz pomidora. We współpracy z Dr Juntillą wykonałam też bioinformatyczną analizę proteomu i metabolomu mutantów ryżu. W planach naszej współpracy przeprowadzona została też analiza powiązań łącząca wyniki "omics" z wynikami uzyskanymi z sekwencjonowania mutantów ryżu. Wyniki badań zostały przedstawione w postaci plakatów [C2.42, C2.43] na konferencji FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology, jedna publikacja jest w przygotowaniu.

Prof. Altus Viljoen, Department of Plant Pathology, Stellenbosch University, Private Bag XI, Matieland, 7602, South Africa; od 2014 - nadal.

Współpracę z prof. Viljoen zainicjowałam w ramach tworzenia sieci badawczej dotyczącej przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się choroby banana zwanej Fusarium wilt, wywołanej przez grzyba *Fusarium oxysporum* f. Tropical Race 4. sp. cubense (TR4). Od roku 2015 współpraca ta jest sformalizowana w ramach projektu numer IAEA D2.20.05 (Efficient Screening Techniques to Identify Mutants with Disease Resistance for Coffee and Banana). Moja działalność w ramach tej współpracy polega na indukcji zmienności genetycznej odmian banana o szczególnej ważności dla Afryki (Cavendish) oraz na molekularnej identyfikacji mutacji. Dotychczasowe wyniki współpracy zostały zaprezentowane na trzech konferencjach międzynarodowych [C2.27, C2.31, C2.33] oraz będą opublikowane w rozdziale Jankowicz-Cieslak et al. (*accepted for publication in: Ingelbrecht, Jankuloski, Sivasankar (Eds), Section*

5 *New Challenges and Technologies in Plant Genomics and Breeding Chapter 21*) [D2.6].

Dr Chao Chih-Ping, Taiwan Banana Research Institute (TBRI) Pingtung, Taiwan; od 2014 - nadal.

Współpraca ta polega na prowadzeniu badań wstępnych mających na celu wyselekcjonowanie linii mutantów banana potencjalnie odpornych na Foc TR4. Jej pierwsze wyniki przedstawiono na czterech konferencjach międzynarodowych [C2.27, C2.31, C2.33, C2.41].

Prof. zw. dr hab. Iwona Szarejko, Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice, Polska; od 2016 - nadal.

Nawiązana współpraca dotyczy analizy TbS populacji mutacyjnej jęczmienia. Wyniki badań przedstawiono na jednej konferencji [C2.40] oraz zawarto je w publikacji będącej w trakcie odpowiedzi na recenzje w czasopiśmie G3: Genes, Genomes, Genetics, oraz zdeponowanej w bazie bioRxiv [D2.5].

Priv.-Doz. Dr Fatemeh Maghuly, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna (BOKU), Austria; od 2006- nadal.

Współpraca ta dotyczy określenia efektu działania mutagenu chemicznego i promieniowania jonizującego w komórkach jatrofy. W ramach tej współpracy byłam wykonawcą w projekcie IAEA numer P 23836- B16 „SNPs discovery for targeted genotyping in *Jatropha curcas*”, 2011-2014, gdzie opracowałam metodykę Ecotilling oraz wykonałam badania dla populacji zebranej w ramach tego projektu. W kolejnych latach opracowałam też metodykę TILLING i obecnie nasza współpraca jest kontynuowana w tym kierunku. We współpracy z Priv.-Doz. Dr. Fatemeh Maghuly od roku 2014 prowadzę zajęcia dydaktyczne na Uniwersytecie BOKU (University of Natural Resources and Life Sciences). Poza publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia, wyniki badań uzyskanych w ramach współpracy zostały opublikowane w publikacjach pokonferencyjnych [A2.1, A2.3], rozdziale monografii [B3.1] oraz przedstawione na konferencjach [C1.19, C1.22, C2.1, C2.4, C2.5, C2.9, C2.16, C2.19, C2.36].

8. Obecnie realizowane badania i dalsze plany naukowe

Prowadzone przeze mnie obecnie prace są kontynuacją stosowania mutagenyzy indukowanej w hodowli banana. Badania prowadzone są w opisanej powyżej współpracy z prof. Altusem Viljoenem ze *Stellenbosch University, South Africa*. Celem badań jest opracowanie technik komórkowych oraz metod mutagenyzy chemicznej na zawiesinach komórek, wyprowadzenie linii mutantów odpornych na atak *Fusarium oxysporum* TR4 oraz analiza genetyczna, molekularna i fizjologiczna mutantów. Analizy genetyczne będą przeprowadzone przy zastosowaniu technik sekwencjonowania nowej generacji i będą również obejmowały grupę mutantów banana wyselekcjonowaną podczas opisanego powyżej eksperymentu prowadzonego przez dr. Chih-Ping Chao z TBRI. W celu przeprowadzenia globalnej analizy ekspresji genów u badanych mutantów planuję również wykonanie eksperymentu RNA-seq. Tak kompleksowe analizy molekularne wyselekcjonowanych mutantów banana pozwolą na identyfikację zmutowanych genów odpowiedzialnych za wzrost odporności na atak Foc TR4.

Planuję również rozbudowanie metodyki wykorzystywanej w analizie funkcjonalnej badanych genów, a mianowicie zastosowanie techniki CRISPR-Cas. We współpracy z prof. Viljoenem planuję przeprowadzić analizy mające na celu określenie odporności na atak *Fusarium oxysporum* TR4 i wysokości plonowania mutantów banana wyselekcjonowanych przez TBRI w warunkach polowych. Testy te będą przeprowadzone w Mozambiku, gdzie prof. Viljoen ma zapewniony dostęp do plantacji zainfekowanych patogenem.

Oprócz kontynuacji badań na materiale rozmnażanym wyłącznie wegetatywnie, moje zainteresowania dotyczą również udoskonalania roślin uprawnych rozmnażanych w sposób generatywny. W moich dalszych badaniach pragnę skupić się na analizie mutantów pomidora oraz identyfikacji zmutowanych genów, które odpowiadają za podniesioną odporność na stres cieplny oraz zaobserwowane zmiany morfologiczne. Jest to kontynuacja badań omówionych powyżej. Obecnie dysponuję sekwencjami całego genomu tych mutantów jak również pokoleniem F1 krzyżówek między mutantami i ich liniami rodzicielskimi. Na etapie populacji F2, szczegółowe fenotypowanie oraz genotypowanie zostanie wykonane we współpracy z dr hab. Fatemeh Maghuly *University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna (BOKU)* oraz mgr Binitą Saraye *Agriculture and Extension Unit (AREU), Mauritius*. Zamierzam również kontynuować moje badania na mutantach ryżu przy zastosowaniu podobnego schematu jak w przypadku mutantów pomidora, a zatem produkcji F1 i analizy segregacji w obrębie F2.

W roku 2018, w ramach projektu IAEA numer D2.20.05 „*Efficient Screening Techniques to Identify Mutants with Disease Resistance for Coffee and Banana*”, rozpoczęłam badania także na kawie. Obecnie jestem na etapie generowania populacji M1. W tym celu opracowałam protokół chemicznej mutagenyzy kawy. Populacja wygenerowana będzie zastosowana do analiz z wykorzystaniem strategii odwrotnej genetyki.

9. Podsumowanie dotychczasowej pracy naukowej.

W trakcie pracy naukowej opublikowałam jako pierwszy autor lub współautor **13** oryginalnych prac badawczych, w tym **9** po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych. Jestem współautorką **2** monografii (wszystkie po doktoracie) oraz współautorką **16** rozdziałów w książkach (w tym **13** po uzyskaniu stopnia doktora). Jestem również autorem/współautorem **8** publikacji pokonferencyjnych (w tym **4** po uzyskaniu stopnia doktora) oraz streszczeń z kongresów krajowych i zagranicznych, na których wyniki moich badań były prezentowane w postaci plakatów, wystąpień ustnych lub wykładów. Jestem autorem/współautorem **77** wystąpień konferencyjnych w tym **46** po doktoracie. Podsumowaniem moich osiągnięć w zakresie technik indukowania i analiz zmienności genetycznej u roślin było powierzenie mi funkcji głównego redaktora książki pt. „*Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*” wydanej w roku 2017 przez Springer International Publishing AG Switzerland [**B4.1**]. Przygotowałam także **14** recenzji do czasopism. Byłam członkiem komitetów organizacyjnych **2** konferencji międzynarodowych organizowanych przez IAEA w roku 2008 i 2018. Uczestniczyłam jako wykonawca lub główny wykonawca w **6** projektach badawczych, w tym **3** po uzyskaniu stopnia doktora.

Tabela 1. Zestawienie dorobku według oceny punktowej czasopism MNiSZW, wskaźnika IF oraz liczby cytowań zgodnie z § 14 ust. 2 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 13 lipca 2012 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania kategorii naukowej jednostkom naukowym (Dz. U. 2012 r. poz. 877).

Rodzaj publikacji	Liczba prac		Wskaźnik IF ¹		Punkty MNiSW		Liczba cytowań ²
	przed doktorem	po doktoracie	przed doktorem	po doktoracie	przed doktoracie	po doktoracie	
Artykuły w czasopismach z IF (z listy JRC ³)	3	7	5,87	26,008	67	235	128
Artykuły w czasopismach spoza listy JRC ³	1	2	-	-	-	20	25
Monografie	-	2	-	-	-	50	8
Rozdziały w monografiach	3	13	-	-	26	65	63
Redagowanie monografii	-	1	-	-	-	5	5
Publikacje pokonferencyjne	4	4	-	-	14	40	15
Abstrakty konferencyjne	31	46	-	-	-	-	3
Inne niepublikowane	2	6	-	-	-	-	-
Suma całkowita	44	81	5,87	26,008	107	415	247
Razem	125		31,878		522		247

¹Impact Factor

²Sumaryczna liczba cytowań według Web of Science i Scopus

Dane z baz cytowań z 23 kwietnia 2019:

Liczba cytowań: **247**

Cytowania bez autocytowań: **181**

H-index (dla wszystkich publikacji): **7** (Web of Science); **8** (Scopus)

Wiedeń, dn. 29.04.2019

dr Joanna Jankowicz-Cieślak