

**Załącznik nr 2**

# **AUTOREFERAT**

**dr Damian Gruszka**

Katedra Genetyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2017

**1. Imię i nazwisko:** Damian Gruszka

**2. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

**2009: Doktor nauk biologicznych**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach,  
Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Identyfikacja genów uczestniczących w przekazywaniu sygnału i syntezie brasinosteroidów u Hordeum vulgare z wykorzystaniem mutantów półkarłowych”*;  
Promotor: Prof. dr hab. Mirosław Małuszyński

Rozprawa doktorska została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego dnia 27.03.2009.

**2004 – 2008: Studia doktoranckie**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

**2003: Magister biologii**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach,  
Tytuł pracy magisterskiej: *„Sprawdzenie homologii genów odpowiedzialnych za rozwój włóśników w korzeniach mutantów jęczmienia (H. vulgare L.) ze znanymi genami A. thaliana (L.) Heynh.”*;  
Promotor: Prof. dr hab. Iwona Szarejko

Uzyskanie nagrody Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego dla najlepszego absolwenta Wydziału oraz za pracę magisterską w roku 2003.

**1998 - 2003: Stacjonarne studia magisterskie na kierunku Biologia**, specjalność Biotechnologia roślin i mikroorganizmów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

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

**2011 – obecnie: Adiunkt**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

**2008 – 2011: Asystent**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

**2003 – 2004: Asystent**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

**2002 – 2003: Pracownik inżynierjno-techniczny**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

**4. 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.)**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

*Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm brasinosteroidów u jęczmienia oraz charakterystyka reakcji półkarłowych mutantów na stres niedoboru wody*

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

<sup>1</sup> Wartość wskaźnika *Impact Factor* według Journal Citation Reports (Thomson Reuters) dla artykułów naukowych opublikowanych przed rokiem 2017 podano zgodnie z rokiem ich opublikowania; dla publikacji z roku 2017 podano IF 5-letni

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

Lp.	Tytuł i autorstwo publikacji	IF <sup>1</sup>	Punkty MNiSW <sup>2</sup>	Udział procentowy
1.	<b>Gruszka D.</b> 2013. The brassinosteroid signaling pathway - new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 14: 8740-8774.  <i>Jestem jedynym autorem tej publikacji. Mój wkład w jej powstanie polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, przygotowaniu jego treści oraz rycin, jak również ostatecznym redagowaniu manuskryptu po recenzjach.</i>	IF <sub>2013</sub> : 2,339	30	100%
2.	Dockter* C., <b>Gruszka* D.</b> , Braumann I., Druka A., Druka I., Franckowiak J., Gough S.P., Janeczko A., Kurowska M., Lundqvist J., Lundqvist U., Marzec M., Matyszczak I., Müller A.H., Oklestkova J., Schulz B., Zakhrebekova S., Hansson M. 2014. Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit. <i>Plant Physiology</i> 166: 1912–1927.  <i>*Posiadam status pierwszego autora tej publikacji (equal contribution). Mój wkład w jej powstanie polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań i planowaniu doświadczeń, ponadto dokonałem charakterystyki fizjologicznej badanych mutantów, brałem udział w mapowaniu in silico analizowanych genów w genomie jęczmienia, zidentyfikowałem pełne</i>	IF <sub>2014</sub> : 6,841	45	35%

	<p>sekwencje genów <i>HvBRD</i> oraz <i>HvCPD</i> oraz dokonałem ich analiz z wykorzystaniem wytypowanych mutantów, wykonałem analizę wpływu zidentyfikowanych mutacji za pomocą narzędzi bioinformatycznych, brałem udział w analizie funkcjonalnej genu <i>HvBR11</i>, wykonałem analizę genetyczną zmierzającą do wykazania alleliczności zidentyfikowanych mutantów, opracowałem wyniki uzyskane w powyższych eksperymentach, brałem udział w przygotowaniu wszystkich części manuskryptu i jestem autorem części rycin, brałem też udział w ostatecznym redagowaniu manuskryptu po recenzjach.</p>			
3.	<p><b>Gruszka D.</b>, Gorniak M., Głodowska E., Wierus E., Oklestkova J., Janeczko A., Maluszynski M., Szarejko I. 2016a. A reverse-genetics mutational analysis of the barley <i>HvDWARF</i> gene results in identification of a series of alleles and mutants with short stature of various degree and disturbance in BR biosynthesis allowing a new insight into the process. <i>International Journal of Molecular Sciences</i>, 17: 600.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz zaplanowaniu wszystkich eksperymentów, brałem udział w analizach związanych z identyfikacją pełnej sekwencji genu <i>HvDWARF</i> oraz jego analizą funkcjonalną z użyciem metody TILLING, wykonałem analizy bioinformatyczne określające wpływ mutacji na sekwencję i strukturę kodowanego polipeptydu, a także brałem udział w analizie molekularnej transkryptów genu <i>HvDWARF</i> potwierdzającej wpływ mutacji, dokonałem analizy przestrzennego i czasowego profilu ekspresji genu <i>HvDWARF</i> metodą real-time quantitative PCR, przeprowadziłem większość analiz genetycznych i fenotypowych mutantów oraz testów fizjologicznych, opracowałem wszystkie uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem cały tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również redagowałem manuskrypt po recenzjach.</i></p>	<p><b>IF</b><sub>2016</sub>: 3,226</p>	30	80%
4.	<p>Janeczko A., <b>Gruszka D.</b>, Pocięcha E., Dziurka M., Filek M., Jurczyk B., Kalaji H.M., Kocurek M., Waligorski P. 2016. Physiological and biochemical characterisation of watered and drought-stressed barley mutants in the <i>HvDWARF</i> gene encoding C6-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. <i>Plant Physiology and Biochemistry</i>, 99: 126-141.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań i planowaniu doświadczeń, oraz na wykonaniu fizjologicznej (testy</i></p>	<p><b>IF</b><sub>2016</sub>: 2,724</p>	35	35%

	<i>etiologii i rozwijania blaszek liściowych), genetycznej (analiza alleliczności) oraz molekularnej (identyfikacja mutacji wywołujących fenotyp mutantów) charakterystyki półkarłowych mutantów BR, które stanowiły materiał badań. Ponadto dokonałem interpretacji uzyskanych w tej pracy wyników w odniesieniu do genetycznego podłoża fenotypu badanych mutantów, brałem udział w przygotowaniu wszystkich części manuskryptu oraz w ostatecznym redagowaniu manuskryptu po recenzjach.</i>			
5.	<p><b>Gruszka D.,</b> Janeczko A., Dziurka M., Pocięcha E., Oklestkova J., Szarejko I. 2016b. Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. <i>Frontiers in Plant Science</i>, 7: 1824.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, ich zaplanowaniu, a także udziale w realizacji eksperymentów zmierzających do określenia profilu akumulacji poszczególnych fitohormonów, a także fizjologicznych pomiarów reakcji badanych genotypów na stres suszy. Ponadto przeanalizowałem i zinterpretowałem wszystkie uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem cały tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również redagowałem manuskrypt po recenzjach.</i></p>	<b>IF</b> <sub>2016</sub> : 4,291	40	80%
6.	<p><b>Gruszka D.,</b> Janeczko A., Dziurka M., Pocięcha E., Fodor J. 2017. Non-enzymatic antioxidant accumulations in BR-deficient and BR-insensitive barley mutants under control and drought conditions. <i>Physiologia Plantarum</i>, DOI: 10.1111/ppl.12674 (artykuł w druku, dostępny w wersji elektronicznej na stronie internetowej czasopisma).</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, ich zaplanowaniu, jak również udziale w realizacji eksperymentów zmierzających do określenia stężeń poszczególnych nieenzymatycznych antyoksydantów u badanych genotypów podczas ich wzrostu w warunkach kontrolnych oraz stresu niedoboru wody. Ponadto przeanalizowałem i zinterpretowałem wszystkie uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem cały tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również redagowałem manuskrypt po recenzjach.</i></p>	<b>IF</b> <sub>5-letni</sub> : 3,524	40	80%

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **22,945**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **220**

**c) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z opisem ich ewentualnego wykorzystania**

**Wstęp**

Brasinosteroidy (BR) są sterolowymi hormonami roślinnymi, zidentyfikowanymi po raz pierwszy pod koniec lat 70-tych XX wieku. Hormony te wykazują wysoką aktywność biologiczną w stymulacji wzrostu i rozwoju roślin. Analizy genetyczne i fizjologiczne z wykorzystaniem mutantów wykazały, że BR regulują szeroki zakres procesów morfogenetycznych oraz fizjologicznych w cyklu rozwojowym roślin, począwszy od powstawania nasion i ich kiełkowania, aż po rozwój organów generatywnych i senescencję. Procesy biosyntezy i transdukcji sygnału BR zostały scharakteryzowane w największym stopniu u gatunku modelowego – rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), jednocześnie są one poznane w znacznie mniejszym zakresie w przypadku gatunków uprawnych, w tym zbóż.

Badania prowadzone w ostatnich latach wskazały, że regulacja tak różnych procesów fizjologicznych jest możliwa poprzez skomplikowaną sieć interakcji komponentów szlaku transdukcji sygnału BR z czynnikami biorącymi udział w sygnalizacji innych fitohormonów. Takie podłoże molekularne stanowi podstawę sieci interakcji i wzajemnych zależności różnych fitohormonów i umożliwia skoordynowaną regulację procesów fizjologicznych. Analizy fenotypowe mutantów zidentyfikowanych u gatunków jedno- i dwuliściennych wykazały, że zaburzenia metabolizmu BR prowadzą do różnorodnych zmian morfologii i anatomii, w tym obniżonego wzrostu (karłowości i półkarłowości) oraz zmian pokroju roślin. W przypadku zbóż wykorzystanie w uprawach półkarłowych odmian o zmniejszonej tendencji do wylegania w niekorzystnych warunkach atmosferycznych umożliwiło stosowanie wyższych dawek nawozów, a tym samym zwiększenie plonów. Ta strategia hodowli stosowana w drugiej połowie XX w. umożliwiła sukces tzw. 'Zielonej rewolucji'. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują, że BR pełnią również rolę regulującą reakcje fizjologiczne roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, w tym stres suszy, jednak molekularne podłoże tych zjawisk pozostaje niewyjaśnione, szczególnie w przypadku gatunków uprawnych.

Kluczowymi narzędziami umożliwiającymi analizę funkcjonalną genów oraz określenie roli BR i innych fitohormonów w regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych są kolekcje mutantów. Badania prowadzone od wielu lat w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ wykorzystują mutagenезę jako źródło zmienności genetycznej jęczmienia (*Hordeum vulgare*). Ta strategia umożliwiła powstanie szerokiej kolekcji mutantów, a w ostatnich latach również populacji TILLING (ang. *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*), która wykorzystywana była w przedstawianych badaniach prowadzonych m. in. metodą tzw. 'odwrotnej genetyki' (ang. *reverse genetics*).

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki oraz kluczową rolę BR w regulacji wielu procesów morfogenezy i fizjologii roślin, a zarazem z uwagi na skromne informacje na temat metabolizmu BR u jednoliściennych, do celów prowadzonych badań stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe należały:

**1. Identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna genów jęczmienia kodujących enzymy biosyntezy BR oraz dodatkowo analiza funkcjonalna genu kodującego receptor tych fitohormonów.**

Do analiz funkcjonalnych tych genów wykorzystano wspomnianą kolekcję mutantów oraz grupę linii bliskoizogenicznych, które poddano różnym analizom fizjologicznym. Analizę funkcjonalną prowadzono również z użyciem wspomnianej powyżej metody TILLING.

**2. Określenie reakcji zidentyfikowanych, półkarłowych mutantów jęczmienia na stres niedoboru wody.**

Cel prowadzonych badań wynikał ze znaczenia półkarłowych form zbóż dla rolnictwa, a także odzwierciedlał konieczność identyfikacji nowych form cechujących się podwyższoną tolerancją na niedobór wody w obliczu nadchodzących zmian klimatycznych. Interesującym wynikiem było wykazanie, że półkarłowe mutanty BR jęczmienia wykazują wyższą tolerancję na niedobór wody w porównaniu z odmianami wyjściowymi.

**3. Określenie roli endogennych BR w regulacji homeostazy innych fitohormonów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz w stresie suszy.**

Badania prowadzono z wykorzystaniem zidentyfikowanych mutantów, a uzyskane wyniki są bardzo istotne biorąc pod uwagę rolę interakcji hormonalnych w regulacji fizjologii roślin.

**4. Określenie funkcji endogennych BR w regulacji homeostazy nieenzymatycznych antyoksydantów w warunkach kontrolnych oraz podczas suszy.**

Materiałem tych badań były linie bliskoizogeniczne, cechujące się zaburzeniami w procesie biosyntezy lub sygnalizacji BR. Uzyskane wyniki wykazały, że prawidłowy przebieg procesów biosyntezy i sygnalizacji BR jest konieczny dla odpowiedniej akumulacji nieenzymatycznych antyoksydantów podczas rozwoju roślin w warunkach kontrolnych oraz stresu niedoboru wody.

Wszystkie powyższe cele zostały osiągnięte, a wyniki badań pozwoliły na wyjaśnienie kilku kluczowych kwestii związanych z metabolizmem oraz rolą endogennych BR w regulacji homeostazy hormonalnej oraz akumulacji nieenzymatycznych antyoksydantów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz w stresie suszy. Szczegółowy opis prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedstawiono poniżej.

**Molekularne mechanizmy percepcji i transdukcji sygnału brasinosteroidów oraz interakcje sygnałom BR z komponentami szlaków transdukcji sygnałów innych fitohormonów umożliwiające regulację różnych procesów fizjologicznych oraz reakcji na stresy**

Regulacja różnych procesów morfogenetycznych i fizjologicznych w trakcie cyklu rozwojowego roślin jest możliwa poprzez skomplikowaną sieć interakcji hormonalnych, w

tym komponentów szlaku transdukcji sygnału BR z czynnikami biorącymi udział w sygnalizacji innych fitohormonów. Do pełnego zrozumienia tych interakcji konieczna jest możliwie jak najszersza identyfikacja i charakterystyka komponentów biorących udział w szlaku transdukcji sygnału BR. Badania w tym kierunku prowadzone były w głównej mierze na gatunku modelowym *A. thaliana* i doprowadziły do opracowania wciąż uzupełnianego schematu transdukcji sygnału BR. W związku z faktem, że tego typu informacje mogą stanowić podstawę dla badań zmierzających do charakterystyki procesu transdukcji sygnału BR u gatunków uprawnych, w tym zbóż, u których jest on znacznie słabiej poznany, pojawia się konieczność aktualizowania i systematyzowania nowych informacji pochodzących z badań prowadzonych na gatunku modelowym. Temu celowi służyło przygotowanie przeze mnie publikacji przeglądowej, opisującej mechanizmy percepcji i transdukcji sygnału BR oraz molekularne interakcje sygnalosu BR z komponentami uczestniczącymi w sygnalizacji innych fitohormonów (**Gruszka, 2013**; *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 8740-8774). W tej publikacji, po wstępie przedstawiającym ogólną charakterystykę BR oraz szerokie spektrum procesów, które są przez te hormony regulowane, zostały szczegółowo opisane zagadnienia dotyczące struktury transbłonowego receptora BR, a także molekularnych mechanizmów prowadzących do uformowania kompleksu receptorowego i zainicjowania transdukcji sygnału. W publikacji przedstawiono również charakterystykę i funkcje komponentów szlaku transdukcji sygnału BR, w tym negatywnych regulatorów tego procesu. Na podstawie przedstawionych informacji przygotowano oryginalne schematy prezentujące przebieg procesu transdukcji sygnału BR, począwszy od wiązania cząsteczki BR przez receptor, aż po regulację ekspresji genów docelowych. Opracowano również oryginalny schemat skomplikowanej sieci interakcji czynników transkrypcyjnych, regulujących zależną od BR ekspresję genów. Istotną częścią tej publikacji jest opis udziału niektórych komponentów sygnalizacji BR w szlakach transdukcji sygnału innych fitohormonów oraz w mechanizmach regulacji różnych procesów fizjologicznych, w tym reakcji na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Tym samym publikacja ta stanowi bogate i wielowymiarowe źródło informacji na temat procesów sygnalizacji BR, interakcji hormonalnych oraz zaangażowania komponentów sygnalosu BR w regulację innych procesów fizjologicznych. Publikacja ta jest jednym z efektów realizacji projektu, którego byłem kierownikiem ‘*Identyfikacja i charakterystyka genów jęczmienia (*Hordeum vulgare*) zaangażowanych w procesy syntezy i transdukcji sygnału brasinosteroidów, jako hormonów regulujących wzrost i rozwój roślin*’ (IP2011–016471), realizowanego w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego ‘*Iuventus Plus*’.

### **Opracowanie charakterystyki cech fenotypowych mutantów BR jęczmienia, umożliwiającej wydajną identyfikację nowych form**

W porównaniu do gatunku modelowego *A. thaliana* lista zidentyfikowanych i scharakteryzowanych genów jęczmienia, kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie lub szlaku transdukcji sygnału BR jest zdecydowanie krótsza. Pierwszym scharakteryzowanym mutantem BR jęczmienia był *uzu* (allel *uzu1.a*), który ze względu na mutację w genie *HvBR11* kodującym receptor BR wykazuje niewrażliwość na ten hormon.



Jednak prace prowadzone w ostatnich latach przez mnie indywidualnie oraz we współpracy umożliwiły identyfikację i analizę funkcjonalną czterech kolejnych genów jęczmienia (*HvBRD*, *HvCPD*, *HvDIM* i *HvDWARF*) oraz potwierdzenie ich funkcji poprzez wielokierunkową charakterystykę ponad 20 półkarłowych mutantów. Skuteczność tej strategii wynika z opracowania charakterystyki cech fenotypowych mutantów BR jęczmienia, umożliwiającej wydajną identyfikację nowych form. Analizy fenotypowe połączone z eksperymentami fizjologicznymi pozwoliły na określenie kilku łatwo obserwowalnych cech, które umożliwiają szybką i ukierunkowaną selekcję mutantów BR jęczmienia. Analizy fenotypowe przeprowadzono z zastosowaniem szerokiej kolekcji linii bliskoizogenicznych (ang. *Near Isogenic Lines*, NILs), które powstały poprzez wielokrotne krzyżowania wsteczne mutantów półkarłowych z odmianą ‘Bowman’. Rezultatem takiej procedury było wyprowadzenie linii zawierających ograniczony rejon introgresji (pochodzący z genomu mutantu i specyficzny dla poszczególnej linii) we wspólnym dla wszystkich linii tle genetycznym odmiany ‘Bowman’. Jednolite tło genetyczne tych linii jest wielką zaletą tej kolekcji i ułatwia prowadzenie porównawczych analiz fenotypowych. Wytypowane cechy charakterystyczne mutantów BR jęczmienia obejmują: półkarłowy, erektoidalny pokrój roślin, obniżoną elongację górnych międzywęźli, obniżony kąt pomiędzy blaszką liściową a źdźbłem, falistość brzegów blaszek liściowych u nasady (ten sam efekt fenotypowy może zostać osiągnięty po potraktowaniu formy wyjściowej ‘Bowman’ roztworem propikonazolu, który jest inhibitorem biosyntezy BR), zbite kłosa (szczególnie u podstawy) oraz krótkie ości. Należy dodać, że powyższy zestaw cech fenotypowych może być obserwowany u mutantów BR reprezentujących różne tła genetyczne. Wykorzystanie tego zestawu cech umożliwiło wydajną analizę fenotypową ponad 160 półkarłowych linii bliskoizogenicznych, z których 16 wykazywało wymienione cechy fenotypowe, charakterystyczne dla zaburzeń metabolizmu BR. Analizy fizjologiczne i genetyczne potwierdziły, że fenotyp mutantów wyselekcjonowanych na podstawie powyższych kryteriów spowodowany jest zaburzeniami biosyntezy lub sygnalizacji BR (Dockter, Gruszka i in., 2014; *Plant Physiology*, 166: 1912–1927).

#### **Identyfikacja i charakterystyka genów biorących udział w biosyntezie i sygnalizacji BR (*HvDWARF*, *HvBRD*, *HvCPD*, *HvDIM* oraz *HvBR11*) oraz ich analiza funkcjonalna z wykorzystaniem genetyki molekularnej oraz strategii TILLING**

Wyselekcjonowane linie bliskoizogeniczne stanowiły materiał analiz genetycznych i fizjologicznych z zastosowaniem testu etiolacji oraz testu rozwijania blaszek liściowych, co pozwoliło na podzielenie tej grupy na dwie kategorie: mutantów wrażliwych i niewrażliwych na egzogenne BR. Równolegle prowadzone analizy z użyciem narzędzi bioinformatycznych pozwoliły na wytypowanie 9 genów jęczmienia (o nieustalonej wcześniej funkcji), jako kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę BR. Dokonano predykcji lokalizacji tych genów w obrębie genomu jęczmienia z zastosowaniem narzędzia GenomeZipper oraz w odniesieniu do mapy fizycznej genomu jęczmienia. Na podstawie informacji o genomowej lokalizacji rejonów introgresji w poszczególnych liniach bliskoizogenicznych możliwe było przypisanie wyselekcjonowanych linii NIL, zawierających zmapowane rejony introgresji, do

fragmentów chromosomów, w których zlokalizowane są badane geny. Ta strategia pozwoliła na identyfikację pełnych sekwencji trzech genów: *Brassinosteroid-6-oxidase (HvBRD)*, *Constitutive Photomorphogenic Dwarf (HvCPD)* oraz *Diminuto (HvDIM)*, określenie ich pozycji w genomie, a także ich analizę funkcjonalną z zastosowaniem wytypowanych linii bliskoizogenicznych. Zidentyfikowano łącznie 12 różnych alleli tych genów, a analiza profilu akumulacji endogennych BR u zidentyfikowanych mutantów pozwoliła na potwierdzenie, że ich fenotyp spowodowanych jest zaburzeniami w procesie biosyntezy BR. Wytypowane linie bliskoizogeniczne, niewrażliwe na egzogenne BR posłużyły jako materiał do analizy funkcjonalnej genu *Brassinosteroid-insensitive1 (HvBR1)*, kodującego receptor BR. Zastosowanie powyższej strategii umożliwiło identyfikację czterech nowych alleli tego genu, a analizy akumulacji endogennych BR potwierdziły, że fenotyp zidentyfikowanych mutantów jest spowodowanych zaburzeniami w percepcji BR. Linie bliskoizogeniczne zawierające zidentyfikowane, nowe allele badanych genów oraz allel *uzu1.a* (będący źródłem półkarłowości w hodowli jęczmienia; *uzu* to historyczna nazwa genu *HvBR1*) zostały poddane analizie fenotypowej w eksperymencie, którego celem było określenie reakcji tych linii na podwyższoną temperaturę otoczenia (26°C) względem warunków kontrolnych (14°C). Eksperyment ten miał na celu określenie potencjalnego wykorzystania tych półkarłowych mutantów w programach hodowlanych w obliczu nadchodzących zmian klimatycznych. Analizy wykazały, że w podwyższonej temperaturze wzrost roślin mutantów *uzu1.a* jest silnie zredukowany w porównaniu do innych mutantów BR. Z uwagi na fakt, że ta zależność fenotypu od temperatury jest specyficzna tylko dla allelu *uzu1.a*, nowo zidentyfikowane mutanty mogą stanowić alternatywę dla *uzu* w programach hodowlanych w przyszłości, szczególnie uwzględniając nadchodzące globalne zmiany klimatyczne (**Dockter, Gruszka i in., 2014; Plant Physiology**, 166: 1912–1927).

Badania nad analizą funkcjonalną genów jęczmienia kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę i percepcję BR były prowadzone również z zastosowaniem strategii tzw. ‘odwrotnej genetyki’ - TILLING. W tym celu wykorzystano wyprawioną w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ populację *HorTILLUS*, uzyskaną po traktowaniu mutagenicznym ziaren jęczmienia odmiany ‘Sebastian’ azydkiem sodu oraz *N*-metylo-*N*-nitrozomocznikiem. Analiza funkcjonalna dotyczyła dwóch genów, z których pierwszy (*HvDWARF*) koduje enzym katalizujący biosyntezę BR, natomiast drugi (*HvBR1*) koduje receptor BR. Analizę funkcjonalną genu *HvDWARF* rozpoczęto od identyfikacji jego pełnej sekwencji i struktury, co umożliwiło odpowiednie zaprojektowanie starterów PCR do analiz TILLING. W wyniku analiz zidentyfikowano łącznie 11 nowych alleli tego genu, z czego 5 miało charakter mutacji zmiany sensu, a 6 niosło mutacje zlokalizowane w intronach tego genu. Wielokierunkowe analizy fenotypowe roślin homozygotycznych względem zidentyfikowanych mutacji wykazały, że dwa spośród zidentyfikowanych alleli wywołują obniżoną wysokość roślin, spowodowaną zaburzeniami w biosyntezie BR. Pierwszy ze zidentyfikowanych alleli (*brd1-c*), których nazwy (ang. *brassinosteroid deficient1*) odpowiadają akronimom mutantów homologicznych genów ryżu siewnego (*Oryza sativa*) i kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), zawiera substytucję G3050T w obrębie eksonu piątego, wywołującą zmianę wysoce konserwowanej argininy-347 na izoleucynę. Drugi ze zidentyfikowanych alleli (*brd1-d*), zawiera substytucję C3365T w obrębie traktu polipirymidynowego szóstego intronu.

Wykazano z użyciem metod biologii molekularnej, że ta mutacja powoduje zaburzenie splicingu kodowanego transkryptu, co skutkuje obecnością w dojrzałym transkrypcie intronu szóstego, a tym samym zmianą ramki odczytu i wystąpieniem przedwczesnego kodonu stop. Analizy przeprowadzone z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych wskazały, że oba zidentyfikowane allele kodują polipeptydy o zmienionej aranżacji drugorzędowych domen strukturalnych (szczególnie znaczące zmiany odnotowano w przypadku wersji polipeptydu kodowanej przez allel *brd1-d*). Odzwierciedleniem różnic w przewidywanej strukturze polipeptydów kodowanych przez allele *brd1-c* i *brd1-d* jest różnica w zakresie redukcji wysokości roślin mutantów – fenotyp homozygotycznych roślin mutantów *brd1-c* jest półkarłowy, podczas gdy homozygotyczne rośliny mutantów *brd1-d* wykazują bardzo znaczącą redukcję wzrostu i fenotyp karłowy. Analizy genetyczne, fizjologiczne oraz pomiar akumulacji endogennych BR potwierdziły, że fenotypy zidentyfikowanych mutantów spowodowane są zaburzeniami w biosyntezie BR. Uzyskane wyniki i analizy porównawcze z innymi mutantami biosyntezy BR dostarczyły nowych, bardzo istotnych informacji na temat mechanizmów regulacji tego procesu u jęczmienia (**Gruszka i in., 2016a**; *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 600).

W przypadku drugiego z analizowanych metodą TILLING genów, *HvBR11*, materiał badań stanowiła populacja roślin  $M_2$  wyprowadzona po traktowaniu mutagenicznym z użyciem *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika ziaren linii podwojonego haploida ‘H930-36’. Analizie poddano dwa fragmenty genu o łącznej długości 1356 pz. W wyniku analiz zidentyfikowano nowy allel tego genu (*uzul.c*), zawierający substytucję G2171A, która powoduje zamianę argininy-710 na lizynę. Pozycja zamienionego aminokwasu znajduje się w bliskim sąsiedztwie domeny transbłonowej. Po wyprowadzeniu formy homozygotycznej tego mutantu przeprowadzono szereg analiz fenotypowych, genetycznych i fizjologicznych. Zidentyfikowana mutacja wywołuje półkarłowy i erektoidalny fenotyp, obserwowano również falistość brzegów blaszek liściowych u nasady. Długości kłosa i ości mutantów są mniejsze niż u formy wyjściowej (kłos zbity), jednak liczba ziaren w kłosie i płodność roślin nie uległy obniżeniu. Tak więc fenotyp zidentyfikowanego mutantu odpowiadał cechom charakterystycznym mutantów BR jęczmienia opisanym powyżej. Analizy genetyczne wykazały, że zidentyfikowany mutant jest alleliczny względem innych mutantów genu *HvBR11* (*uzul.a* i *uzul.b*). Potwierdzeniem tych wyników było stwierdzenie, że zidentyfikowany mutant nie wykazuje zwiększonej elongacji siewki podczas wzrostu w ciemności (cecha charakterystyczna mutantów BR). Cechą nowego mutantu, stwierdzoną po przeprowadzeniu testów fizjologicznych, jest obniżona wrażliwość na egzogennie aplikowany BR, wcześniej zidentyfikowane mutanty alleliczne *uzul.a* i *uzul.b* wykazywały całkowitą niewrażliwość na BR (**Dockter, Gruszka i in., 2014**; *Plant Physiology*, 166: 1912–1927). Tym samym przeprowadzone badania umożliwiły znaczące wzbogacenie wiedzy na temat analizy funkcjonalnej receptora BR u jęczmienia oraz potwierdziły użyteczność opracowanej metody wizualnego identyfikowania mutantów BR jęczmienia.

Opisane powyżej eksperymenty prowadzone były we współpracy międzynarodowej z kilkoma instytucjami naukowymi, szczególnie z Carlsberg Laboratory w Kopenhadze. Uzyskane wyniki są efektem m. in. realizacji projektu badawczego, prowadzonego pod moim

kierownictwem, a finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (IP2011–016471, program ‘*Iuventus Plus*’).

### **Badania nad wpływem endogennych BR na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody z wykorzystaniem półkarłowych mutantów**

Zmiany klimatyczne w przyszłości mogą wiązać się z niedoborem opadów w czasie wegetacji zbóż oraz występowaniem innych niekorzystnych warunków atmosferycznych. Biorąc pod uwagę znaczenie półkarłowości zbóż dla rolnictwa rozpocząłem badania nad charakterystyką reakcji fizjologicznych półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stres niedoboru wody. Materiałem roślinnym w pierwszym z przeprowadzonych badań były zidentyfikowane przeze mnie półkarłowe mutanty odmiany ‘Delisa’, pochodzące z kolekcji Katedry Genetyki WBiOŚ UŚ. Dwa alleliczne mutanty 522DK i 527DK cechują się jednonukleotydowymi substytucjami w różnych fragmentach genu *HvDWARF* kodującego enzym biosyntezy BR. Mutacje powodują zamiany aminokwasów zlokalizowanych w wysoce konserwowanych domenach kodowanego polipeptydu. Wpływ zidentyfikowanych mutacji na fenotyp mutantów został potwierdzony poprzez zastosowanie testów fizjologicznych oraz pomiar akumulacji endogennych BR (**Gruszka i in., 2016a; *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 600**). Badane mutanty poddano wielokierunkowym analizom fizjologicznym w celu określenia roli endogennych BR w regulacji sprawności fotosystemu II, akumulacji barwników fotosyntetycznych, przebiegu procesu fotosyntezy i wymiany gazowej oraz asymilacji CO<sub>2</sub>. U badanych genotypów określono również aktywność karboksylazy-oksigenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) oraz profil akumulacji cukrów. Uzyskane wyniki pozwoliły na wielowymiarową charakterystykę fizjologiczną badanych mutantów. W warunkach kontrolnych mutanty wykazują obniżoną (8-26%) zawartość chlorofilu a i b w porównaniu do odmiany wyjściowej oraz obniżoną o 22-32% aktywność RuBisCO, jednak w warunkach suszy nie odnotowano znaczących różnic między badanymi genotypami. Mutanty wykazały podobne do odmiany ‘Delisa’ zawartości karotenoidów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i podczas suszy. Analizy wykazały ponadto wpływ endogennych BR na profil akumulacji cukrów. W warunkach kontrolnych mutanty wykazują zwiększone (o ponad 30%) w porównaniu do odmiany ‘Delisa’ stężenia glukozy i fruktozy, a obniżone (o ponad 20%) stężenia sacharozy. Wykazano, że stres suszy powoduje zwiększenie akumulacji monosacharydów, a jednocześnie znaczne obniżenie stężenia sacharozy u wszystkich badanych genotypów. Przeprowadzone badania pozwoliły więc wykazać wpływ endogennych BR na profil akumulacji cukrów oraz określić zmiany w tym profilu wywołane stresem suszy. Z punktu widzenia znaczenia półkarłowości dla hodowli zbóż, bardzo istotnym rezultatem prowadzonych badań było wykazanie, że półkarłowe mutanty jęczmienia wykazują większą tolerancję na niedobór wody niż odmiana ‘Delisa’. Stres suszy spowodował znaczne obniżenie wzrostu roślin odmiany ‘Delisa’, jednocześnie nie powodując znaczących zmian we wzroście półkarłowych mutantów. Ten efekt widoczny był zarówno bezpośrednio po przeprowadzeniu stresu suszy, jak i po fazie rehydratacji (**Janeczko i in., 2016; *Plant Physiology and Biochemistry*, 99: 126-141**). Tak więc przeprowadzone badania dostarczyły wielu cennych informacji na temat fizjologicznej reakcji mutantów BR

jęczmienia na stres niedoboru wody, ale również wykazały, że te mutanty charakteryzują się większą tolerancją na stres suszy niż odmiana wyjściowa 'Delisa', co stanowi istotne potwierdzenie, że półkarłowe mutanty jęczmienia mogą stanowić alternatywę w przyszłych programach hodowlanych również ze względu na nadchodzące zmiany klimatyczne.

Istotność tych wyników skłoniła mnie do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów mających na celu sprawdzenie, czy obserwowana zwiększona tolerancja półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stres niedoboru wody jest niezależna od tła genetycznego badanych form. Materiałem roślinnym w kolejnym eksperymencie były scharakteryzowane, półkarłowe linie bliskoizogeniczne BW084, BW091 i BW333, które cechują się zaburzeniami w procesie biosyntezy BR, dwie półkarłowe linie – BW312 i BW885, które wykazują zaburzenia w procesie szlaku transdukcji sygnału BR oraz odmiana referencyjna 'Bowman'. Linia BW084 (*brh13.p*) cechuje się mutacją zmiany sensu w genie *HvCPD*, linia BW091 (*brh3.g*) charakteryzuje się mutacją nonsensowną w genie *HvBRD*, a linia BW333 (*ert-zd.159*) niesie mutację zmiany sensu w genie *HvDIM*, natomiast linie BW312 (*ert-ii.79*) i BW885 (*uzu1.a*) cechują się mutacjami zmiany sensu w różnych domenach receptora HvBRI1. Po 28-dniowym okresie wzrostu w warunkach optymalnego nawodnienia rośliny wszystkich badanych genotypów podzielono na dwie grupy, pierwsza grupa roślin wzrastała do końca eksperymentu w warunkach optymalnych (kontrola), podczas gdy druga grupa wzrastała w warunkach 15-dniowego narastającego deficytu wody. Wykonane obserwacje oraz analizy fizjologiczne wskazały jednoznacznie, że rośliny badanych półkarłowych linii bliskoizogenicznych wykazują opóźniony względem roślin odmiany 'Bowman' moment wędnięcia. Symptomy wędnięcia były obserwowane najpierw u roślin odmiany 'Bowman', natomiast rośliny mutantów BR wykazywały głównie zwijanie blaszek liściowych wzdłuż osi podłużnej. W warunkach kontrolnych wskaźnik fotosyntezy netto ( $P_n$ ) nie wykazywał znaczących różnic między analizowanymi genotypami. Stres suszy spowodował obniżenie wartości tego wskaźnika u wszystkich badanych genotypów, jednak co istotne względne obniżenie wartości tego wskaźnika w stosunku do wartości kontrolnej było najbardziej znaczące (41,2%) u roślin odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych wartości transpiracji ( $E$ ) oraz przewodnictwa szparkowego ( $g_s$ ) były bardzo zbliżone u wszystkich analizowanych genotypów. Stres suszy spowodował obniżenie transpiracji i przewodnictwa szparkowego u wszystkich genotypów, jednak podczas tego stresu rośliny mutantów BR utrzymywały wartości tych wskaźników na poziomie podobnym lub wyższym w porównaniu do roślin odmiany 'Bowman' (**Gruszka i in., 2016b**; *Frontiers in Plant Science*, 7: 1824).

Tym samym przeprowadzone analizy pozwoliły na charakterystykę reakcji fizjologicznej mutantów BR na stres niedoboru wody, ale również potwierdziły, że obserwowana zwiększona tolerancja półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stres suszy jest niezależna od tła genetycznego badanych form. Te wyniki wskazują na możliwość potencjalnego wykorzystania półkarłowych mutantów BR jęczmienia w przyszłych programach hodowlanych, szczególnie w obliczu nadchodzących globalnych zmian klimatycznych. Opisane powyżej badania prowadzone były we współpracy z krajowymi i zagranicznymi instytucjami naukowymi, szczególnie z Instytutem Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie oraz Palacký University w Ołomuńcu (Czechy). Badania prowadzone były w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju

Wsi (decyzja: HOR hn-801-11/14), który jest obecnie realizowany pod moim kierownictwem.

### **Rola endogennych BR w regulacji homeostazy innych fitohormonów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz niedoboru wody**

Z uwagi na fakt, że regulowanie przez BR szerokiego zakresu procesów fizjologicznych jest możliwe poprzez skomplikowaną sieć interakcji z innymi fitohormonami, kolejnym celem badań było określenie zmian w profilu akumulacji endogennych BR podczas reakcji roślin jęczmienia na stres suszy, a także opisanie roli endogennych BR w regulacji homeostazy innych fitohormonów w warunkach kontrolnych oraz podczas stresu suszy. Materiał roślinny prowadzonych eksperymentów stanowiły przedstawione powyżej, scharakteryzowane linie bliskoizogeniczne. Schemat doświadczenia i warunki stresu suszy zostały opisane powyżej. Pomiary stężeń endogennych fitohormonów (BR, auksyn, cytokinin, giberelin, kwasu abscysynowego, kwasu jasmonowego oraz kwasu salicylowego) wykonano metodą ultrasprawnej chromatografii ciekowej, sprzężonej ze spektrometrią masową (UHPLC-MS/MS).

Analiza akumulacji endogennych BR wykazała, że w reakcji na suszę stężenie kastasteronu (najbardziej aktywnej biologicznie formy BR u jednoliściennych) uległo zwiększeniu u wszystkich analizowanych genotypów, jednak efekt ten był najbardziej znaczący w przypadku linii niewrażliwych na BR. Ten wynik wskazuje, że kastasteron pełni rolę w regulacji odpowiedzi fizjologicznej roślin jęczmienia na stres niedoboru wody. Analizy wykazały akumulację relatywnie niewysokich stężeń innej formy BR, 24-epibrasinolidu. W warunkach kontrolnych ten związek ulegał akumulacji specyficznie u jednego z analizowanych genotypów – linii BW885, niewrażliwej na BR. Stres niedoboru wody spowodował akumulację 24-epibrasinolidu u wszystkich analizowanych genotypów. Wynik ten sugeruje, że 24-epibrasinolid jest kolejnym, obok kastasteronu, przedstawicielem BR, którego akumulacja jest indukowana stresem suszy, przy czym poziom akumulacji 24-epibrasinolidu w warunkach tego stresu był porównywalny u wszystkich analizowanych genotypów. Określono również profil zawartości homokastasteronu, który ulegał akumulacji w znacznych stężeniach u wszystkich analizowanych genotypów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie suszy. Zaobserwowano ciekawą zależność po porównaniu profili akumulacji homokastasteronu pomiędzy analizowanymi genotypami: w warunkach kontrolnych znacząco wyższe w stosunku do odmiany ‘Bowman’ stężenia homokastasteronu odnotowano w liniach bliskoizogenicznych cechujących się zaburzeniami w biosyntezie kastasteronu. Najniższą koncentrację homokastasteronu odnotowano u roślin linii BW312 cechującej się niewrażliwością na BR, u której wykazano najwyższą koncentrację kastasteronu. Tym samym wykazano, że w warunkach kontrolnych akumulacja homokastasteronu jest odwrotnie skorelowana z akumulacją kastasteronu. Co ciekawe, stres suszy nie spowodował zwiększenia akumulacji homokastasteronu w analizowanych genotypach. Tym samym, przeprowadzone analizy pozwoliły na określenie szczegółowego profilu akumulacji BR u jęczmienia zarówno w warunkach kontrolnych, jak i podczas suszy.

Analizie poddano również profil akumulacji różnych form giberelin. Badanie biologicznie aktywnej formy giberelin, GA<sub>7</sub>, wykazało, że w warunkach kontrolnych linie bliskoizogeniczne z mutacjami w genach biosyntezy i sygnalizacji BR zawierały znacząco obniżone koncentracje tego związku (ok. 14% - 46% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'). Zatem prezentowane badania wykazały, że poziom akumulacji GA<sub>7</sub> jest u jęczmienia zależny od metabolizmu BR. Stres niedoboru wody spowodował znaczący wzrost w akumulacji endogennej GA<sub>7</sub> u wszystkich analizowanych genotypów, jednak u linii z mutacjami w genach metabolizmu BR ten efekt był jeszcze bardziej znaczący (ok. 370% - 1050% wartości kontrolnych), niż u odmiany 'Bowman' (ok. 180% wartości kontrolnej). W rezultacie, w warunkach stresu suszy koncentracje endogennej GA<sub>7</sub> były porównywalne u wszystkich analizowanych genotypów. Te wyniki wskazują, że u jęczmienia giberelina GA<sub>7</sub> jest główną aktywną biologicznie formą giberelin, której akumulacja jest znacząco indukowana przez stres suszy.

W warunkach kontrolnych akumulacja kwasu abscysynowego (ABA) w liniach bliskoizogenicznych osiągała podobne wartości do odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Zgodnie z oczekiwaniami, stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost akumulacji ABA u wszystkich analizowanych genotypów. Akumulacja ABA wzrosła co najmniej siedmiokrotnie, jednak między genotypami nie obserwowano żadnej tendencji, również po określeniu dla każdego z genotypów względnego wzrostu akumulacji ABA względem wartości kontrolnej. Wyniki te wskazują, że zaburzenia w biosyntezie lub sygnalizacji BR nie wpływają na homeostazę ABA w warunkach kontrolnych, jak również nie zmniejszają zdolności mutantów BR do reakcji na stres niedoboru wody, objawiającej się znaczącym wzrostem akumulacji ABA.

Po określeniu profilu akumulacji kwasu salicylowego (SA) stwierdzono, że w warunkach kontrolnych większość z analizowanych linii bliskoizogenicznych zawiera podobne do odmiany 'Bowman' stężenia tego hormonu. Stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost stężenia SA u wszystkich badanych genotypów (ok. 190% - 500% wartości kontrolnych), jednak nie obserwowano żadnej tendencji pomiędzy genotypami. Wyniki te wskazują, że zmiany w homeostazie SA są fizjologiczną reakcją roślin jęczmienia na stres niedoboru wody.

Wykazano, że w warunkach kontrolnych wszystkie linie bliskoizogeniczne zawierają znacząco obniżone stężenia kwasu jasmonowego (JA) w porównaniu do odmiany 'Bowman'. Te wyniki wskazują, że u jęczmienia homeostaza JA jest zależna od biosyntezy i sygnalizacji BR. Stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost akumulacji JA u wszystkich analizowanych genotypów. Mimo, że w warunkach kontrolnych wszystkie mutanty zawierały znacząco obniżone stężenia JA w porównaniu do odmiany 'Bowman', w warunkach stresu poziom akumulacji JA u mutantów był porównywalny lub wyższy. Te wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że mutanty biosyntezy i sygnalizacji BR zachowują zdolność znaczącego zwiększania akumulacji endogennej JA w reakcji na stres suszy (**Gruszka i in., 2016b; *Frontiers in Plant Science*, 7: 1824**).

Przeprowadzone analizy pozwoliły na określenie profilu akumulacji endogennych BR u badanych genotypów jęczmienia w warunkach kontrolnych oraz w stresie suszy. Ponadto uzyskane wyniki umożliwiły szczegółową charakterystykę profilu akumulacji różnych

fitohormonów u badanych genotypów. Badania te wykazały również rolę endogennych BR w regulacji homeostazy innych fitohormonów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz podczas suszy. Eksperymenty te prowadzone były we współpracy krajowej i międzynarodowej w ramach grantu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (decyzja: HOR hn-801-11/14), który jest obecnie realizowany pod moim kierownictwem.

### **Rola endogennych BR w regulacji homeostazy nieenzymatycznych antyoksydantów w warunkach kontrolnych i w stresie niedoboru wody**

Kolejnym celem prowadzonych przeze mnie badań było określenie roli endogennych BR w regulacji procesu akumulacji nieenzymatycznych antyoksydantów u jęczmienia w warunkach optymalnych oraz podczas stresu suszy. Materiał tych badań stanowiły przedstawione powyżej, scharakteryzowane linie bliskoizogeniczne, cechujące się zaburzeniami w procesie biosyntezy lub sygnalizacji BR oraz odmiana 'Bowman'. W tych badaniach określono profile akumulacji zredukowanej (AsA) i utlenionej (DHA) formy askorbinianu, zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG) formy glutationu, różnych przedstawicieli antyoksydantów z grup tokoferoli i tokotrienoli oraz beta-karotenu u badanych genotypów w obu warunkach wzrostu roślin.

W warunkach kontrolnych najwyższe stężenie AsA odnotowano u odmiany 'Bowman'. U badanych linii bliskoizogenicznych stężenia AsA były w różnym stopniu obniżone względem wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Stres suszy spowodował zwiększenie stężeń AsA u wszystkich genotypów, jednak u odmiany 'Bowman' stężenie tego antyoksydantu pozostawało wyższe niż u badanych mutantów BR.

Analiza stężeń DHA wykazała, że w warunkach kontrolnych wszystkie analizowane genotypy zawierały podobne stężenia tej formy askorbinianu. Stres niedoboru wody spowodował zwiększenie akumulacji DHA u wszystkich badanych genotypów, jednak ciekawą zależność odnotowano po porównaniu stężeń DHA pomiędzy odmianą 'Bowman' a badanymi mutantami BR. W warunkach stresu suszy najniższe stężenie DHA odnotowano u odmiany 'Bowman', co więcej u tej odmiany spowodowane suszą zwiększenie akumulacji DHA względem wartości kontrolnej było relatywnie najniższe. W warunkach suszy stężenia DHA były znacząco wyższe u badanych mutantów BR w porównaniu do odmiany 'Bowman'. Ponadto wykazano kolejną ciekawą zależność – w warunkach suszy stosunek akumulacji AsA względem DHA odnotowany u odmiany 'Bowman' był odwrotny względem obserwowanego u badanych mutantów BR.

Określenie profilu akumulacji różnych form glutationu u badanych genotypów w obu warunkach vegetacji doprowadziło do kilku istotnych spostrzeżeń. W warunkach kontrolnych stężenie GSH osiągało bardzo podobne wartości u odmiany 'Bowman' i bliskoizogenicznych linii cechujących się zaburzeniami biosyntezy BR (BW084, BW091 oraz BW333). Jednak niewrażliwe na BR linie BW312 i BW885 zawierały znacząco obniżone stężenia GSH w porównaniu z odmianą 'Bowman' i mutantami biosyntezy BR. Te wyniki wskazują, że wrażliwość na BR jest konieczna dla prawidłowej akumulacji GSH w optymalnych warunkach vegetacji. Stres suszy spowodował zmianę profilu akumulacji GSH, jednak w



różnym zakresie u badanych genotypów - wywołał znaczący wzrost zawartości GSH u odmiany 'Bowman', jednak jedynie niewielkie zmiany w stężeniu GSH u mutantów biosyntezy BR. Stres niedoboru wody spowodował znaczne zwiększenie akumulacji GSH u linii niewrażliwych na BR. Po stresie suszy zawartości GSH były podobne u mutantów BR, jednak znacząco obniżone w porównaniu do odmiany 'Bowman'.

W warunkach kontrolnych całkowite zawartości glutationu (GSH i GSSG) były bardzo zbliżone u odmiany 'Bowman' i mutantów biosyntezy BR, jednak linie niewrażliwe na BR wykazywały znacznie niższą całkowitą akumulację glutationu. Tym samym uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach kontrolnych prawidłowy przebieg sygnalizacji BR jest konieczny dla odpowiedniej akumulacji glutationu (szczególnie GSH). Stres suszy spowodował zwiększenie całkowitej zawartości glutationu u wszystkich badanych genotypów, jednak obserwowano różne profile zmian. Znaczące, stymulowane stresem suszy zwiększenie całkowitej zawartości glutationu odnotowano u odmiany 'Bowman'. U mutantów biosyntezy BR stymulowane stresem niedoboru wody zwiększenie całkowitej zawartości glutationu było mniej znaczące. U mutantów niewrażliwych na BR stres suszy spowodował znaczące zwiększenie całkowitej zawartości glutationu. Należy podkreślić, że w warunkach stresu suszy całkowita zawartość glutationu była znacznie wyższa u odmiany 'Bowman' w porównaniu z badanymi mutantami BR.

W prezentowanych badaniach określono również profil akumulacji różnych tokoferoli. Wykazano, że u wszystkich badanych genotypów  $\alpha$ -tokoferol występuje w najwyższych stężeniach w porównaniu z innymi przedstawicielami tej grupy antyoksydantów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie suszy. Niemniej, w warunkach kontrolnych stężenia  $\alpha$ -tokoferolu były znacząco niższe u mutantów BR niż u odmiany 'Bowman'. Stres suszy spowodował znaczne zwiększenie akumulacji  $\alpha$ -tokoferolu u wszystkich genotypów, jednak u mutantów BR stężenia  $\alpha$ -tokoferolu pozostały znacznie obniżone w porównaniu do wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'.

W warunkach kontrolnych stężenia  $\gamma$ -tokoferolu (podobnie do akumulacji  $\alpha$ -tokoferolu) były znacznie obniżone u mutantów BR względem wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Stres suszy spowodował znaczne zwiększenie akumulacji  $\gamma$ -tokoferolu u wszystkich genotypów. Należy podkreślić, że w warunkach suszy stężenia  $\gamma$ -tokoferolu u mutantów BR pozostały znacznie obniżone względem wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'.

Te badania pozwoliły na określenie pełnego profilu akumulacji wszystkich przedstawicieli tokoferoli. W warunkach kontrolnych mutanty BR zawierały znacznie niższe całkowite zawartości tokoferoli w porównaniu do odmiany 'Bowman'. Stres suszy spowodował znaczne zwiększenie całkowitej zawartości tokoferoli u wszystkich genotypów, jednak u analizowanych mutantów BR całkowite zawartości tokoferoli pozostawały znacznie niższe niż u odmiany 'Bowman'. Uzyskane wyniki wskazują, że endogenne BR oraz prawidłowy przebieg ich biosyntezy i sygnalizacji są konieczne dla normalnej akumulacji tokoferoli u jęczmienia, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i podczas suszy (**Gruszka i in., 2017; *Physiologia Plantarum*, DOI: 10.1111/ppl.12674, w druku**). Badania te były prowadzone we współpracy krajowej i międzynarodowej w ramach grantu finansowanego

przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (decyzja: HOR hn-801-11/14), który jest obecnie realizowany pod moim kierownictwem.

**Najważniejsze rezultaty i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

1. Z wykorzystaniem kolekcji półkarłowych mutantów jęczmienia zidentyfikowano oraz scharakteryzowano molekularnie i funkcjonalnie cztery geny (*HvDWARF*, *HvBRD*, *HvCPD*, *HvDIM*) kodujące enzymy biorące udział w biosyntezie BR oraz wykonano dodatkową analizę funkcjonalną genu *HvBR11* kodującego receptor BR.
2. Funkcje zidentyfikowanych genów oraz podłoże fizjologiczne fenotypu tych mutantów określono poprzez analizę profilu akumulacji endogennych BR oraz poprzez analizy alleliczności. Badania te doprowadziły do identyfikacji ponad 20 nowych, półkarłowych mutantów BR jęczmienia, które mogą stanowić alternatywę w przyszłych programach hodowlanych.
3. Wykazano, że zidentyfikowane półkarłowe mutanty jęczmienia, charakteryzujące się zaburzeniami biosyntezy lub percepcji BR, wykazują wyższą tolerancję na niedobór wody w porównaniu z odmianami rodzicielskimi.
4. Stwierdzono, że endogenne BR należą do grupy hormonów, których stężenie wzrasta w reakcji na stres niedoboru wody, co wskazuje, że regulują odpowiedź fizjologiczną roślin na ten stres.
5. Wykazano, że endogenne BR regulują homeostazę innych fitohormonów (gibereliny GA<sub>7</sub> i kwasu jasmonowego) u jęczmienia w warunkach optymalnego nawodnienia. Stwierdzono również, że mutanty biosyntezy i sygnalizacji BR zachowują zdolność znaczącego zwiększania akumulacji GA<sub>7</sub> i kwasu jasmonowego w reakcji na stres suszy. Określono również profil zmian w akumulacji innych fitohormonów u półkarłowych mutantów BR w reakcji na stres niedoboru wody, co przyczyniło się do lepszego zrozumienia odpowiedzi fizjologicznej roślin jęczmienia na ten stres.
6. Wykazano, że endogenne BR oraz prawidłowy przebieg procesów biosyntezy i sygnalizacji tych hormonów pełnią istotną rolę w regulacji homeostazy kluczowych nieenzymatycznych antyoksydantów zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i podczas suszy.

**5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

**Charakterystyka nowego allelu genu *HvBR11* (*Uzu*) kodującego receptor BR oraz identyfikacja pierwszego genu kodującego enzym katalizujący biosyntezę BR u jęczmienia**

Moje zainteresowanie rolą BR w regulacji fizjologii roślin oraz identyfikacją genów zaangażowanych w metabolizm BR u jęczmienia miało swoje początki w czasie

rozpoczynania przeze mnie studiów doktoranckich. Pierwszym zidentyfikowanym i scharakteryzowanym fizjologicznie mutantem BR jęczmienia była szeroko wykorzystywana w rolnictwie w Azji Wschodniej spontaniczna, półkarłowa forma *uzu*, której fenotyp i niewrażliwość na BR spowodowane są mutacją w genie kodującym receptor HvBRI1. Do czasu rozpoczęcia przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej był to jedyny znany mutant BR jęczmienia. Badania prowadzone przeze mnie w ramach pracy doktorskiej zmierzały do identyfikacji i analizy funkcjonalnej genów jęczmienia, kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm BR. Wyniki tych badań zostały przeze mnie opublikowane w formie trzech, przedstawionych poniżej artykułów naukowych. Materiałem prowadzonych badań była kolekcja półkarłowych mutantów jęczmienia, która powstała w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ w efekcie eksperymentów z zastosowaniem fizycznych i chemicznych środków mutagenicznych. W rezultacie prowadzonych przeze mnie testów fizjologicznych (testu etiolacji oraz testu rozwijania blaszek liściowych), z tej kolekcji wyselekcjonowano formy, których fenotyp spowodowany jest zaburzeniami w biosyntezie lub sygnalizacji BR. Jednym z niewrażliwych na BR półkarłowych mutantów był 093AR, pochodzący z odmiany 'Aramir'. Przeprowadzone analizy genetyczne wykazały, że mutant 093AR jest alleliczny względem mutantu *uzu*. Analiza sekwencji genu *HvBRI1* u mutantu 093AR pozwoliła na identyfikację podwójnej substytucji typu CC>AA w pozycjach 1760-1761 tego genu. Przeprowadzona analiza translacji *in silico* z zastosowaniem programu Jellyfish wykazała, że zidentyfikowane substytucje powodują zamianę wysoce konserwowanej treoniny-573 na lizynę (**Gruszka i in., 2006**). Treonina-573 jest ostatnim aminokwasem wchodzącym w skład 70-aminokwasowego regionu, który odpowiedzialny jest za wiązanie przez receptor cząsteczek BR. Tym samym zidentyfikowano nowy allel genu *HvBRI1*, jako że u mutantu *uzu* zamiana histydyny-857 na argininę dotyczy domeny kinazowej receptora. Analizy przeprowadzone z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych (PSIPRED oraz SOPMA), które miały na celu określenie lokalizacji domen drugorzędowych w strukturze receptora HvBRI1 wykazały, że wysoce konserwowana treonina-573 zlokalizowana jest w obrębie krótkiej alfa-helisy, która zajmuje analogiczne pozycje w homologicznych polipeptydach BRI1 pochodzących z gatunków jedno- (*H. vulgare* i *O. sativa*), jak i dwuliściennych (*A. thaliana* i *S. lycopersicum*), co świadczy o istotnym znaczeniu tej domeny dla konformacji receptora BR (**Gruszka i in., 2011a**).

Stosując tę samą strategię oraz kolekcję mutantów w ramach pracy doktorskiej zidentyfikowałem również sekwencję transkryptu pierwszego genu, *HvDWARF*, kodującego enzym zaangażowany w biosyntezę BR u jęczmienia. Enzym kodowany przez zidentyfikowaną sekwencję należy do rodziny białek cytochromowych P450 i (jak wykazały późniejsze prowadzone przeze mnie badania) katalizuje biosyntezę najbardziej aktywnej biologicznie formy BR u jednoliściennych – kastasteronu. Analizę funkcjonalną zidentyfikowanej sekwencji przeprowadzono z użyciem grupy półkarłowych mutantów wykazujących wrażliwość na egzogenne BR w teście rozwijania blaszek liściowych. W obrębie sekwencji transkryptu *HvDWARF* zidentyfikowano mutacje zmiany sensu u dwóch allelicznych, półkarłowych mutantów 522DK i 527DK z odmiany 'Delisa'. Zidentyfikowane mutacje powodują zamiany aminokwasów zlokalizowanych w wysoce konserwowanych fragmentach sekwencji kodowanego polipeptydu. W przypadku mutantu 522DK

zidentyfikowana substytucja powoduje zamianę waliny-341 na izoleucynę, natomiast zidentyfikowana u allelicznego mutantu 527DK tranzycja powoduje zamianę glutaminy-442 na argininę. Analizy bioinformatyczne, przeprowadzone z zastosowaniem programu PSIPRED wykazały, że oba aminokwasy podlegające mutacyjnym zamianom zlokalizowane są w obrębie drugorzędowych domen strukturalnych, co więcej zidentyfikowane substytucje prowadzą do zmian w przewidywanej aranżacji drugorzędowych domen strukturalnych, co potwierdziło wpływ zidentyfikowanych mutacji na funkcjonowanie kodowanego enzymu, a tym samym na fenotyp mutantów (**Gruszka i in., 2011b**).

### **Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów kodujących enzymy uczestniczące w naprawie uszkodzeń DNA u jęczmienia oraz utworzenie bazy danych tych genów (bEST-DRRD)**

W latach 2009–2014, równoległe z przedstawionymi powyżej badaniami dotyczącymi metabolizmu BR u jęczmienia, które stanowią główne osiągnięcie naukowe, kierowałem projektami dotyczącymi analizy funkcjonalnej genów kodujących enzymy zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA u tego gatunku. Badanie tych zagadnień miało na celu poznanie mechanizmów indukowania zmienności genetycznej i wykorzystywania mutagenyzy do identyfikacji nowych mutantów jęczmienia. Z uwagi na wysoką złożoność badanego procesu realizację projektów rozpoczęto od utworzenia bazy danych sekwencji związanych z procesami replikacji i naprawy DNA u *A. thaliana* jako gatunku modelowego. Sekwencje genów kodujących enzymy zaangażowane w te procesy wykazują wysoki poziom konserwowania w obrębie różnych grup organizmów, co pozwoliło na wykorzystanie sekwencji pochodzących z *A. thaliana* (podzielonych na kategorie według procesu, który regulują) jako kwerend do wyszukiwania sekwencji homologicznych, pochodzących z genomu jęczmienia oraz dwóch innych gatunków jednoliściennych - *Oryza sativa* i *Brachypodium distachyon*. Utworzona przeze mnie w ten sposób baza *barley EST DNA Replication and Repair Database* (bEST-DRRD) (URL: <http://www.best.us.edu.pl>) jest ogólnodostępnym narzędziem identyfikacji genów jęczmienia zaangażowanych w proces naprawy DNA oraz repozytorium danych odnoszących się do zidentyfikowanych w tych genach mutacji (**Gruszka i in., 2012a**).

Przedstawiona powyżej baza danych bEST-DRRD posłużyła jako narzędzie identyfikacji genów jęczmienia zaangażowanych w różne procesy naprawy DNA, w tym genów *HvPARP3* oraz *HvKu80*. Produkt genu *HvPARP3* poprzez interakcje z innymi czynnikami stanowi element reakcji na obecność w genomie podwójnoniciowych pęknięć DNA (ang. *Double-strand breaks*, DSB). Zidentyfikowana sekwencja tego genu została poddana analizie funkcjonalnej z użyciem metody TILLING i populacji roślin M<sub>2</sub> *HorTILLUS*, którą wyprowadzono w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ. Zidentyfikowane homozygotyczne mutanty oraz odmiana rodzicielska ‘Sebastian’ były charakteryzowane m. in. poprzez określenie liczby DSB i obecności ich znacznika, jakim jest zmodyfikowana, fosforylowana wersja histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) w materiale kontrolnym oraz po zastosowaniu bleomycyny, jako czynnika wywołującego DSB. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wykazanie funkcji genu *HvPARP3* w regulacji procesu naprawy DNA u jęczmienia. Stwierdzono również, że zidentyfikowane mutanty cechują się zmienioną długością

telomerów, co wskazuje, że u jęczmienia produkt genu *HvPARP3* może pełnić podwójną rolę - w naprawie DSB oraz regulacji długości telomerów (Stolarek i in., 2015a).

Podobną strategię zastosowano do identyfikacji sekwencji genu *HvKu80* kodującego inny z czynników biorących udział w procesie naprawy DSB. Podobnie jak w przypadku genu *HvPARP3*, analizę funkcjonalną genu *HvKu80* przeprowadzono z zastosowaniem metody TILLING i populacji roślin *M<sub>2</sub> HorTILLUS*. Zidentyfikowane homozygotyczne mutanty tego genu wykazują znacznie zwiększoną akumulację DSB wywołanych działaniem bleomycyny w porównaniu z odmianą rodzicielską 'Sebastian'. Zmieniona reakcja mutantów na działanie bleomycyny i zmiany w wydajności procesu naprawy DNA są spowodowane niższą ekspresją zmutowanego genu. Wykazano, że zidentyfikowane mutanty cechują się również obniżoną wydajnością naprawy DSB występujących w warunkach kontrolnych (bez stosowania bleomycyny) w porównaniu z odmianą 'Sebastian'. Stwierdzona w przypadku mutantów obniżona ekspresja genu *HvKu80* oraz obniżenie wydajności procesu naprawy DSB, które zostały wykazane z użyciem różnych technik molekularnych, stanowią potwierdzenie funkcji badanego genu. Dodatkowym potwierdzeniem funkcji tego genu jest fakt, że jego ekspresja jest indukowana pod wpływem bleomycyny, co więcej poziom transkrypcji tego genu jest zależny od częstości występowania DSB (Stolarek i in., 2015b).

Skuteczna realizacja kierowanego przeze mnie projektu oraz nawiązanie przeze mnie współpracy w obrębie międzynarodowej grupy naukowców uczestniczących w programie Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA) w Wiedniu, która koordynowała i finansowała prowadzone badania, były podstawą przygotowania obszernej pracy przeglądowej. Celem tej publikacji było przedstawienie mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA, ze szczególnym uwzględnieniem przeniesienia wiedzy na temat tych procesów z modelowych gatunków roślin do gatunków uprawnych. Publikacja przedstawia endo- i egzogenne źródła uszkodzeń DNA, a następnie obszernie charakteryzuje poszczególne mechanizmy naprawy tych uszkodzeń wraz z opisem wydajności tych procesów, genetycznej kontroli ich przebiegu oraz znaczenia dla rolnictwa. Praca omawia również rolę indukcji i naprawy DSB w procesach ukierunkowanej mutagenyzy. Publikacja przedstawia także najnowsze doniesienia na temat funkcji niskocząsteczkowych RNA w procesach naprawy DNA. Ostatnie rozdziały tej publikacji dotyczą roli mechanizmów naprawy DNA w reakcji roślin na stresy biotyczne oraz znaczenia tych procesów dla opartej na mutagenyzie hodowli roślin (Manova i Gruszka, 2015).

### **Wykorzystanie mutagenyzy chemicznej i fizycznej do tworzenia platform analizy funkcjonalnej genów z zastosowaniem strategii TILLING oraz identyfikacja funkcji genów w oparciu o analizę profilu ekspresji z zastosowaniem mikromacierzy DNA**

Biorąc pod uwagę, że kluczowymi narzędziami umożliwiającymi analizę funkcjonalną genów są kolekcje mutantów, mogące stanowić materiał badań prowadzonych zarówno zgodnie z metodyką analizy genetycznej, jak i z użyciem strategii tzw. 'odwrotnej genetyki', niezwykle istotnym jest opracowanie skutecznych metod uzyskiwania mutantów z zastosowaniem technik mutagenyzy oraz wydajnych metod analiz sekwencji i funkcji genów. Te zagadnienia zostały opisane w serii publikacji, których jestem współautorem, mających

charakter prac przeglądowych, oryginalnych, a także rozdziałów w monografiach, które zostaną przedstawione poniżej.

Pierwsza z publikacji dotyczy metody TILLING jako narzędzia 'odwrotnej genetyki' i przedstawia etapy tworzenia platformy TILLING wraz z wykazem gatunków roślin modelowych i uprawnych, dla których powstały takie platformy. Dla każdego z gatunków przedstawiono typ stosowanego mutagenu, liczebność populacji roślin  $M_2$ , liczbę genów przeanalizowanych z użyciem poszczególnych platform oraz liczbę zidentyfikowanych mutacji. Szczegółowe zestawienia przedstawiają również spektrum i typy mutacji zidentyfikowanych z wykorzystaniem poszczególnych platform TILLING. Publikacja zawiera również opis narzędzi bioinformatycznych, metod i aparatury, które mogą być wykorzystywane w trakcie analiz. Przedstawiono również modyfikacje strategii TILLING i ich zastosowania. Ostatnia część tej publikacji poświęcona jest charakterystyce nowych alleli zidentyfikowanych z użyciem metody TILLING oraz ich znaczeniu dla analizy funkcjonalnej genów (**Kurowska i in., 2011**).

W trakcie studiów doktoranckich odbyłem trzymiesięczny staż naukowy w John Innes Centre, w Norwich (Wielka Brytania) w ramach programu Unii Europejskiej Lifelong Learning Programme 'Erasmus'. Moim celem podczas tego stażu naukowego było nabycie umiejętności analizy danych pochodzących z eksperymentów wykorzystujących mikromacierze DNA. Materiałem badań był mutant *eam8* (*early maturity 8*) cechujący się zaburzeniem cyklu okołodobowego, które powoduje przyspieszone przejście do generatywnej fazy rozwoju. Prowadzone przeze mnie analizy miały na celu określenie zróżnicowanego wzoru ekspresji genów u badanego mutantu oraz odmian referencyjnych 'Bowman' oraz 'Igri' w różnych warunkach fotoperiodu. W analizach danych dotyczących ekspresji genów wykorzystałem program dChip, a następnie narzędzia Genevestigator oraz Cytoscape. Prowadzone przeze mnie analizy doprowadziły do wytypowania grupy genów wykazujących zróżnicowany wzór ekspresji między mutantem a odmianami referencyjnymi w różnych warunkach fotoperiodu. Dalsze badania oparte na przeprowadzonych przeze mnie analizach ekspresji genów pozwoliły na identyfikację mutacji w genie *HvEAM8*, będącym ortologiem genu *EARLY FLOWERING3 (ELF3) A. thaliana* kodującego regulator cyklu okołodobowego. Wyniki badań dostarczyły nowych informacji na temat mechanizmów adaptacji jęczmienia do krótkiego okresu wegetacyjnego i zostały opublikowane w prestiżowym *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (**Faure i in., 2012**).

W ostatnich latach brałem również udział w realizacji projektu dotyczącego identyfikacji genów jęczmienia kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm strigolaktonów, jako nowej grupy hormonów regulujących morfogenezę i fizjologię roślin. Jednym z efektów realizacji tego projektu jest publikacja przeglądowa, której jestem współautorem, dotycząca roli strigolaktonów w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji reakcji roślin na niedobór składników mineralnych (**Marzec i in., 2013**).

Eksperymenty prowadzone w ramach tego projektu doprowadziły do identyfikacji genu *HvD14*, kodującego hydrolazę biorącą udział w procesie sygnalizacji strigolaktonów. Analiza funkcjonalna tego genu została wykonana z użyciem metody TILLING i populacji roślin  $M_2$  *HorTILLUS*. Zidentyfikowanego, homozygotycznego mutantu charakteryzuje półkarłowy

pokrój oraz znacznie zwiększona w porównaniu do odmiany rodzicielskiej ‘Sebastian’ liczba źdźbeł. Fenotyp mutantu wywołany jest jednonukleotydową substytucją, która powoduje zamianę wysoce konserwowanej glicyny-193 na kwas glutaminowy. Analizy genetyczne i fizjologiczne potwierdziły, że fenotyp mutantu spowodowany jest zidentyfikowaną substytucją. W toku prowadzonych badań wykonałem analizę modelowania homologicznego z użyciem programu UCSF Chimera, której celem była wizualizacja struktury przestrzennej form polipeptydu HvD14, kodowanych przez prawidłową i zmutowaną wersję genu. Analiza wykazała, że glicyna-193, która uległa mutacyjnej zamianie, zlokalizowana jest w obrębie powierzchniowej alfa-helisy ( $\alpha$ D2), która razem z przyległymi alfa-helisami tworzy strukturę otaczającą dostęp do centrum aktywnego enzymu. Analizy struktury przestrzennej polipeptydu HvD14 wykazały, że w zmutowanej wersji tego polipeptydu łańcuch boczny kwasu glutaminowego-193 powoduje przysłonięcie dostępu do centrum aktywnego enzymu, co dodatkowo potwierdziło, że fenotyp mutantu spowodowany jest zidentyfikowaną substytucją (**Marzec i in., 2016**).

Wybór czynnika mutagenicznego jest jednym z kluczowych elementów wpływających na powstanie kolekcji mutantów oraz spektrum indukowanych mutacji, a jednym z mutagenów chemicznych najczęściej stosowanych w eksperymentach prowadzonych na gatunkach roślin uprawnych w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ oraz innych laboratoriach jest azydek sodu ( $\text{NaN}_3$ ). Charakterystykę tego mutagenu przedstawiłem w rozdziale „*Sodium Azide as a Mutagen*”, będącym częścią monografii powstałej w międzynarodowym zespole ekspertów i opublikowanej pod patronatem Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) przez wydawnictwo CAB International. Rozdział, którego jestem autorem, przedstawia metabolizm azydku sodu w komórkach roślin, jego aktywność i efekty fizjologiczne. W kolejnych częściach przedstawiono cytotoksyczny i mutageniczny efekt działania azydku sodu. Rozdział zawiera również protokół zastosowania azydku sodu w mutagenezie jęczmienia, opis typów i częstotliwości mutacji indukowanych z użyciem tego mutagenu oraz charakterystykę interakcji z innymi czynnikami mutagenicznymi (**Gruszka i in., 2012b**).

Zagadnienia indukowanej zmienności genetycznej, zastosowania strategii TILLING oraz nowych metod sekwencjonowania do identyfikacji genów zostały opisane w rozdziale monografii, przygotowanym we współpracy z międzynarodowym zespołem naukowców. Rozdział ten stanowi fragment obszernej monografii dotyczącej biotechnologii jęczmienia, wydanej przez Springer-Verlag GmbH. Rozdział „*Induced Genetic Variation, TILLING and NGS-based Cloning*”, którego jestem współautorem, jest źródłem informacji na temat najczęściej stosowanych w mutagenezie jęczmienia fizycznych i chemicznych czynników mutagenicznych wraz z określeniem zakresu dawek i efektu działania mutagenów na sekwencję DNA. Osobny podrozdział dotyczy klasyfikacji mutantów wyprowadzonych w efekcie eksperymentów mutagenicznych oraz znaczenia tych mutantów dla hodowli jęczmienia. Kolejne podrozdziały dotyczą połączenia metod klasycznej genetyki oraz nowych metod sekwencjonowania do identyfikacji nowych mutantów jęczmienia. Ostatnie podrozdziały dotyczą metody TILLING, mutagenezy insercyjnej oraz potencjalnego zastosowania u jęczmienia nowych, specyficznych względem sekwencji technik edycji DNA (**Salvi i in., 2014**).

Ostatnia z tej serii publikacji, rozdział „*Creation of a TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU*” w monografii wydanej przez Springer Open, ma charakter obszernego protokołu opisującego metodykę tworzenia populacji TILLING jęczmienia, opracowaną w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ. Kolejne części tego rozdziału dotyczą metod przygotowania materiału roślinnego do traktowania mutagenicznego, procedury traktowania oraz określania krytycznej dawki mutagenów (optymalizacja dawki), a następnie przedstawione są szczegółowo etapy wyprowadzania pokoleń roślin  $M_2$  oraz  $M_3$ , przeprowadzania podstawowych analiz fenotypowych oraz tworzenia banku nasion. Ostatni podrozdział dotyczy tworzenia narzędzi informatycznych i baz danych umożliwiających przechowywanie i skuteczne analizowanie danych uzyskanych z eksperymentów TILLING oraz analiz fenotypowych (**Szarejko i in., 2017**).

**Wykaz publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego (chronologicznie):**

1. **Gruszka D.**, Zbieszczak J., Kwasniewski M., Szarejko I., Maluszynski M. 2006. A new allele in a *uzu* gene encoding brassinosteroid receptor. *Barley Genetics Newsletter*, 36: 1-2.
2. **Gruszka D.**, Szarejko I., Maluszynski M. 2011a. New allele of *HvBR11* gene encoding brassinosteroid receptor in barley. *Journal of Applied Genetics*, 52: 257–268. (IF<sub>2011</sub>: 1,664; punkty MNiSW: 20)
3. **Gruszka D.**, Szarejko I., Maluszynski M. 2011b. Identification of barley *DWARF* gene involved in brassinosteroid synthesis. *Plant Growth Regulation*, 65: 343–358. (IF<sub>2011</sub>: 1,604; punkty MNiSW: 30)
4. Kurowska M., Daszkowska-Golec A., **Gruszka D.**, Marzec M., Szurman M., Szarejko I., Maluszynski M. 2011. TILLING - a shortcut in functional genomics. *Journal of Applied Genetics*, 52: 371-390. (IF<sub>2011</sub>: 1,664; punkty MNiSW: 20)
5. **Gruszka D.**, Marzec M., Szarejko I. 2012a. The barley EST DNA Replication and Repair Database (bEST-DRRD) as a tool for the identification of the genes involved in DNA replication and repair. *BMC Plant Biology*, 12: 88. (IF<sub>2012</sub>: 4,354; punkty MNiSW: 40)
6. Faure S., Turner A.S., **Gruszka D.**, Christodoulou V., Davis S.J., von Korff M., Laurie D.A. 2012. Mutation at the circadian clock gene *EARLY MATURITY 8* adapts domesticated barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109: 8328–8333. (IF<sub>2012</sub>: 9,737; punkty MNiSW: 45)
7. Marzec M., Muszynska A., **Gruszka D.** 2013. The role of strigolactones in nutrient-stress responses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 9286-9304. (IF<sub>2013</sub>: 2,339; punkty MNiSW: 30)
8. Stolarek M., **Gruszka D.**, Braszewska-Zalewska A., Maluszynski M. 2015a. Alleles of newly identified barley gene *HvPARP3* exhibit changes in efficiency of DNA repair. *DNA Repair*, 28: 116–130. (IF<sub>2015</sub>: 3,929; punkty MNiSW: 35)



9. Stolarek M., **Gruszka D.**, Braszewska-Zalewska A., Maluszynski M. 2015b. Functional analysis of the new barley gene *HvKu80* indicates that it plays a key role in double-strand DNA break repair and telomere length regulation. *Mutagenesis*, 30: 785-797. (IF<sub>2015</sub>: 2,297; punkty MNiSW: 30)
10. Manova V., **Gruszka D.** 2015. DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science*, 6: 885. (IF<sub>2015</sub>: 4,495; punkty MNiSW: 40)
11. Marzec M., **Gruszka D.**, Tylec P., Szarejko I. 2016. Identification and functional analysis of the *HvD14* gene involved in strigolactone signaling in *Hordeum vulgare*. *Physiologia Plantarum*, 158: 341-355. (IF<sub>2016</sub>: 3,33; punkty MNiSW: 40)

Sumaryczny IF publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **35,413**

Łączna liczba punktów MNiSW dla tych publikacji: **330**

#### **Rozdziały w monografiach (chronologicznie):**

1. **Gruszka D.**, Szarejko I., Maluszynski M. 2012b. Sodium Azide as a Mutagen [in] *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Shu Q., Forster B.P., Nakagawa H. (Eds.) CAB International, pp. 159-166. (punkty MNiSW: 5)
2. Salvi S., Druka A., Milner S.G., **Gruszka D.** 2014. Induced Genetic Variation, TILLING and NGS-based Cloning [in] *Biotechnological Approaches to Barley Improvement*. Kumlehn J., Stein N. (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 69*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 287-310. (punkty MNiSW: 5)
3. Szarejko I., Szurman-Zubrzycka M., Nawrot M., Marzec M., **Gruszka D.**, Kurowska M., Chmielewska B., Zbieszczyk J., Jelonek J., Maluszynski M. 2017. Creation of a TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU [in] *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*. Jankowicz-Cieslak J., Tai T.H., Kumlehn J., Till B.J. (Eds.) Springer Open, pp. 91-111. (punkty MNiSW: 5)

Łączna liczba punktów MNiSW za rozdziały w monografiach: **15**

#### **6. Kierownictwo międzynarodowych i krajowych projektów badawczych**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, począwszy od roku 2009, pełniłem rolę kierownika czterech projektów badawczych (jednego projektu międzynarodowego oraz trzech projektów krajowych), które przedstawiono poniżej:

- ‘*Mutational analysis of genes involved in DNA repair in barley*’ (projekt międzynarodowy); instytucja finansująca - International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu; budżet projektu: 45 000 Euro

- **‘Analiza mutacyjna genów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA u jęczmienia’** (projekt krajowy); instytucja finansująca - Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego; budżet projektu: 422 500 zł
- **‘Identyfikacja i charakterystyka genów jęczmienia (*Hordeum vulgare*) zaangażowanych w procesy syntezy i transdukcji sygnału brasinosteroidów, jako hormonów regulujących wzrost i rozwój roślin’** (projekt krajowy); instytucja finansująca – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego; budżet projektu: 265 460 zł
- **‘Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody’** (projekt krajowy); instytucja finansująca – Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi; budżet projektu: 468 000 zł.

Pierwszym z kierowanych przeze mnie projektów był międzynarodowy projekt badawczy **‘Mutational analysis of genes involved in DNA repair in barley’**, będący częścią programu **‘Isolation and characterization of genes involved in mutagenesis in crop plants’** realizowanego w latach 2009-2014, koordynowanego i finansowanego przez International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu (numer projektu: IAEA Research Contract no. 15657). Program IAEA koordynował projekty badawcze realizowane przez dziewięć instytucji naukowych, reprezentujących kraje Europy, Azji i Ameryki Południowej, a realizacja programu przebiegała z udziałem ekspertów reprezentujących wiodące ośrodki naukowe na świecie (USA i Szwajcaria). Realizacja tego projektu badawczego wymagała przedkładania corocznych raportów oraz wniosków o odnowienie kontraktu z IAEA. Co dwa lata IAEA organizowała spotkania (*Research Coordination Meetings*) mające na celu wymianę doświadczeń i uzyskanych wyników (połączoną z ich prezentacją w formie wystąpień) oraz koordynowanie dalszej realizacji programu.

Równoległe z pełnieniem funkcji kierownika przedstawionego powyżej projektu międzynarodowego pełniłem rolę kierownika krajowego projektu **‘Analiza mutacyjna genów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA u jęczmienia’**, realizowanego w latach 2009-2014. Projekt ten uzyskał czterokrotne finansowanie ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (decyzje nr: 687/W-IAEA/2010/0, 773/W-IAEA/2010/0, 2214/FAO/IAEA/2011/0 oraz 2725/FAO/IAEA/2013/0). To zadanie badawcze było realizowane w ramach programu wsparcia przez MNiSW projektów, które uzyskały finansowanie ze środków organizacji międzynarodowych. Realizacja tego projektu badawczego wymagała przedkładania corocznych raportów oraz wniosków o finansowanie w kolejnym roku. Należy dodać, że realizacja powyższych projektów badawczych przyczyniła się do uzyskania stopnia naukowego doktora przez mgr Magdalenę Stolarek, która jako doktorantka Katedry Genetyki WBiOŚ UŚ brała udział w realizacji tych projektów.

Od roku 2012, równoległe z pracami prowadzonymi w ramach przedstawionych powyżej projektów dotyczących identyfikacji genów jęczmienia zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA, byłem kierownikiem projektu **‘Identyfikacja i charakterystyka genów jęczmienia (*Hordeum vulgare*) zaangażowanych w procesy syntezy i transdukcji sygnału**

**brasinosteroidów, jako hormonów regulujących wzrost i rozwój roślin**’ finansowanego przez MNiSW. Projekt ten był realizowany w latach 2012-2014 w ramach prestiżowego programu ‘*Iuventus Plus*’ (numer projektu: IP2011-016471). Rozpoczęcie tego projektu badawczego było efektem nawiązania współpracy naukowej z dr. Christophem Dockterem i Prof. Matsem Hanssonem z Carlsberg Laboratory w Kopenhadze. Współpraca ta ma na celu wielokierunkową charakterystykę półkarłowych mutantów jęczmienia cechujących się zaburzeniami w metabolizmie BR i jest kontynuowana obecnie.

Rezultaty uzyskane w efekcie przedstawionego powyżej projektu realizowanego w ramach programu ‘*Iuventus Plus*’ były podstawą rozpoczęcia kolejnego projektu badawczego ‘**Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody**’, którego jestem kierownikiem. Realizacja tego pięcioletniego projektu rozpoczęła się w roku 2014 i jest finansowana ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej (decyzja: HOR hn – 801/11/14). Realizacja tego projektu prowadzona jest we współpracy z Instytutem Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie oraz Palacký University w Ołomuńcu (Czechy).

Dodatkowo, oprócz pełnienia funkcji kierownika przedstawionych powyżej projektów, w przeszłości uczestniczyłem w realizacji dwóch projektów badawczych, wykonywanych w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ. Pierwszym z projektów, w realizacji którego brałem udział, był projekt zamawiany ‘**Stworzenie platformy TILLING *Hordeum vulgare* jako trwałego narzędzia genomiki funkcjonalnej i doskonalenia cech użytkowych**’ (numer projektu: PBZ-MNiSW-2/3/2006/8). Projekt ten był realizowany w latach 2007-2010 i finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Mój udział w projekcie polegał na identyfikacji genów jęczmienia zaangażowanych w procesy biosyntezy i percepcji BR, które następnie analizowano funkcjonalnie z użyciem metody TILLING. Zidentyfikowane mutanty podlegały następnie analizom genetycznym i fizjologicznym.

Drugim z projektów, w realizacji którego uczestniczyłem, był projekt VENTURES ‘**Poszukiwanie i identyfikacja mutantów strigolaktonowych w celu uzyskania materiałów wyjściowych do hodowli jęczmienia *Hordeum vulgare* w Polsce**’ (numer projektu: VENTURES/2011-7/7). Projekt był realizowany w latach 2011-2013 i finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej. Mój udział w tym projekcie dotyczył przeprowadzenia analiz fizjologicznych w celu charakterystyki zidentyfikowanych mutantów strigolaktonowych oraz wykonania analiz modelowania homologicznego z użyciem programu UCSF Chimera, których celem była wizualizacja struktury przestrzennej form polipeptydu HvD14, kodowanych przez prawidłową i zmutowaną wersję genu.

Obecnie biorę udział w realizacji projektu badawczego OPUS ‘**Mutantów jęczmienia z zaburzeniami syntezy i percepcji brasinosteroidów w badaniach stresu temperaturowego**’ (numer projektu: 2015/17/B/NZ9/01695), który jest wykonywany w Instytucie Fizjologii Roślin PAN w Krakowie. Realizację tego dwuletniego projektu rozpoczęto w roku 2016. Projekt finansowany jest przez Narodowe Centrum Nauki. Mój udział w tym projekcie polega na przeprowadzeniu genetycznej, fizjologicznej i molekularnej charakterystyki półkarłowych mutantów BR jęczmienia, które stanowią materiał badań, jak również na interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do genetycznego podłoża fenotypu tych mutantów.

## 7. Współpraca międzynarodowa i krajowa

W trakcie studiów doktoranckich oraz w latach kolejnych odbyłem następujące staże i wizyty naukowe:

- 4th FAO/IAEA Interregional Training Course ‘*Mutant Germplasm Characterisation Using Molecular Markers*’; 27 Sep – 22 Oct 2004, Seibersdorf, Austria
- trzymiesięczny staż naukowy w ramach programu Unii Europejskiej *Lifelong Learning Programme ‘Erasmus’*; 1 lipca – 30 września 2008, John Innes Centre, Norwich, Wielka Brytania
- wizyta naukowa w grupie Prof. Matsa Hanssona w Carlsberg Laboratory; 18 stycznia – 2 lutego 2011, Kopenhaga, Dania
- wizyta naukowa w grupie Prof. Matsa Hanssona w Carlsberg Laboratory; 5-19 września 2012, Kopenhaga, Dania
- wizyta naukowa w grupie Prof. Matsa Hanssona w Lund University; 3-17 marca 2015, Lund, Szwecja.

W ostatnich latach nawiązałem współpracę z naukowcami reprezentującymi kilka europejskich instytucji naukowo-badawczych. Współpracę z dr. Christophem Dockterem i prof. Matsem Hanssonem zatrudnionymi wówczas w Carlsberg Laboratory w Kopenhadze (Dania) rozpocząłem w roku 2011 i jest ona obecnie kontynuowana. Współpraca dotyczy identyfikacji i analizy funkcjonalnej genów jęczmienia kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie i sygnalizacji BR oraz wielokierunkowej analizy fenotypowej zidentyfikowanych mutantów. W ramach tej współpracy w latach 2011 i 2012 odbyłem dwie dwutygodniowe wizyty naukowe w Carlsberg Laboratory w Kopenhadze, a w roku 2015 dwutygodniową wizytę naukową w Department of Biology Lund University w Lund (Szwecja), gdzie obecnie pracuje prof. Hansson. Celem tych wizyt naukowych było prowadzenie badań objętych tematem współpracy. W ramach nawiązanej współpracy odbyły się również wizyty naukowe dr. Docktera i prof. Hanssona w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ.

W roku 2013 nawiązałem współpracę z dr hab. Anną Janeczko z Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie. Od tamtej pory ta współpraca rozwija się bardzo pomyślnie i zaowocowała kilkoma publikacjami naukowymi oraz wzajemnym udziałem w kierowanych przez nas projektach badawczych. Analizy prowadzone w IFR PAN oraz stosowana w tych badaniach metodyka poszerzyły zakres charakterystyki fenotypowej mutantów BR jęczmienia w warunkach kontrolnych oraz w reakcji na stres niedoboru wody, co umożliwiło określenie roli endogennych BR w regulacji różnych procesów fizjologicznych, jak również ich wpływu na homeostazę innych fitohormonów.

W roku 2013 nawiązałem współpracę z dr Janą Oklestkovą z Palacky University w Ołomuńcu (Czechy). Na bazie tej współpracy możliwe jest określanie profilu akumulacji różnych form endogennych BR u zidentyfikowanych mutantów jęczmienia, co stanowi

bardzo istotne uzupełnienie i potwierdzenie wyników uzyskiwanych w analizach genetycznych, molekularnych i fizjologicznych. Współpraca jest obecnie kontynuowana, a uzyskiwane wyniki stanowią część realizowanych wspólnych projektów badawczych.

W roku 2014 wraz z dr. Dockterem i prof. Hanssonem nawiązałem współpracę z prof. Thomasem Altmannem z Department of Molecular Genetics Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Gatersleben (Niemcy). Ta jednostka dysponuje platformą firmy LemnaTec® do zautomatyzowanego fenotypowania roślin, którą wykorzystano w analizach fenotypowych ponad 600 mutantów jęczmienia. Eksperyment doprowadził do wyselekcjonowania ponad 30 form o półkarłowym fenotypie, erektoidalnym pokroju oraz innych cechach charakterystycznych dla mutantów BR jęczmienia. W późniejszych badaniach ta grupa mutantów została poddana analizom fizjologicznym (test etiolacji oraz test rozwijania blaszek liściowych) oraz analizom genetycznym, których celem było określenie związków alleliczności pomiędzy wyselekcjonowanymi mutantami. Tak więc przeprowadzone badania przyczyniły się do znacznego wzbogacenia kolekcji badanych mutantów.

W trakcie realizacji wspomnianego projektu dotyczącego naprawy uszkodzeń DNA nawiązałem współpracę z dr Vasilissą Manową z Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences w Sofii (Bułgaria). Jednym z głównych tematów badań prowadzonych w tym instytucie jest mutagenеза oraz mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA m. in. u jęczmienia. Zbieżność tematyki prowadzonych projektów pozwoliła na wymianę doświadczeń i nabycie nowych umiejętności podczas wzajemnych wizyt naukowych, które w roku 2011 odbyła doktorantka Magdalena Stolarek uczestnicząca w kierowanym przeze mnie projekcie. Uzyskane w ten sposób umiejętności i opanowane techniki analityczne znacznie wzbogaciły zakres metod wykorzystanych w realizacji jej pracy doktorskiej. Doktorantka z grupy dr Manovej odbyła trzymiesięczny staż naukowy w Katedrze Genetyki WBiOŚ UŚ, w trakcie którego zapoznała się z praktycznym wykorzystaniem metody TILLING.

## **8. Obecnie realizowane badania i dalsze plany naukowe**

Prowadzone przeze mnie obecnie badania zmierzają do dalszego wyjaśniania procesów biosyntezy i sygnalizacji BR u jęczmienia z wykorzystaniem mutantów półkarłowych. Badania prowadzone są w opisaney powyżej współpracy z dr. Dockterem i prof. Hanssonem. Celem badań jest identyfikacja kolejnych genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm BR oraz analiza genetyczna i fizjologiczna mutantów. W procesie identyfikacji genów wykorzystywane są nowe narzędzia bioinformatyczne GenomeZipper® oraz Strudel® pozwalające na przewidywanie lokalizacji genów jęczmienia w oparciu o informacje pochodzące z genomów innych gatunków jednoliściennych. Analiza obejmuje również grupę mutantów BR wyselekcjonowanych podczas opisanego powyżej eksperymentu prowadzonego z zastosowaniem platformy LemnaTec® do zautomatyzowanego fenotypowania roślin. Powiększenie kolekcji półkarłowych mutantów BR o nowe formy wyselekcjonowane po tym eksperymencie, które w ostatnim czasie scharakteryzowano pod kątem fizjologicznym, w połączeniu z uzyskiwanymi w ostatnim czasie informacjami na temat alleliczności mutantów pozwoli na potwierdzenie funkcji identyfikowanych genów.

Kolekcja scharakteryzowanych fizjologicznie mutantów, wśród których wykazano związki alleliczności stanowi cenny materiał badań. W związku z tym analiza tej kolekcji półkarłowych mutantów BR zmierzająca do identyfikacji mutacji odpowiedzialnych za ich fenotyp będzie również prowadzona z użyciem techniki 'exom capture'. Analizy te planowane są we współpracy z dr. Nilsem Steinem (IPK, Gatersleben, Niemcy). Weryfikacja wyników uzyskanych na drodze analiz genetycznych i fizjologicznych będzie następować poprzez określanie profilu akumulacji endogennych BR u tych mutantów (współpraca z dr. Oklestkovą). W celu przeprowadzenia globalnej analizy ekspresji genów u badanych mutantów wykonane zostaną eksperymenty RNA-seq. Planuję również rozbudowanie metodyki wykorzystywanej w analizie funkcjonalnej badanych genów, która będzie prowadzona (oprócz metody TILLING) również z zastosowaniem nowej techniki CRISPR-Cas.

Z uwagi na znaczenie półkarłowych form zbóż dla rolnictwa oraz w obliczu nadchodzących zmian klimatycznych bardzo istotnym aspektem prowadzonych przeze mnie obecnie badań jest wielowymiarowa analiza reakcji półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stropy abiotyczne. Jak wykazały moje dotychczasowe badania, półkarłowe mutanty BR jęczmienia reprezentujące różne tła genetyczne wykazują zwiększoną względem odmian rodzicielskich tolerancję na stres niedoboru wody. W niedalekiej przyszłości przeprowadzone zostaną analizy mające na celu określenie wysokości plonowania mutantów BR jęczmienia poddanych działaniu suszy glebowej w fazie kłoszenia, a także badania jakościowe (składu chemicznego) plonu mutantów BR uzyskanego w warunkach kontrolnych oraz po działaniu stresu suszy. W ramach współpracy z IFR PAN w Krakowie dokonana zostanie również wielowymiarowa analiza reakcji półkarłowych mutantów BR jęczmienia na działanie stresu obniżonej temperatury, co pozwoli na określenie roli endogennych BR w regulacji różnych aspektów fizjologii (akumulacja transkryptów genów kodujących akwaporyny, ATP-azy i białka szoku cieplnego) oraz biologii komórki (stabilność membran komórkowych). Oczywiście, podstawowym, ale bardzo ciekawym pytaniem, na które mają odpowiedzieć te analizy, jest to czy półkarłowe mutanty BR jęczmienia wykazują większą tolerancję na stres obniżonej temperatury względem odmian rodzicielskich.

Reakcja roślin na stres abiotyczny jest wielowarstwowym systemem regulacji, gdzie często w interakcje wchodzi szlaki odpowiedzi na różne fitohormony, tworząc skomplikowaną sieć zależności. W celu pełniejszego zrozumienia procesów, które są podstawą reakcji roślin jęczmienia na stres suszy, oprócz półkarłowych mutantów BR planuję wykorzystanie unikalnej kolekcji mutantów reprezentujących zaburzenia metabolizmu kwasu abscysynowego i strigolaktonów. Te mutanty zostały zidentyfikowane w ostatnich latach przez dr. Agatę Daszkowską-Golec i dr. Marka Marca z Katedry Genetyki WBiOŚ UŚ z użyciem strategii TILLING w populacji *HorTILLUS*. Mutanty reprezentujące zaburzenia metabolizmu tych trzech fitohormonów poddane zostaną wielokierunkowym analizom fizjologicznym (m.in. RWC, wydajność fotosyntezy, akumulacja osmotitów i antyoksydantów), mającym na celu określenie reakcji tych genotypów na stres niedoboru wody. Przeprowadzone zostanie również wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu badanych form rosnących w warunkach deficytu wody i optymalnego nawodnienia. Oprócz informacji na temat regulomów, w które zaangażowane są geny

reprezentowane przez badane mutanty, analiza porównawcza umożliwi wskazanie potencjalnych punktów interakcji łączących sygnałosomy ABA, BR i SL u jęczmienia. Badania zostaną wzbogacone o analizy profilu akumulacji wszystkich grup hormonów u badanych genotypów rosnących zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po działaniu stresu. Prowadzenie badań we współpracy i z wykorzystaniem różnych grup mutantów pozwoli na poznanie zależności na poziomie genetycznym i fizjologicznym między tymi fitohormonami regulującymi reakcję roślin jęczmienia na stres suszy, a w przyszłości może umożliwić sterowanie reakcją roślin jęczmienia na stres niedoboru wody. Uzyskano już wyniki pierwszych prowadzonych w ramach tej współpracy eksperymentów.

**PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO:**

Okres	Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Wskaźnik IF*	Punkty MNiSW	Liczba cytowań (Web of Science <sup>2</sup> )	Liczba cytowań (Google Scholar <sup>2</sup> )
Przed doktoratem	Spoza listy JCR <sup>1</sup>	1	0	0	0	2
Po uzyskaniu stopnia doktora	<b>Główne osiągnięcie naukowe (JCR<sup>1</sup>)</b>	<b>6</b>	<b>22,945</b>	<b>220</b>	<b>63</b>	<b>103</b>
	Pozostałe z listy JCR <sup>1</sup>	10	35,413	330	200	302
	Rozdziały w monografiach	3	0	15	5	12
<b>Sumarycznie:</b>		<b>20</b>	<b>58,358</b>	<b>565</b>	<b>268 (244)<sup>3</sup></b>	<b>419</b>

<sup>1</sup> Journal Citation Reports, Thomson Reuters

<sup>2</sup> Dane z baz cytowań z 26 listopada 2017; <sup>3</sup>(bez autocytaowań)

\* **Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* publikacji naukowych według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania)**

**Indeks Hirscha** (dla wszystkich publikacji): **8** (Web of Science<sup>2</sup>); **9** (Google Scholar<sup>2</sup>)

Katowice, dn. 28.11.2017

  
dr Damian Gruszka