Załącznik nr 3

AUTOREFERAT

WIELOASPEKTOWA CHARAKTERYSTYKA ZMIAN ZACHODZĄCYCH W ROŚLINACH JĘCZMIENIA JAREGO (*HORDEUM VULGARE* L.) POD WPŁYWEM STRESÓW ABIOTYCZNYCH

dr inż. Krzysztof Mikołajczak

Zakład Fenomiki Zbóż
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

POZNAŃ, 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko 3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej 3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych 3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) 3
   4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego 4
   4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego 4
   4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac oraz osiągniętych wyników 8
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej 34
   5.1. Aktywność naukowa w instytucji zagranicznej 34
   5.2. Aktywność naukowa w innej instytucji krajowej 37
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę 38
   6.1. Działalność dydaktyczna 38
   6.2. Działalność organizacyjna 39
   6.3. Działalność popularyzująca naukę 39
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej 40
   7.1. Osiągnięcia naukowe niewymienione w pkt. 4 40
   7.2. Udział w warsztatach/szkoleniach naukowych 43
   7.3. Otrzymane nagrody i wyróżnienia 44

1. Imię i nazwisko

Krzysztof Mikołajczak
https://orcid.org/0000-0003-3821-4461

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

- **Doktor nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia**
  Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, 30 września 2015 r.
  Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mapowanie loci cech ilościowych związanych z plonowaniem w warunkach niedoboru wody linii rekombinacyjnych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) segregujących w locus *denso*"
  Promotor: prof. dr hab. Maria Surma
  Promotor pomocniczy: dr hab. Anetta Kuczyńska, prof. IGR PAN
- **Studia podyplomowe: Menadżer Projektu Badawczo – Rozwojowego**
  Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu, czerwiec 2011
- **Magister inżynier biotechnologii**, specjalizacja biotechnologia przemysłowa
  Wydział Rolniczy, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 10 czerwca 2009 r.
  Tytuł pracy magisterskiej: „Optymalizacja produkcji biodiesla metodą transestryfikacji enzymatycznej odpadowych tłuszczów wołowych"
  pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Lewandowicz

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2016 – obecnie	**adiunkt**, Zakład Fenomiki Zbóż (poprzednia nazwa: Zakład Biotechnologii, Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż), Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
2015 – 2016	**specjalista biotechnolog**, Zakład Biotechnologii, Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż), Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
2010 – 2015	**asystent**, Zakład Biotechnologii, Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż (poprzednia nazwa: Zakład Genetyki Ilościowej), Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl siedmiu publikacji (P1-P7) powiązanych tematem:

„Wieloaspektowa charakterystyka zmian zachodzących w roślinach jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) pod wpływem stresów abiotycznych"

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (wg kolejności omawiania)

- **P1**
  Mikołajczak K., Ogrodowicz P., Gudyś K., Krystkowiak K., Sawikowska A., Frohmberg W., Górny A., Kędziora A., Jankowiak J., Józefczyk D., Karg G., Andrusiak J., Krajewski P., Szarejko I., Surma M., Adamski T., Guzy-Wróbelska J., Kuczyńska A. (2016) Quantitative Trait Loci for Yield and Yield-Related Traits in Spring Barley Populations Derived from Crosses between European and Syrian Cultivars. *PLoS ONE* 11(5): e0155938. DOI:10.1371/ journal.pone.0155938

IF_{2016}: 2,806	$MEiN_{2016}$: 35	Liczba cytowań: 41

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań oraz planowanie prac eksperymentalnych, (2) wykonanie prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia w warunkach naturalnych (polowych) w latach 2011-2013, (3) monitorowanie faz fenologicznych w okresie wegetacji roślin populacji MCam i jej form rodzicielskich oraz szczegółową ocenę fenotypową tego materiału roślinnego, (4) ekstrakcję DNA jednej populacji mapującej oraz ocenę jakości i stężenia uzyskanych izolatów, (5) przeszukiwanie publicznych baz danych i wybór 245 markerów mikrosatelitarnych (SSR) do genotypowania i genotypowanie jednej populacji mapującej, (6) przygotowanie wszystkich prób do genotypowania SNP, (7) ocenę polimorfizmu genetycznego jednej z populacji mapującej pod względem użytych markerów, a następnie konstrukcję mapy genetycznej tej populacji mapującej wraz z oceną prawidłowej segregacji markerów w obrębie mapy, (8) współtworzenie zintegrowanej mapy genetycznej dla trzech populacji mapujących RIL, (9) interpretację uzyskanych wyników wraz z analizą adnotacji funkcjonalnej dla wykrytych regionów QTL, (10) przegląd literatury związany z tematyką badawczą, (11) współtworzenie pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu POLPAGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania zbóż o zwiększonej odporności na suszę" (Program Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, WND-POIG.01.03.01-00-101/08), w którym byłem wykonawcą.

- **P2**
  Mikołajczak K., Kuczyńska A., Krajewski P., Sawikowska A., Surma M., Ogrodowicz P., Adamski T., Krystkowiak K., Górny A.G., Kempa M., Szarejko I., Guzy-Wróbelska J., Gudyś K. (2017) Quantitative trait loci for plant height in Maresi × CamB barley

population and their associations with yield-related traits under different water regimes. *Journal of Applied Genetics* 58(1): 23-35. DOI 10.1007/s13353-016-0358-1

IF_{2017}: 1,756	$MEiN_{2017}$: 20	Liczba cytowań: 31

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań oraz planowanie prac eksperymentalnych, (2) wykonanie prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia doniczkowego (w latach 2011-2013) w warunkach szklarniowych, w tym przygotowanie podłoża i materiału do wysiewu, wysiew nasion, (3) opracowanie metodyki aplikacji stresu deficytu wody w doświadczeniu doniczkowym oraz aplikację okresowego deficytu wody w różnych stadiach rozwoju roślin, (4) codzienną kontrolę wilgotności podłoża w doniczkach doświadczalnych metodą grawitacyjną (wagowo) oraz objętościową (reflektometrycznie), (5) monitorowanie faz fenologicznych w okresie wegetacji roślin oraz szczegółową ocenę fenotypową materiału roślinnego z podziałem na cechy pędów/kłosów głównego i bocznych rośliny oraz tabelaryzowanie wszystkich danych biometrycznych, (6) opracowanie wyników, tabel i rycin w tym schematu mapy genetycznej zawierającej QTL, (7) interpretację uzyskanych wyników wraz z analizą adnotacji funkcjonalnej dla wykrytych QTL, (8) przygotowanie pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu POLPAGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania zbóż o zwiększonej odporności na suszę" (Program Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, WND-POIG.01.03.01-00-101/08), w ramach w zadania nr 2 „Mapy genetyczne i lokalizacja QTL związanych z tolerancją jęczmienia na niedobór wody", w którym byłem wykonawcą.

- **P3**
  Mikołajczak K., Ogrodowicz P., Ćwiek-Kupczyńska H., Weigelt-Fischer K., Mothukuri S.R., Junker A., Altmann T., Krystkowiak K., Adamski T., Surma M., Kuczyńska A., Krajewski P. (2020) Image phenotyping of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) RIL population under drought: selection of traits and biological interpretation. *Frontiers in Plant Science* 11:743. DOI: 10.3389/fpls.2020.00743

IF_{2020}: 4,402	$MEiN_{2020}$: 100	Liczba cytowań: 7

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) przygotowanie materiału siewnego oraz wysiew nasion, (2) wykonanie prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia doniczkowego na platformie do automatycznego fenotypowania roślin, (3) codzienne monitorowanie warunków środowiskowych panujących na platformie oraz kontroli stanu roślin przed ich obrazowaniem i ich prawidłowego umieszczenia w kabinach z kamerami RGB, UV, NIR podczas obrazowania, (4) opracowanie metodyki aplikacji stresu suszy oraz monitorowanie efektów zastosowanego stresu na roślinach jęczmienia celem ewentualnej modyfikacji metodyki, (5) kontrolowanie stanu witalnego roślin, (6) udział w zbiorze wszystkich obiektów roślinnych po osiągnięciu dojrzałości pełnej, (7) udział w wykonaniu pomiarów biometrycznych oraz tabelaryzowanie tych danych, (8) przegląd

literatury związanej z tematyką badawczą, (9) biologiczną interpretację wyników obrazowania cech dynamicznych oraz ich korelacji z cechami po zbiorze, (10) współtworzenie koncepcji ilustracji wyników, (11) współtworzenie pierwszej i końcowej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu pt. "Developmental aspects of barley drought tolerance", Transnational Access module of the European Plant Phenotyping Network (EPPN) FP7 Capacities Programme of EU, Grant Agreement No. 284443, w którym pełniłem rolę wykonawcy.

- **P4**

  Mikołajczak✉ K., Kuczyńska A., Krajewski P., Kempa M., Nuc M. (2023a) Transcriptome profiling disclosed the effect of single and combined drought and heat stress on reprogramming of genes expression in barley flag leaf. *Frontiers in Plant Science* 13:1096685. DOI: 10.3389/fpls.2022.1096685

✉autor korespondencyjny

IF_{2023}: 5,6	$MEiN_{2023}$: 140	Liczba cytowań: 1

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) opracowanie koncepcji badań i metodyki aplikacji stresów abiotycznych, (2) udział w wykonaniu prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia doniczkowego w kontrolowanych warunkach oraz w zbiorze materiału roślinnego do analiz, (3) udział w pomiarach biometrycznych materiału roślinnego, w ekstrakcji genomowego RNA z liści flagowych jęczmienia i w przygotowaniu prób do sekwencjonowania mRNA, (4) pomiary parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach flagowych roślin jęczmienia poddanych stresom abiotycznym oraz rosnących w warunkach kontrolnych, (5) analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz wykonanie analizy nadreprezentacji terminów Gene Ontology (GO), (6) opracowanie wszystkich rycin i tabel, (7) przegląd literatury związanej z tematyką badawczą, (8) opracowanie pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu, (9) udział w zdeponowaniu danych sekwencjonowania RNA wraz z opisem eksperymentu w repozytorium ArrayExpress, (10) przesłanie manuskryptu wraz z załącznikami do czasopisma, korespondencję z redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na uwagi recenzentów, redagowanie manuskryptu po recenzjach, (11) kierowanie projektem obejmującym badania opisane w tej publikacji.

Publikacja powstała w wyniku realizacji kierowanego przeze mnie projektu NCN SONATA 12 (2016/23/D/NZ9/00043) pt. „Zmiany ekspresji genów na poziomie całego genomu liścia flagowego jęczmienia pod wpływem stresów abiotycznych działających symultanicznie".

- **P5**

  Mikołajczak✉ K., Kuczyńska A., Krajewski P., Kempa M., Witaszak N. (2023b) Global proteome profiling revealed the adaptive reprogramming of barley flag leaf to drought and elevated temperature. *Cells* 12(13), 1685; DOI: doi.org/10.3390/cells12131685

✉autor korespondencyjny

IF_{2023}: 6,0	$MEiN_{2023}$: 140	Liczba cytowań: 0

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) opracowanie koncepcji badań i metodyki aplikacji stresów abiotycznych, (2) udział w wykonaniu prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia doniczkowego w kontrolowanych warunkach oraz w zbiorze materiału roślinnego do analiz proteomicznych, (3) udział w homogenizacji materiału roślinnego celem ekstrakcji białek, (4) analizę i interpretację uzyskanych wyników, (5) opracowanie wszystkich rycin i tabel, (6) przegląd literatury związanej z tematyką badawczą, (7) opracowanie pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu, (8) przesłanie manuskryptu wraz z załącznikami do czasopisma, korespondencję z redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na uwagi recenzentów, redagowanie manuskryptu po recenzjach, (9) kierowanie projektem obejmującym badania opisane w tej publikacji.

Publikacja powstała w wyniku realizacji kierowanego przeze mnie projektu NCN SONATA 12 (2016/23/D/NZ9/00043) pt. „Zmiany ekspresji genów na poziomie całego genomu liścia flagowego jęczmienia pod wpływem stresów abiotycznych działających symultanicznie".

- **P6**
  Kuczyńska A., Cardenia V., Ogrodowicz P., Kempa M., Rodriguez-Estrada M.T., **Mikołajczak✉ K**. (2019) Effects of multiple abiotic stresses on lipids and sterols profile in barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 141: 215-224. DOI: doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.033

✉autor korespondencyjny

IF_{2019}: 3,720	$MEiN_{2019}$: 70	Liczba cytowań: 24

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie strategii badawczej i koncepcji prac eksperymentalnych, (2) opracowanie metodyki aplikacji stresów abiotycznych, tj. suszy, zasolenia, wysokiej temperatury oraz ich kombinacji, (3) uczestnictwo w zbiorze i w homogenizacji materiału roślinnego do analiz lipidomicznych, (4) udział w ekstrakcji lipidów oraz steroli z tkanki roślinnej, (5) udział w wykonaniu analiz instrumentalnych z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) oraz szybkiej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (Fast GC/MS) dla 128 ekstraktów, (6) identyfikację głównych klas lipidów w próbkach oraz jakościową i ilościową analizę steroli roślinnych w próbkach, (7) interpretację wyników i opracowanie koncepcji rycin i tabel, (8) przegląd literatury związanej z tematyką badawczą, (9) współtworzenie pierwszej i końcowej wersji manuskryptu, (10) przesłanie manuskryptu wraz z załącznikami do czasopisma, korespondencję z redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na uwagi recenzentów, redagowanie manuskryptu po recenzjach.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu NCN OPUS 9 (2015/17/B/NZ9/01481) pt. „Wpływ stresów abiotycznych na poziom ekspresji genu *LTP2* w odniesieniu do lipidomu i fenomu u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)", w którym byłem wykonawcą.

- **P7**
  Mikołajczak K., Kuczyńska A., Ogrodowicz P., Kiełbowicz-Matuk A., Ćwiek-Kupczyńska H., Daszkowska-Golec A., Szarejko I., Surma M., Krajewski P. (2022) High-throughput sequencing data revealed genotype-specific changes evoked by heat stress in crown tissue of barley *sdw1* near-isogenic lines. *BMC Genomics* 23:177. DOI: 10.1186/s12864-022-08410-1

IF_{2022}: 4,400	$MEiN_{2022}$: 140	Liczba cytowań: 5

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań, (2) udział w wykonaniu prac eksperymentalnych związanych z prowadzeniem doświadczenia doniczkowego w kontrolowanych warunkach oraz w zbiorze materiału roślinnego do analiz, (3) monitorowanie wilgotności podłoża w doniczkach, (4) aplikowanie stresu wysokiej temperatury, (5) udział w pomiarach parametrów fluorescencji chlorofilu i zawartości pigmentów w liściach roślin jęczmienia poddanych stresowi oraz rosnących w warunkach kontrolnych, (6) monitorowanie faz fenologicznych w okresie wegetacji roślin oraz zbiór roślin po osiągnięciu dojrzałości pełnej, (7) szczegółową ocenę fenotypową materiału roślinnego z podziałem na cechy pędów/kłosów głównego i bocznych rośliny oraz tabelaryzowanie wszystkich danych biometrycznych, (8) udział w opracowaniu wyników i w ich interpretacji, (9) współtworzenie pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu, w tym opracowanie wstępu i dyskusji, (10) przesłanie manuskryptu wraz z załącznikami do czasopisma.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu NCN HARMONIA 8 (2016/22/M/NZ9/00251) pt. „Regulacja ekspresji genu półkarłowatości *sdw1/denso* u jęczmienia (*Horedeum vulgare* L.) i jej związek z architekturą i fizjologią roślin", w którym byłem wykonawcą.

Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (zgodnie z rokiem opublikowania)	28,684
Sumaryczna liczba punktów MEiN[1] publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	55 (P1, P2) 590 (P3-P7)
Łączna liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus (stan na dzień 16.08.2023)	109

[1] Punktację dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych obowiązującym w roku opublikowania; prace P3-P7 objęła zmieniona punktacja zgodnie z reformą nauki i szkolnictwa wyższego wprowadzona w 2018 roku; MEiN – poprzednio MNiSW.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac oraz osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Badania nad jęczmieniem (*Hordeum vulgare* L.), który stał się obiektem mojego zainteresowania, zyskują na znaczeniu, gdyż coraz częściej uznawany jest on za roślinę modelową dla zbóż. Jęczmień zwyczajny jest rośliną samopylną, diploidalną o siedmiu parach chromosomów i o wielkości genomu ok. 5,3 Gpz (1n). Pożądanym atrybutem rośliny

modelowej jest zsekwencjonowanie jej genomu, co w przypadku jęczmienia nastąpiło w 2012 roku (IBGSC 2012). W kolejnych latach udostępniono zaktualizowane wersje genomu referencyjnego jęczmienia (Mascher i in. 2017; Monat i in. 2019), a niedawno opublikowano najnowszą jego wersję opracowaną na podstawie sekwencjonowania PacBio, tzw. trzeciej generacji (Mascher i in. 2021). Ponadto Jayakodi i in. (2020) opublikowali pierwszą koncepcję pangenomu jęczmienia.

Rośliny uprawne narażone są na wiele czynników stresowych, wśród których niedobór wody jest jedną z głównych przyczyn obniżających produktywność. Międzyrządowy Zespół do spraw Zmian Klimatu (IPCC) działający przy Organizacji Narodów Zjednoczonych wskazał w swoim raporcie, że w wyniku zmiany klimatu susza obejmuje coraz większe tereny, pojawia się coraz częściej i z większym nasileniem, a zjawiska te będą postępować w kolejnych latach (IPCC 2021). Wyróżnia się trzy strategie umożliwiające roślinom przetrwanie w środowisku o ograniczonym dostępie wody: strategia ucieczki (*ang*. escape) przed okresem suszy, unikanie odwodnienia oraz tolerancja na stres. Ucieczka polega na dostosowaniu przez roślinę cyklu życiowego poprzez maksymalne jego skrócenie tak, aby okres suszy nie obejmował wzrostu generatywnego (Blum 2005). Ewolucyjnie wykształcona zdolność do przeżywania w niekorzystnych warunkach dotyczy przede wszystkim roślin występujących na terenach o regularnym ograniczeniu dostępności wody, najczęściej jednak skutkuje znacznie obniżoną wydajnością plonowania ze względu na przyspieszenie etapu napełniania i dojrzewania ziarna (Desclaux i Roumet 1996). Przykładem mogą być syryjskie odmiany jęczmienia, które poprzez wczesność przyspieszają terminy kwitnienia i kłoszenia unikając negatywnych skutków suszy pojawiającej się w późniejszym okresie (Górny 2001). Unikanie odwodnienia związane jest z intensyfikacją pobierania dostępnej wody, optymalnym wykorzystaniem i ograniczeniem jej utraty. Z kolei tolerancja na stres niedoboru wody wiąże się z przystosowaniem osmotycznym, akumulacją substancji ochronnych oraz zwiększeniem zdolności naprawczej w komórce.

Reakcja roślin na stresy abiotyczne jest złożonym procesem i zachodzi zarówno na poziomie całego organizmu, jak i na poziomie konkretnego organu (Temel i in. 2017). Mechanizmy odpowiedzialne za przystosowanie rośliny do warunków stresowych i za ograniczenie ich negatywnych skutków na poziomie fenotypu związane są z ekspresją wielu genów zaangażowanych w zmiany procesów komórkowych, biochemicznych i fizjologicznych (Tuberosa i Salvi 2006; Cattivelli i in. 2008). Rozpoznanie tych genów było przedmiotem wielu badań w ostatniej dekadzie, również u jęczmienia. Ponadto prowadzono badania nad regulacją gospodarki osmotycznej, percepcją i transdukcją sygnału stresu czy skutkami stresu na metabolizm i fenotyp (Harb i in. 2020; Henry 2020; Yang i in. 2021). Podejmowane są próby rozwikłania skomplikowanych sieci regulatorowych obejmujących działanie oraz współdziałanie poszczególnych fitohormonów w odpowiedzi na czynnik stresu (Verma i in. 2016; Gruszka i in. 2021; Ost i in. 2023). Szczególną uwagę zwraca się na grupę białek ochronnych, zwłaszcza białek LEA (*ang*. Late Embryogenesis Abundant) chroniących strukturę innych białek oraz błon komórkowych (należą tu dehydryny), a także białek szoku cieplnego (ang. Heat Shock Protein, HSP) (Reddy i in. 2014; Yu i in. 2018). Ponadto konstrukcja map genetycznych o coraz wyższym stopniu zagęszczenia umożliwia z dużo większą precyzją identyfikację loci determinujących ważne cechy użytkowe. Badania związane z mapowaniem, lokalizacją, strukturą i funkcją genów, typowaniem genów kandydatów, poszukiwaniem markerów funkcjonalnych mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale również

mogą przynieść wymierny efekt hodowlany umożliwiając prowadzenie selekcji we wczesnych pokoleniach i we wczesnym stadium rozwojowym rośliny (Surma i in. 2011).

Bez wątpienia zsekwencjonowanie genomu jęczmienia w połączeniu z rozwojem technik badawczych i systemów bioinformatycznych umożliwiających wysokoprzepustowe i bardziej precyzyjne badania mulitomiczne, zintensyfikowały postęp w zrozumieniu molekularnych podstaw warunkujących funkcjonowanie jęczmienia w zmiennym środowisku. Pomimo tego, mechanizmy reagowania na bodźce środowiskowe na różnych poziomach molekularnych wciąż nie zostały w pełni wyjaśnione u jęczmienia. Ponadto należy podkreślić, że zdecydowania większość prowadzonych dotychczas badań dotyczyła poznawania reakcji jęczmienia na pojedynczy czynnik stresu, a rośliny jako organizmy osiadłe narażone są na wiele czynników stresowych, które w środowisku naturalnym często pojawiają się jednocześnie. Przykładem może być susza i stres cieplny, gdzie podwyższenie temperatury wpływa na intensyfikację parowania obniżając zawartość wody w glebie i zwiększając nasilenie suszy (Prasad i in. 2011). Uważa się, że odpowiedź rośliny na dwa i więcej czynników stresowych występujących jednocześnie może być odmienna niż na każdy czynnik stresowy działający osobno, zwłaszcza na poziomie molekularnym (Rejeb i in. 2014; Suzuki i in. 2014). Prasch i Sonnewald (2015) zdefiniowali cztery strategie odpowiedzi roślin na stresy występujące symultaniczne względem oddziałujących pojedynczo, tj. reakcja unikalna w większości odmienna od zmian wywołanych przez indywidualne bodźce stresu, efekt addytywny lub synergia pojedynczych stresów oraz dominacja jednego z nich. Wybór odpowiedniej strategii przez roślinę może zależeć od różnych czynników, np. od intensywności danych stresów lub od tego, który z czynników stresowych wystąpił pierwszy. Niewiele jest jednak danych literaturowych dotyczących zbóż, w tym także jęczmienia, tłumaczących wielopoziomowe zmiany zachodzące pod wpływem współdziałania stresów abiotycznych.

Przedstawione osiągnięcie naukowe pt. „**Wieloaspektowa charakterystyka zmian zachodzących w roślinach jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) pod wpływem stresów abiotycznych**” stanowi holistyczne podejście do poznania zmian zachodzących w roślinach jęczmienia jarego pod wpływem stresów abiotycznych z zastosowaniem metod z zakresu fenomiki, genomiki, transkryptomiki, proteomiki i lipidomiki. Prace dotyczyły poznania efektów zarówno pojedynczych czynników stresowych, głównie suszy, jak i symultanicznego oddziaływania stresów abiotycznych na roślinę (susza, wysoka temperatura, zasolenie). Cel nadrzędny, którym było poznanie wszechstronnej reakcji jęczmienia na niekorzystne warunki środowiska (abiotyczne), osiągnięto poprzez realizację poszczególnych zadań/celów badawczych, stanowiących cykl publikacji związanych z osiągnięciem naukowym:

A. Badania nad potencjałem plonowania jęczmienia w zmiennych warunkach środowiska

- charakterystyka fenotypowa roślin w warunkach naturalnych (P1) i kontrolowanych (P2, P3);
- identyfikacja oraz analiza funkcjonalna regionów genomu jęczmienia związanych kształtowaniem się cech plonotwórczych w warunkach naturalnych i deficytu wody (P1, P2);
- zbadanie związku między fenotypowymi cechami dynamicznymi mierzonymi przyżyciowo a cechami po zbiorze (P3).

B. Charakterystyka zmian zachodzących w liściu flagowym jęczmienia jarego pod wpływem suszy i wysokiej temperatury
- cało-genomowe profilowanie transkryptomu (P4);
- profilowanie proteomu oraz zbadanie związku między zmianami w ekspresji genów a akumulacją białek (P5).

C. Określenie zmian w profilu akumulacji lipidów zachodzących w liściach jęczmienia pod wpływem stresów abiotycznych (P6).

D. Charakterystyka zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu cieplnego w węźle krzewienia roślin jęczmienia jarego o polimorfizmie genu *sdw1* (P7).

Materiał roślinny wykorzystany do realizacji powyższych badań stanowiła populacja rekombinacyjnych linii wsobnych (*ang*. recombinant inbred line, RIL; pokolenie F_8) jęczmienia jarego wytworzona w ramach projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania zbóż o zwiększonej odporności na suszę". Populacja ta powstała z mieszańców odmiany Maresi i linii Cam/B1/CI08887/CI05761 (zwana dalej CamB1). Maresi jest niemiecką odmianą browarną, przystosowaną do uprawy w klimacie europejskim i posiada gen półkarłowatości *sdw1*, natomiast linia CamB1 pochodzi z Syrii i odznacza się przystosowaniem do warunków suchego klimatu. W ten sposób uzyskano populację linii homozygotycznych zróżnicowanych pod względem cech struktury plonu i zdolności plonowania w zmiennym środowisku. Takie podejście stworzyło szansę uzyskania korzystnych rekombinantów o stabilnym, wysokim potencjale plonowania w warunkach umiarkowanej strefy klimatycznej i jednocześnie w warunkach niedoboru wody. Ponadto allel *sdw1.d.* (*denso*), obecny w odmianie Maresi i segregujący w populacji MCam, jest jednym z najważniejszych w uprawie jęczmienia w Europie; został wprowadzony do ponad 160 odmian (Maluszynski i Szarejko 2005).

Początkowo moje prace badawcze prowadzone były w odniesieniu do całej populacji MCam (100 linii) i jej form rodzicielskich (**publikacje P1-P3**). Następnie, na podstawie uzyskanych wyników wytypowano linie do pogłębionych badań molekularnych (**publikacje P4-P6**). Dodatkowo, kontynuując prace poznawcze nad efektami locus *sdw1* w warunkach stresu abiotycznego, do badań wykorzystano również odmianę Bowman oraz jej dwie blisko-izogeniczne linie (NIL) o znanej dysfunkcji *sdw1*, tj. linie BW827 i BW828 (**publikacja P7**).

Najważniejsze stosowane metody badawcze obejmowały:
- wysokoprzepustowe genotypowanie SNP (*ang*. single nucleotide polymorphism),
- fenotypowanie konwencjonalne (pomiary manualne) oraz niedestrukcyjne fenotypowanie automatyczne (nowej generacji),
- sekwencjonowanie nowej generacji (NGS),
- wysokosprawną chromatografię cieczową oraz spektrometrię mas o wysokiej rozdzielczości (HPLC/MS),
- chromatografię gazową sprzężoną z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID),
- szybką chromatografię gazową w połączeniu ze spektrometrią mas (Fast-GC/MS).

Omówienie wyników badań

A. Badania nad potencjałem plonowania jęczmienia w zmiennych warunkach środowiska

Badania miały na celu scharakteryzowanie genetycznych podstaw zmienności cech ilościowych w zróżnicowanych warunkach środowiska. Stąd w pierwszym etapie dokonano charakterystyki fenotypowej materiału roślinnego, a następnie skonstruowano mapę genetyczną, co umożliwiło identyfikację regionów genomu jęczmienia kontrolujących ważne cechy agronomiczne (**publikacje P1, P2**).

Badania zawarte w publikacji **P1** obejmowały doświadczenia dla trzech populacji linii homozygotycznych jęczmienia jarego uzyskanych z krzyżowania formy europejskiej i syryjskiej (oznaczone znakiem *), tj. Maresi × CamB1* (populacja MCam), Lubuski × CamB1* (populacja LCam) oraz Georgie × Harmal* (populacja GH). Linie homozygotyczne (F_8) otrzymano techniką pojedynczych nasion (*ang*. single seed descent, SSD), a każda populacja zawierała 100 linii. W moich badaniach, stanowiących część prezentowanego osiągnięcia naukowego, szczególnie koncentrowałem się na charakterystyce populacji MCam.

Doświadczenie prowadzono w warunkach naturalnych na poletkach o powierzchni 1 m^2 w latach 2011-2013. Pomiary agro-meteorologiczne (temperatura powietrza, ilość opadów oraz potencjał wody w glebie) wykonywane codziennie podczas wzrostu roślin wykazały, że pierwszy rok eksperymentu (2011) odznaczał się największym nasileniem suszy. W tym roku, deficyt wody wystąpił już na początku maja, czyli w okresie wzrostu wegetatywnego roślin, a dostępność wody spadała aż do początku lipca, obejmując wzrost generatywny. Stąd uzyskane wyniki dotyczące zmienności cech fenotypowych i analizy loci cech ilościowych (*ang*. quantitative trait loci, QTL) można było interpretować w kontekście suszy. Łącznie obserwowano sześć cech fenotypowych związanych z plonowaniem: długość pędu (cm), długość kłosa (cm), liczba i masa (g) ziaren z kłosa, masa ziarna z poletka (g), masa tysiąca ziaren (g) oraz dodatkowo termin kłoszenia (liczba dni od wysiewu). Stwierdzono znaczne różnice średnich wartości analizowanych cech pomiędzy europejskimi i syryjskimi formami rodzicielskimi, w tym pomiędzy Maresi i CamB1. Forma syryjska charakteryzowała się wcześniejszym terminem kłoszenia oraz znacznie niższym plonem ziarna niż europejska forma rodzicielska, co wynikało z mniejszej liczby i masy ziaren z kłosa u CamB1. Wczesne kłoszenie wskazuje na występowanie strategii ucieczki przed suszą u CamB1, który poprzez wczesność przyspiesza terminy kwitnienia i kłoszenia unikając negatywnych skutków suszy pojawiającej się w późniejszym okresie (Górny 2001). Warto podkreślić, że w roku o największym nasileniu suszy (2011) plon ziarna z poletka dla linii CamB1 był wyższy niż w pozostałych latach, gdy panowały korzystniejsze warunki. Potwierdza to wrodzoną zdolność CamB1 do wzrostu w warunkach deficytu wody. Obserwowano również duże zróżnicowanie fenotypowe w obrębie populacji linii homozygotycznych, gdzie różnica w wysokości roślin i terminie kłoszenia między ekstremalnymi liniami MCam sięgała odpowiednio ok. 30 cm i 15 dni. Był to najprawdopodobniej efekt locus *sdw1*, który determinuje półkarłowość roślin oraz opóźnione kłoszenie (Kuczyńska i in. 2013). Plon ziarna z poletka był również zróżnicowany w obrębie populacji MCam i podlegał istotnemu (P < 000,1) wpływowi

środowiska (rok eksperymentu), podobnie jak pozostałe analizowane cechy. W roku 2011 stwierdzono największy, negatywny wpływ warunków środowiska na plon ziarna, jednocześnie duże nasilenie suszy odnotowane w tym roku skutkowało największym zróżnicowaniem linii pod względem tej cechy w odniesieniu do pozostałych lat. Potwierdza to dużą zmienność wśród rekombinantów uzyskanych z krzyżowania formy europejskiej i syryjskiej pod względem potencjału plonowania w warunkach długookresowej suszy.

Do identyfikacji QTL związanych z potencjałem plonowania populacji MCam wykorzystano zintegrowaną mapę genetyczną (13 grup sprzężeń) utworzoną z map indywidualnych trzech populacji RIL opracowanych z użyciem markerów SNP (*ang*. single nucleotide polymorphism) oraz mikrosatelitarnych (SSR). Charakterystykę pojedynczych map oraz mapy zintegrowanej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka indywidualnych map genetycznych oraz mapy zintegrowanej

	Mapa genetyczna			
	Populacja mapująca			Zintegrowana
	MCam	LCam	GH	
Ogólna liczba zmapowanych markerów	548	485	562	819
Liczba zmapowanych markerów SSR	100	78	98	117
Liczba zmapowanych markerów SNP	448	485	464	702
Długość mapy (cM)	873,9	686,0	787,8	953,8
Średnia odległość między markerami (cM)	1,6	1,4	1,4	1,2

Łącznie zidentyfikowano 89 QTL dla analizowanych cech w trzech populacjach RIL, najwięcej dla populacji MCam (36), gdzie większość (64% wszystkich loci) QTL wykazało efekty niezależne od środowiska. QTL o efektach stabilnych w różnych warunkach środowiska mogą być użyteczne dla postępu w badaniach nad kształtowaniem się cech plonotwórczych (Mansour i in. 2014). Stwierdzono, że w przypadku większości QTL wykrytych dla analizowanych cech allele podnoszące wartość cechy pochodziły zarówno z formy rodzicielskiej Maresi jak i CamB1 pomimo, że forma syryjska na ogół cechowała się niższymi wartościami średnimi tych cech. Przykładowo dla QTL determinującego długość pędu, sprzężonego z markerem SNP 5260-462 (chromosom 3H), allel obniżający wartość cechy pochodził z odmiany Maresi, co jest zgodne z półkarłowym typem wzrostu tego genotypu wynikającym z efektu locus *sdw1* położonego w sąsiedztwie wspomnianego QTL; tym samym allel formy syryjskiej warunkował zwiększenie długości pędu w tym QTL. Odwrotnie było w przypadku QTL dla długości pędu zmapowanego w chromosomie 5H sprzężonego z markerem SNP 4795-782, w przypadku którego allel odmiany Maresi zwiększał wartość cechy.

Dodatkowo wyznaczono regiony genomu (A-L) zawierające co najmniej dwa loci blisko sąsiadujące (zbiorczo dla trzech populacji RIL), tj. zgrupowane w przedziale o długości 3,6 cM (± 1,8 cM od centralnego QTL). Następnie podjęto próbę interpretacji funkcjonalnej tych regionów wykonując analizę adnotacji poprzez powiązanie sekwencji markera SNP (sprzężonego z QTL w danym regionie) z najbliżej położonymi genami jęczmienia określonymi w bazie EnsemblPlants. Na tej podstawie wykryto, że efekty QTL dla długości pędu oraz terminu kłoszenia (dla populacji MCam) zmapowane w długim ramieniu

chromosomu 3H (region H wokół locus *sdw1*) związane były z genem kodującym oksydazę giberelinową GA20, tj. *HvGA20ox2*. Gen ten zaangażowany w biosyntezę giberelin został już wcześniej zaproponowany jako kandydujący dla locus *sdw1* (Jia et al. 2009; 2011). Co ciekawe, analiza adnotacji wykazała również obecność genu *HvGA20ox3* w tym regionie, będącego paralogiem genu *HvGA20ox2*. To sugeruje, że dysfunkcja genu zlokalizowanego w locus *sdw1* może być w pewnym stopniu kompensowana aktywnością innego genu sąsiedniego o tej samej funkcji. Analiza funkcjonalna wykazała również, że prawdopodobnym podłożem genetycznym dla QTL związanych z długością pędu, długością kłosa oraz terminem kłoszenia w populacji MCam (region L, 7H) był jeden z ważnych genów wpływających na kwitnienie, tj. *Vrn-H3* (*HvFT1*). To może wskazywać na plejotropowy efekt *Vrn-H3* na komponenty plonu u jęczmienia, co zasugerowano również w późniejszych badaniach opisanych przez Wiegmanna i wsp. (2019). Warto zauważyć, że efekty wspomnianych QTL w regionach H i L były w większości niezależne od środowiska, co sugeruje, że fragmenty genomu wokół locus *sdw1* oraz *Vrn-H3* mogą pełnić ważną rolę w determinowaniu wybranych cech ilościowych, nawet w bardzo niesprzyjających warunkach otoczenia, które w prezentowanych badaniach wystąpiły w 2011 roku.

Dodatkowo dla genów w zdefiniowanych regionach QTL, w których zmapowano QTL dla plonu ziarna z poletka (regiony B i E), stwierdzono nadreprezentację terminu GO (*ang*. Gene Ontology) związanego z metabolizmem lipidów („lipid metabolic process"). [*Taki związek plonu ziarna i genów związanych z metabolizmem lipidów skłonił mnie do rozszerzenia badań nad profilem lipidomu jęczmienia jarego w różnych warunkach stresów abiotycznych (opisane w publikacji P6).*] Należy podkreślić, że w przypadku plonu ziarna z poletka dla żadnej z populacji RIL nie wykryto QTL w roku o największym przesuszeniu środowiska (2011).

Ważnym elementem badań była analiza stabilności wykonana ze względu na plon ziarna z poletka. Wyznaczono dwa zestawy linii homozygotycznych: (i) o stabilnym plonie ziarna na przestrzeni trzech lat, którego wartość była wyższa niż średnia wartość obliczona dla całej populacji MCam, (ii) linie ekstensywne charakteryzujące się lepszym plonem ziarna w warunkach niekorzystnych, tj. w roku 2011 względem innych genotypów w populacji. Następnie z uwagi na fakt, że wczesne kłoszenie (jako strategia ucieczki przed suszą) oraz półkarłowy typ wzrostu (warunkujący odporność na wyleganie) stanowią pożądane cechy w programach hodowlanych jęczmienia, wybrano po jednym QTL, których efekty w największym stopniu wpływały na termin kłoszenia oraz długość pędu. QTL dla kłoszenia związany był z markerem SNP 5880-2547 (chromosom 2H), natomiast QTL dla długości pędu z markerem SNP 5260-462 (chromosom 3H). Na tej podstawie wyselekcjonowano linie homozygotyczne MCam posiadające jednocześnie allel z formy rodzicielskiej CamB1 w przypadku markera 5880-2547 warunkujący wczesne kłoszenie oraz allel z odmiany Maresi w przypadku markera 5260-462 warunkujący redukcję długości pędu. Pięć takich linii MCam charakteryzowało się stabilnym plonem ziarna z poletka (MCam053, MCam067, MCam075, MCam080, MCam087) oraz jedna linia była ekstensywna (MCam071). Genotypy te uznano za potencjalnie korzystne źródło alleli, które mogą determinować lepsze plonowanie w warunkach suszy.

Żeby lepiej poznać wpływ okresowej suszy na plon ziarna i jego komponenty równolegle prowadzono badania nad populacją linii MCam w warunkach szklarniowych z aplikacją

deficytu wody (**publikacja P2**). Założeniem tych badań była identyfikacja regionów genomu związanych z kształtowaniem się cech plonotwórczych w warunkach okresowej suszy. Biorąc pod uwagę znaczenie półkarłowości zbóż dla rolnictwa oraz z uwagi na segregację locus półkarłowatości *sdw1* w populacji MCam, w badaniach zwrócono szczególną uwagę na wysokość rośliny (rozumianą jako długość pędu) i jej związek z wybranymi cechami ilościowymi. Przyjęto hipotezę, że półkarłowy typ wzrostu roślin jęczmienia wpływa na ich reakcję na niedobór wody i na formowanie komponentów plonu. Doświadczenie doniczkowe (o pojemności 10 L) prowadzono w latach 2011-2013 w dwóch wariantach nawadniania, tj. optymalnym (kontrola) oraz okresowej suszy. Odpowiednie poziomy wilgotności podłoża ustalono na podstawie krzywej retencji wodnej pF (potencjał wody glebowej): pF od 2,2 do 3,0 dla kontroli oraz od 3,2 do 4,0 dla suszy. Rośliny poddano stresowi niedoboru wody w dwóch terminach: (i) w stadium siewki zaczynając od fazy trzech liści (13 w skali BBCH) trwającym przez 10 dni – S1, (ii) w stadium liścia flagowego (37 w skali BBCH) trwającym przez 14 dni – S2, przy czym warunki stresowe zastosowane w różnym okresie wegetacji roślin dotyczyły odmiennych obiektów, tzn. rośliny poddane stresowi S1 nie były objęte stresem S2 i odwrotnie.

Ocena biometryczna 10 cech po zbiorze (długość pędu głównego [cm], liczba rozkrzewień, długość kłosa głównego i kłosów bocznych [cm], liczba oraz masa [g] ziaren w kłosach głównym i bocznych, masa tysiąca ziaren [g], masa ziarna z rośliny [g]) wraz z obserwowanym terminem kłoszenia (liczba dni od wysiewu) potwierdziła duże zróżnicowanie fenotypowe między formami rodzicielskimi oraz w obrębie populacji MCam niezależnie od warunków nawadniania. W największym stopniu dotyczyło to masy ziarna z rośliny, terminu kłoszenia, a także długości pędu. W obrębie populacji RIL odnotowano efekty transgresji w odniesieniu do wszystkich analizowanych cech. Najbardziej niekorzystne odziaływanie deficytu wody odnotowano dla masy ziarna z rośliny, gdzie spadek wartości cechy sięgał 50% względem kontroli (w S2). Charakterystyka fenotypowa obejmująca cechy związane z kłosami głównym i bocznymi dowiodła, że okresowy niedobór wody zapoczątkowany w stadium liścia flagowego (S2) w większym stopniu wpływał niekorzystnie na badane cechy niż stres występujący w stadium siewki (S1) choć należy zauważyć, że stres S2 trwał dłużej niż S1. [*Wynik ten skłonił mnie do podjęcia badań nad molekularną charakterystyką zmian zachodzących w liściu flagowym w warunkach stresów abiotycznych (omówione w publikacjach P4 i P5)*.] Na uwagę zasługuje wysoka odziedziczalność stwierdzona dla badanych cech, zwłaszcza związanych z kłosami głównym i bocznymi w warunkach stresowych, co może sugerować wykorzystanie tych cech w selekcji materiałów roślinnych o lepszym plonowaniu w niekorzystnym środowisku.

Dane otrzymane z fenotypowania linii populacji MCam posłużyły do identyfikacji QTL związanych z potencjałem plonowania w warunkach optymalnych i niedoboru wody, co było głównym celem badań w publikacji P2. Do mapowania QTL wykorzystano uprzednio opracowaną zintegrowaną mapę genetyczną (publikacja P1). Łącznie zidentyfikowano 103 QTL dla analizowanych cech. Szczególną uwagę zwracają QTL wykazujące stałe efekty w zmiennych warunkach nawadniania wykryte dla wszystkich obserwowanych cech, z wyjątkiem terminu kłoszenia. W przypadku większości analizowanych cech wykryte QTL o stabilnych efektach posiadały allele podnoszące wartość cechy zarówno z formy rodzicielskiej Maresi jak i CamB1. Wyjątek stanowiły cechy związane z kłosami bocznymi oraz masa tysiąca ziaren, w przypadku których zwiększona wartość cechy powodowana była

wyłącznie allelem odmiany europejskiej. Co ciekawe, QTL o stabilnych efektach stwierdzone dla różnych cech często wykazywały wspólną pozycję w chromosomie. Przykładowo taką kolokalizację QTL obserwowano dla długości kłosa bocznego i dla masy ziarna z kłosa głównego w chromosomie 2H wokół markera SNP 2417–924 (37 cM) oraz dla masy ziarna z kłosa głównego, masy tysiąca ziaren i liczby rozkrzewień w tym samym chromosomie wokół markera SNP 2580-1456 (49,79 cM). Takie regiony genomu, które kontrolują stabilne efekty dla kliku cech ilościowych jednocześnie wydają się szczególnie interesujące pod względem zwiększania potencjału plonowania jęczmienia w programach hodowlanych, gdyż podwyższenie plonu ziarna można osiągnąć poprzez ulepszanie jego komponentów. Markery SNP, sprzężone z QTL dla wspomnianych cech, mogą być obiecujące w opracowaniu użytecznych narzędzi w programach selekcyjnych.

Postęp w badaniach nad kształtowaniem się cech plonotwórczych w warunkach niedoboru wody może dokonywać się nie tylko przez identyfikację QTL o efektach stabilnych w różnych warunkach środowiska, lecz również poprzez poszukiwanie regionów genomu aktywnych tylko w warunkach stresu. W niniejszych badaniach wykryto 10 QTL wykazujących istotne efekty wyłącznie w doświadczeniach z ograniczonym dostępem wody. W przypadku tych loci zaobserwowano, że podczas deficytu wody w późniejszym okresie wegetacji (S2) dodatnie działanie na cechy częściej związane było z allelem odmiany europejskiej, natomiast w warunkach suszy w stadium siewki (S1) allele pochodzące z formy syryjskiej na ogół zwiększały wartość cechy. Ten pozytywny wpływ alleli CamB1 podczas wczesnej suszy wydaje się być uzasadniony ze względu na naturalne przystosowanie formy syryjskiej do ograniczonego dostępu wody już w początkowym etapie wzrostu. Z drugiej strony badania dowiodły, że odmiana europejska również może być potencjalnym źródłem lepszego plonowania w warunkach stresowych występujących w późniejszym stadium rozwoju rośliny. Regiony genomu wykazujące nawet niewielki, lecz istotny efekt na cechę w środowisku stresowym, mogą wraz z głównymi loci o wysokich i stabilnych efektach korzystnie wpływać na finalną wartość danej cechy ilościowej w warunkach deficytu wody i być przydatne w selekcji form jęczmienia o wysokim potencjale plonowania w zmiennym środowisku.

Biorąc pod uwagę zależność między wysokością rośliny a plonem ziarna porównano wzajemne położenie QTL związanych z długością pędu a komponentami plonu. Wykryto liczne QTL dla różnych cech, które kolokalizowały z QTL dla długości pędu w chromosomach 2H-6H, najwięcej w chromosomie 2H w regionie pomiędzy markerami SNP 5880-2547 (10,74 cM) i 1865-396 (11,20 cM), w którym zmapowano QTL dla wszystkich analizowanych cech. Innym z takich regionów był fragment chromosomu 3H wokół locus *sdw1* w sąsiedztwie markera SNP 5260-462 (105,75 cM). Analiza QTL dowiodła, że QTL dla długości pędu głównego w tym regionie chromosomu 3H wywierał największy wpływ na redukcję wysokości rośliny, co było związane z allelem pochodzącym z odmiany Maresi. Efekt ten był istotny we wszystkich warunkach środowiska, jednakże nie był stabilny. Maksymalne obniżenie wysokości roślin w populacji MCam obliczone na podstawie efektów addytywnych tego QTL wynosiło ok. 11 cm w warunkach optymalnych, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Kuczyńska i in. 2013). Ponadto analiza QTL wykazała, że allel odmiany europejskiej warunkujący redukcję długości pędu jednocześnie determinował zwiększoną masę ziarna z rośliny niezależnie od warunków środowiska oraz pozytywnie wpływał na liczbę ziaren w kłosie głównym wyłącznie w warunkach stresu zastosowanego w późniejszej fazie rozwoju

roślin (S2). Z kolei czwarty QTL zmapowany w regionie locus *sdw1* dotyczył długości kłosa głównego i wykazał istotne efekty wyłącznie w warunkach wczesnego stresu (S1), a zwiększona wartość cechy determinowana była allelem syryjskiej formy rodzicielskiej.

Podobnie jak w publikacji P1 podjęto próbę interpretacji funkcjonalnej zidentyfikowanych QTL. Wyznaczono kilkanaście terminów GO (w kategorii proces biologiczny), które były nadrepreztowane wśród genów położonych w regionach QTL. Na tej podstawie stwierdzono, że region chromosomu 5H, w którym zmapowano QTL dla długości pędu głównego (58,01 cM, marker SNP 314-559) oraz dla masy ziarna z kłosów bocznych (62,61 cM, marker SSR GMS061) zawiera geny potencjalne zaangażowane w odpowiedź na stres (adnotowane do terminu *ang*. „response to stress"). Jednym z nich był gen kodujący czynnik transkrypcyjny szoku cieplnego A2 (HsfA2). Obecnie wiadomo, że czynniki te odgrywają nie tylko ważną rolę w termo-tolerancji roślin, ale uczestniczą również w regulacji odpowiedzi na stresy środowiskowe, w tym suszę (Mishra i in. 2020). Podobnie jak w poprzedniej publikacji (P1) termin odnoszący się do metabolizmu lipidów był również nadreprezentowany, przy czym dotyczyło to genów w regionach QTL dla liczby rozkrzewień (chromosom 6H) oraz dla długości kłosa bocznego (chromosom 7H).

Omówione powyżej prace opierały się na obserwacjach fenotypowych prowadzonych w sposób destrukcyjny, czyli tylko w jednym momencie czasowym, tj. po osiągnięciu dojrzałości pełnej przez rośliny. Dlatego w kolejnych badaniach nad poznaniem zmian zachodzących u jęczmienia jarego pod wpływem stresu abiotycznego podjęto próbę oceny kondycji roślin przyżyciowo w sposób ciągły (**publikacja P3**). Linie homozygotyczne populacji MCam poddano obrazowaniu za pomocą systemu kamer pracujących w różnym zakresie długości fali. Stres deficytu wody wprowadzono 35 dni po wysiewie i utrzymywano przez 14 dni; stres obejmował stadium liścia flagowego. Automatyczne obrazowanie roślin prowadzono codziennie zaczynając cztery dni przed rozpoczęciem stresu, kontynuowano podczas suszy oraz po przywróceniu nawadniania, łącznie przez 33 dni. Równolegle prowadzono eksperyment w warunkach optymalnego nawadniania w całym okresie wegetacji. Po zbiorze oceniano cechy związane z kłosami głównym i bocznymi, a także wysokość rośliny, liczbę pędów i masę tysiąca ziaren; łącznie 12 cech. Poza charakterystyką zmian fenotypowych w trakcie wzrostu rośliny badania miały odpowiedzieć na pytanie czy na podstawie obserwacji cech w okresie wegetacji, w tym w trakcie stresu, można wnioskować o końcowym plonie i jego komponentach, tj. o cechach mierzonych po zbiorze. Dodatkowo badania miały na celu opracowanie metodyki analizy danych wytworzonych na podstawie analizy obrazu, jednak ta część nie była przedmiotem mojej pracy.

Z mojego punktu widzenia najbardziej interesująca była ocena efektów suszy (*ang*. relative drought effect, RDE) na analizowane cechy obliczone w oparciu o dane z eksperymentu w warunkach optymalnych i stresowych. Na tej podstawie wyodrębniono dwie linie MCam o skrajnej reakcji na suszę w odniesieniu do cech po zbiorze: linia LA (MCam001) o wysokich wartościach badanych cech w warunkach optymalnych, jednakże o ich dużej redukcji pod wpływem suszy oraz linia LB (MCam079) o niższych wartościach cech w warunkach kontrolnych, ale jednocześnie o niewielkim negatywnym wpływie stresu na te cechy (masa tysiąca ziaren uległa nawet zwiększeniu w niekorzystnych warunkach). W ten sposób linię LA zdefiniowano jako podatną na suszę a linię LB jako bardziej odporną. W oparciu o efekty suszy

RDE obliczone dla cech związanych z kłosem głównym sporządzono ranking linii w obrębie całej populacji MCam, który posłużył do wyboru interesujących genotypów do innych badań.

Automatyczne fenotypowanie dostarczyło blisko 200 000 obrazów dla populacji MCam w dwóch traktowaniach, których przetworzenie pozwoliło zdefiniować 376 cech dynamicznych. Ostatecznie do analizy wybrano 286 takich cech, które podzielono na trzy grupy: związane z geometrią (najliczniejsze) rośliny, kolorem oraz teksturą. Efekty suszy RDE obliczone analogicznie jak dla cech po zbiorze wykazały, że susza (w ujęciu średnim dla całej populacji) miała największy wpływ na cechy związane z powierzchnią rośliny (*ang*. projected plant area) – efekt negatywny oraz kolorem (*ang*. pixel color) – efekt pozytywny, i były to pierwsze obserwowane skutki stresu na poziomie fenotypowym. Zatem rośliny w odpowiedzi na deficyt wody w pierwszej kolejności ograniczały wzrost, a jednocześnie postępowało żółknięcie liści prawdopodobnie na skutek degradacji chlorofilu. Maksymalny wpływ suszy na większość analizowanych cech dynamicznych odnotowano w ostatnich dniach deficytu wody, choć w niektórych przypadkach efekt stresu narastał jeszcze przez kilka dni po przywróceniu optymalnego nawadniania. Analiza korelacji genetycznych pomiędzy traktowaniami wykazała większą zmienność w obrębie populacji MCam po przywróceniu podlewania niż w trakcie suszy co wskazuje, że genotypy najbardziej różniły się potencjałem regeneracji po ustąpieniu warunków stresowych. Dobrze obrazuje to zachowanie skrajnych genotypów LA i LB wyznaczonych uprzednio na podstawie RDE dla cech plonotwórczych. W czasie suszy liście linii LB (bardziej odporna) wykazywały mniejszy stopień żółknięcia niż liście linii LA (mniej odporna), jednakże po przywróceniu nawadniania stopień żółknięcia liści LB wzrastał, podczas gdy dla LA stopniowo malał. Jednocześnie po ustąpieniu stresu obserwowano zwiększenie wartości cechy związanej z powierzchnią rośliny u linii LA oraz spadek u LB. Wyniki te wskazują na większą zdolność linii LA do regeneracji biomasy po ustąpieniu suszy niż linii LB, niemniej jednak nowe wykształcone kłosy były w dużej mierze bezpłodne, co w konsekwencji przekładało się na redukcję plonu ziarna względem kontroli u linii LA. Z kolei brak zdolności linii LB do regeneracji po przywróceniu nawadniania mógł być związany z wczesnością tego genotypu. Stwierdzono bowiem, że w ostatnich dniach suszy u linii LB kłoszenie dobiegło końca i najwyraźniej po ustąpieniu stresu dochodziło do szybkiego wydania plonu. W tym samym czasie u linii LA dopiero rozpoczynało się kłoszenie i etap ten był kontynuowany w kolejnych dniach po ustąpieniu stresu. Wydaje się, że u linii LB wystąpiła strategia ucieczki przed suszą, podobnie jak u jej formy rodzicielskiej CamB1. Pomimo, że strategia ta pozwala ograniczyć negatywne skutki suszy wiąże się ona na ogół z niższym plonowaniem w warunkach optymalnych, co także wykazano w przypadku CamB1 w poprzednich badaniach.

Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy efektami suszy RDE obliczonymi dla cech dynamicznych oraz dla cech po zbiorze. Wykryto, że reakcja cech dynamicznych na suszę była w największym stopniu skorelowana z reakcją cech związanych z kłosem głównym (cztery cechy rozpatrywane łącznie) oraz masą tysiąca ziaren, odpowiednio było to 21 i 11 cech dynamicznych. Pośród nich było pięć cech dynamicznych, których efekty RDE były skorelowane z RDE dla obu powyższych cech po zbiorze. Między innymi dotyczyło to cechy związanej z „convex hull geometry" opisującej pokrój wzrostu rośliny. Można zatem twierdzić, że genotyp o lepszych wartościach wspomnianych cech po zbiorze w warunkach okresowej suszy powinien charakteryzować się bardziej płożącym/rozłożystym typem wzrostu

w końcowym okresie stresu (pozytywny efekt suszy na powyższą cechę dynamiczną) niż genotyp mniej odporny. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania niektórych cech mierzonych przyżyciowo do predykcji komponentów plonu, a tym samym do selekcji odmian jęczmienia o zwiększonej odporności na suszę. Warto jednak potwierdzić uzyskane wyniki w eksperymentach z aplikacją suszy w różnych stadiach rozwoju rośliny jaki i z różnym nasileniem stresu.

Podsumowując, badania nad potencjałem plonowania jęczmienia w warunkach naturalnych oraz kontrolowanej suszy pozwoliły na wyodrębnienie rejonów genomu, w których skupione były geny odpowiedzialne za obserwowaną zmienność fenotypową cech mierzalnych w zróżnicowanych warunkach środowiska. Wykazano, że silna zależność między wysokością rośliny a plonem ziarna miała podłoże genetyczne, gdyż zidentyfikowano kilka regionów genomu determinujących jednocześnie te cechy. Dowiedziono, że wraz z redukcją wysokości roślin locus *sdw1* może pozytywnie wpływać na kształtowanie innych cech, także w warunkach deficytu wody, w tym cechy związanej z kłosem głównym, co w literaturze nie zostało dotąd opisane. Ponadto adnotacje funkcjonalne wykazały, że zmienność cech ilościowych w zróżnicowanym środowisku może być warunkowana m.in. genami związanymi z metabolizmem lipidów oraz genami kodującymi czynniki transkrypcyjne szoku cieplnego. Charakterystyka fenotypowa cech dynamicznych mierzonych w kolejnych dniach wzrostu roślin dowiodła, że różnice w wielkości plonu po zbiorze pomiędzy genotypami mogą wynikać z ich różnego potencjału do regeneracji po ustąpieniu stresu. Potwierdzono, że ograniczenie rozwoju biomasy rośliny to pierwszy symptom deficytu wody. Udowodniono, że na podstawie obserwacji cech w okresie wegetacji rośliny możliwe jest wnioskowanie o komponentach plonu, które mierzy się po zbiorze, przede wszystkim w odniesieniu do cech związanych z kłosem głównym o wysokiej odziedziczalności w warunkach suszy. Stwarza to szansę selekcji materiałów roślinnych pod względem lepszego plonowania w warunkach stresu już we wczesnym etapie rozwoju rośliny. Oprócz charakteru poznawczego, badania pozwoliły na identyfikację markerów potencjalnie użytecznych do wykrywania w genomach roślin obecności alleli genów determinujących interesujące cechy ilościowe, które w przyszłości mogą stać się skutecznym narzędziem wspierającym tradycyjną selekcję roślin. Ponadto wyodrębnione linie MCam o stabilnym plonie ziarna, posiadające korzystne allele determinujące redukcję wysokości oraz przyśpieszone kłoszenie, zostały zdeponowane w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie i mogą być wykorzystane jako źródło korzystnych genów w opracowaniu odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę.

B. Charakterystyka zmian zachodzących w liściu flagowym jęczmienia jarego pod wpływem suszy i wysokiej temperatury

Na podstawie badań własnych oraz z danych literaturowych wynika, że skutki działania stresów abiotycznych w fazie rozwoju generatywnego rośliny są często nieodwracalne i wpływają na zmniejszoną liczbę kłosków płodnych, redukcję liczby ziaren a tym samym na obniżenie produktywności roślin. Szczególnie ważna jest wtedy żywotność liścia flagowego i jego prawidłowa aktywność fotosyntetyczna, zwłaszcza gdy liście dolne zaczynają zasychać, gdyż odpowiada on za dostarczanie asymilatów do rozwijającego się kłosa (Verma i in. 2004).

Pomimo dużego znaczenia liścia flagowego dla rozwoju kłosa badania nad molekularnymi podstawami zmian zachodzących w tym liściu pod wpływem stresów abiotycznych są bardzo ograniczone. Jak dotąd ogólnoświatowy Atlas Ekspresji EBI nie zawiera informacji o ekspresji genów w tkance liścia flagowego u jęczmienia. Stąd kolejnym celem prowadzonych przeze mnie badań było poznanie zmian na poziomie transkryptomu (**publikacja P4**) oraz proteomu (**publikacja P5**) w liściu flagowym jęczmienia jarego zachodzących pod wpływem suszy i wysokiej temperatury działających razem i osobno na roślinę. Przyjęto hipotezę, że zmiany wywołane jednoczesnym występowaniem suszy i wysokiej temperatury stanowią w dużej części unikalną odpowiedź i nie są sumą efektów pojedynczych stresów. Jednakże zachowanie niektórych genów/białek w różnych warunkach stresowych może być jednakowe, a ich identyfikacja również była jednym z celów moich badań. Dodatkowo założono, że zmiany w liściu flagowym wywołane stresem zależą od jego morfologii.

Realizacja badań wymagała doboru odpowiedniego materiału roślinnego. Na podstawie wcześniejszych badań własnych (publikacje P1-P3) wyselekcjonowano siedem linii homozygotycznych populacji MCam zróżnicowanych pod względem cech fenotypowych w tym wielkości blaszki liścia flagowego oraz podatności na deficyt wody. Następnie genotypy sklasyfikowano według wielkość blaszki liścia flagowego i wyodrębniono trzy grupy: grupa o liściach małych (S), średnich (M) i dużych (L). Wyniki analizowano w kontekście tych trzech grup, a nie siedmiu genotypów osobno; takie podejście umożliwiło interpretowanie wyników bardziej w zależności od rozmiaru blaszki liścia flagowego niż od genotypu. Doświadczenia prowadzono w fitotronach w ściśle kontrolowanych warunkach w czterech wariantach środowiska: C – warunki optymalne (wilgotność podłoża 70% FC (*ang*. field capacity) i temp. 8º/14ºC noc/dzień przez pierwszy miesiąc, a następnie 16º/22ºC); D – susza (wilgotność podłoża 20% FC i temp. jak w C); H – wysoka temperatura (temp. 20°/30°C noc/dzień i wilgotność podłoża jak w C); oraz stres łączony HD. Warunki stresowe aplikowano w stadium pełnego liścia flagowego (39 BBCH) przez siedem dni. Analizy transkryptomiczne i proteomiczne prowadzono na materiale (liściach flagowych) zebranym w dwóch momentach czasowych: T1 – trzy dni oraz T2 – siedem dni od momentu wprowadzenia stresu. Cztery warianty środowiska, trzy grupy genotypów (wyróżnione ze względu na rozmiar liścia flagowego) oraz dwa punkty czasowe dały łącznie 18 porównań (kontrastów) do analizy.

W **publikacji P4** przedstawiono szczegółową charakterystykę transkryptomów dla grup S, M i L w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji (mRNA-seq). Na podstawie całogenomowej analizy genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG) zidentyfikowano DEG specyficzne oraz wspólne dla: (i) rozmiaru liścia flagowego, (i) wariantów stresu abiotycznego oraz (iii) punktów czasowych, tj. liczby dni stresu. Regulacja ekspresji genów była zależna od czasu, tj. czterodniowa różnica w ekspozycji rośliny na niekorzystne warunki miała duży wpływ na modelowanie transkryptomu; znacznie więcej DEG obserwowano w siódmym dniu (T2) niż w trzecim dniu (T1) stresu niezależnie od jego wariantu. Zmieniona ekspresja większości genów we wczesnym etapie stresu (względem kontroli) utrzymywała się podczas wydłużonego stresu. Wykazano, że reakcja na poziomie transkryptomu pod wpływem stresu zależała od rozmiaru liścia flagowego, a zmiany obserwowane w grupie S zdecydowanie odbiegały od pozostałych grup. W małych liściach (S) większość DEG wykazała obniżoną ekspresję, natomiast w dużych (L) zwiększoną. Z kolei w liściach o średnim rozmiarze (M) w warunkach stresu D i HD przeważały geny o wzmożonej ekspresji, a w H o zredukowanej.

Ponadto w grupie S zidentyfikowano największą liczbę genów, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem stresów w T2. Wynik ten może sugerować, że prawidłowe funkcjonowanie liścia flagowego o małej powierzchni w warunkach przedłużającego się stresu wymagało większych zmian w regulacji genów niż w liściach flagowych o większym rozmiarze. Z kolei wczesny stres w największym stopniu wpływał na ekspresję genów w liściach z grupy M. Z drugiej strony wyznaczono 349 genów, których ekspresja była indukowana wybranymi warunkami stresowymi we wszystkich grupach liści flagowych, część z nich wykazała zmieniona ekspresję we wszystkich warunkach stresów abiotycznych.

Profilowanie ekspresji genów dowiodło, że w kontekście całego genomu regulacja transkryptomu pod wpływem łączonego stresu była bardziej zbliżona do regulacji obserwowanej w suszy niż w warunkach wysokiej temperatury; zdecydowanie większa liczba DEG była wspólna między D i HD niż między H i HD. Na tej podstawie wnioskowano, że spośród czterech znanych strategii reakcji roślin na wieloczynnikowe warunki stresowe (zdefiniowane przez Prascha i Sonnewalda 2015), w naszych badaniach występowała dominacja efektów suszy podczas stresu HD. Z uwagi na fakt, że wybór danej strategii przez roślinę zależy często od nasilenia czynnika stresowego, najwyraźniej niedobór wody był zdecydowanie bardziej odczuwalny przez rośliny jęczmienia niż stres cieplny. Pomimo dużego podobieństwa w profilach ekspresji genów między D i HD, wykryto również liczne geny reagujące specyficzne w każdym ze stresów. Uzyskane wyniki potwierdzają przyjętą hipotezę, że zmiany w regulacji transkryptomu wywołane jednoczesnym występowaniem suszy i wysokiej temperatury nie są sumą efektów pojedynczych stresów, a odpowiedź na łączony stres jest w dużej mierze reakcją unikalną. Analiza funkcjonalna (Panther Protein Class) wykazała, że DEG specyficzne dla HD (365 genów) były związane z aktywnością różnych enzymów m.in. z grupy oksydoreduktaz czy hydrolaz.

Na podstawie terminów Gene Ontology (GO) wyznaczono adnotacje funkcjonalne, które wykazały nadreprezentację w zbiorach DEG wykrytych pomiędzy różnymi rozmiarami liści flagowych i pomiędzy wariantami stresu. W ten sposób zidentyfikowano procesy/reakcje przypisane do genów, których ekspresja ulegała istotnej zmianie pod wpływem czynnika stresowego. Szczególną uwagę zwrócono na geny, których ekspresja była indukowana we wszystkich warunkach stresowych (95 DEG). Takie geny mogą determinować uniwersalną odpowiedź na stres, tzn. niezależną od warunków środowiska, stąd mogą one być użyteczne w ulepszaniu odporności roślin na wielorakie stresy abiotyczne. Analiza nadreprezentacji terminów GO potwierdziła, że geny te należały do mechanizmów warunkujących odpowiedź na suszę, stres cieplny i oksydacyjny oraz na reaktywne formy tlenu (ROS). Przykładowo wśród nich zidentyfikowano geny kodujące dehydryny. Co ciekawe, w kategorii funkcji molekularnych wykryto termin dotyczący wiązania tetrapirolu. Według doniesień literaturowych (Busch and Montgomery, 2015) związki z grupy tetrapiroli uczestniczą w łagodzeniu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego u rośliny. Widocznie był to uniwersalny mechanizm występujący w odpowiedzi na suszę i wysoką temperaturę w liściach flagowych analizowanych genotypów jęczmienia.

W pracy szczegółowo przeanalizowano reakcję genów związanych z terminami GO, dla których rozkład przypisanych DEG o obniżonej ekspresji względem wzmożonej ekspresji pod wpływem stresu (w odniesieniu do kontroli) był istotnie różny niż rozkład wszystkich DEG w doświadczeniu, tj. rozkład brzegowy 3008 (liczba istotnych zmian o zredukowanej ekspresji)

do 3957 (liczba istotnych zmian o wzmożonej ekspresji); przy rozkładzie brzegowym należy zauważyć, że pojedynczy DEG może wykazać kilka istotnych zmian regulacji w obrębie 18 analizowanych kontrastów. Takie podejście umożliwiło stwierdzenie, dla których terminów GO (czyli dla jakich funkcji/procesów) ekspresja przypisanych genów była szczególnie zwiększona lub zmniejszona pod wpływem zastosowanych stresów, a zatem takich, które w największym stopniu były zaangażowane w reakcję na stres. W toku tej analizy wyodrębniono liczne terminy związane z fotosyntezą, gdzie przypisane DEG charakteryzowały się głównie obniżoną ekspresją w warunkach stresu. Zdecydowana większość z nich (ok. 90%) została zidentyfikowana w grupie genotypów o małych liściach flagowych, przede wszystkim w odpowiedzi na późniejszy stres łączony oraz suszę; w grupie L zmiany regulacji tych DEG były incydentalne. Pośród nielicznych genów o wzmożonej ekspresji przypisanych do terminów związanych z fotosyntezą wykryto (w grupie S) przykładowo DEG opisany jako kodujący białko PsbQ – tworzące kompleks rozszczepiający cząsteczkę wody OEC (*ang*. oxygen evolving complex). Funkcjonowanie tego kompleksu u jęczmienia w warunkach stresów abiotycznych zbadano jak dotąd w niewielkim zakresie, dlatego każde nowe doniesienie na ten temat wydaje się wartościowe. Silna reakcja na stres bazowała również na aktywności genów związanych ze szlakiem sygnałowym kwasu abscysynowego (ABA) i z odpowiedzią na deficyt wody (w większości były to te same geny co dla ABA), które wykazały głównie wzmożoną ekspresję pod wpływem czynnika stresowego. Wśród nich najliczniejszą grupę stanowiły geny kodujące dehydryny, a zmiany w regulacji ich ekspresji obserwowano we wszystkich grupach liści flagowych. Kwas abscysynowy uważany jest za główny fitohormon zaangażowany w reakcję rośliny na liczne czynniki stresogenne, a wzrost jego poziomu w komórkach indukuje ekspresję wielu genów (również kodujących dehydryny) determinując odpowiedź na stres (Xu i Zhu 2020). Stąd nadekspresja genów adnotowanych do ABA nie była zaskoczeniem. Jednakże niezbędne jest utrzymanie pewnego balansu poziomu ABA przez roślinę, gdyż jego nadmiar może wywołać niekorzystny efekt dla rośliny (Wang i in. 2018). Prawdopodobnie w liściach flagowych jęczmienia (głównie w grupie S) dochodziło do ograniczania percepcji/sygnalizacji ABA w warunkach stresu poprzez obniżoną ekspresję dwóch DEG kodujących białka PYL2 i PYL4 – białka receptorowe dla ABA (Verma i in. 2019). Kolejny proces znacząco indukowany stresem związany był z transportem lipidów, gdzie wszystkie geny przypisane do tego terminu wykazały nadekspresję w warunkach stresów abiotycznych względem kontroli. Wynik ten potwierdza ważną rolę komponentów zaangażowanych w transport lipidów podczas reakcji liścia flagowego na stres. Lipidy są ważnym składnikiem błon biologicznych i wpływają na utrzymanie ich integralności podczas działania czynnika stresu. Ponadto pełnią one funkcje sygnałowe w komórce i mogą wpływać na konformację i aktywność białek oraz metabolitów (Mamode Cassim i in. 2019). Trzy spośród wykrytych DEG kodowały białko LTP2, które posiada zdolność wiązania liniowych lipidów jak i steroli. Co ciekawe do tej pory twierdzono, że ekspresja tych genów zachodzi wyłącznie w warstwie aleuronowej u jęczmienia. Uzyskane wyniki wskazują, że ich ekspresja indukowana stresem zachodzi również w częściach zielonych rośliny. Niewykluczone, że w trakcie stresu następuje zwiększone zapotrzebowanie na białko LTP2 w rozwijającym się kłosie (we wczesnym stadium rozwoju), a liść flagowy, który zaopatruje kłos w różne związki, odpowiada za dostarczenie tego białka do kłosa.

Dodatkowo w oparciu o analizę nadreprezentacji terminów GO wyodrębniono DEG związane z reakcją na stres cieplny oraz z rozwojem liścia. W pierwszym przypadku największą grupę genów o zmienionej regulacji ekspresji pod wpływem stresu stanowiły geny kodujące białka szoku cieplnego (HSP), aczkolwiek ich ekspresja nie była indukowana wysoką temperaturą; prawdopodobnie, stres cieplny był zbyt słabo odczuwalny dla roślin. Obecnie wiadomo, że białka HSP mogą być zaangażowane w odpowiedź na różne stresy, nie tylko czynnik temperaturowy, w tym na stresy biotyczne (Park i Seo 2015). Pośród DEG dotyczących rozwoju liścia zidentyfikowano geny o obniżonej ekspresji (pod wpływem D i HD), które były związane ze zwijaniem blaszki liściowej (*ang*. leaf rolling), tj. *RL9* oraz geny kodujące białko YABBY i cytochrom P450. Zjawisko zwijania się liści jest jednym z symptomów suszy i prowadzi do ograniczenia powierzchni blaszki liściowej, a tym samym do redukcji transpiracji (Kadioglu i in 2012). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na pewne zaburzenia w mechanizmie zwijania się liści flagowych pod wpływem stresu, zwłaszcza tych o najmniejszej blaszce liściowej. Mogło to być jednym z powodów intensywniejszych zmian w regulacji ekspresji genów obserwowanych w grupie S, co omówiono powyżej.

Dane mRNA-seq wykorzystano również do identyfikacji polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) w materiale roślinnym. Pomimo, że stwierdzono pewien związek pomiędzy rozmiarem blaszki liściowej genotypów a polimorfizmem pojedynczych nukleotydów, to nie zaobserwowano, aby miało to istotny wpływ na różnice pod względem ekspresji genów (pomiędzy grupami zdefiniowanymi przez rozmiar liścia flagowego) spowodowane czynnikiem stresu. Dla genów zawierających SNP o efektach typu HIGH (mogących prowadzić do utraty funkcji kodowanego białka, np. przesunięcie ramki odczytu) stwierdzono nadreprezentację terminów GO odnoszących się do ABC transporterów. Badania nad transporterami ABC mogą stanowić kierunek przyszłych prac, ponieważ mechanizmy ich działania nie zostały dotychczas dokładnie poznane w jęczmieniu.

Ocena biometryczna roślin (26 cech) potwierdziła wyniki obserwowane na poziomie transkryptomu, tzn. efekt łączonego stresu na fenotyp był bardziej zbliżony do efektu wywołanego suszą niż stresem cieplnym. Podobnie było w przypadku parametrów fluorescencji chlorofilu (dziewięć parametrów). Stwierdzono również istotny wpływ rozmiaru liścia flagowego na większość analizowanych cech. Przykładowo, rośliny o dużym liściu flagowym (L) miały nieznacznie wyższy plon ziarna z rośliny (g) w warunkach optymalnych a redukcja wartości tej cechy w warunkach D i HD była tym większa im mniejszy rozmiar liścia flagowego. W oparciu o analizy sieci korelacji ważonej (WGCNA) dla danych fenotypowych i transkryptomicznych wyodrębniono trzy geny, których wzmożona ekspresja w D i HD korespondowała z redukcją plonu ziarna z rośliny (niezależnie od rozmiaru liścia flagowego).

Kolejnym elementem charakterystyki zmian zachodzących w liściu flagowym jęczmienia jarego w warunkach stresów abiotycznych było profilowanie białek (analiza niecelowana) o zróżnicowanej akumulacji (DEP) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (HPLC/MS) (**publikacja P5**). Zidentyfikowano 413 DEP, które były specyficzne lub wspólne dla: (i) rozmiaru liścia flagowego, (ii) wariantów stresu abiotycznego, (iii) punktów czasowych, a następnie wykonano ich analizę funkcjonalną w oparciu o nadreprezentację terminów GO, analogicznie jak w poprzedniej publikacji P4. Analiza danych proteomicznych potwierdziła w dużej mierze ogólne zależności obserwowane

dla transkryptomu, przy czym większość białek wykazała wzrost akumulacji w warunkach stresu (względem kontroli). Ponad połowę DEP wykrytych we wczesnym stresie (T1) obserwowano również podczas wydłużonego stresu (T2). Analiza funkcjonalna wykazała, że białka te były związane m.in z translacją, co wydaje się uzasadnione, gdyż wzmożona synteza białek np. o funkcjach ochronnych jest fundamentalna w przystosowaniu rośliny do niekorzystnych warunków (Ghatak i in. 2017).

Podobnie jak w przypadku transkryptomu zmiany w akumulacji białek, w ujęciu globalnym, wywołane podwójnym stresem były bardziej podobne do zmian indukowanych suszą niż stresem cieplnym. Wynik ten potwierdza poprzedni wniosek o występowaniu strategii dominacji efektów suszy podczas stresu HD w badanych liściach flagowych, jednakże dla sporej części białek obserwowano również zmiany akumulacji specyficzne dla każdego z wariantów stresu. Analiza funkcjonalna wykazała, że unikatowa reakcja proteomiczna roślin wywołana podwójnym stresem była szczególnie związana (nadreprezentacja terminów) z białkami, które biorą udział w składaniu (*ang*. splicing) RNA. Z kolei dla białek, które charakteryzowały się zróżnicowaną akumulacją niezależnie od wariantu stresu nie stwierdzono nadreprezentacji żadnego terminu GO. Sugeruje to, że uniwersalna odpowiedź na stres nie była szczególnie związana z konkretną funkcją białek, lecz obejmowała szeroki zakres białek o różnorodnych funkcjach. Niemniej jednak wśród nich wykryto dehydryny (np. białko o identyfikatorze F2DH00), co potwierdza wnioskowanie na podstawie profilowania ekspresji genów i wskazuje, że dehydryny mogą stanowić użyteczne biomarkery odporności zbóż na różne stresy abiotyczne.

Wykazano, że reakcja wywołana stresem na poziomie proteomu zależała od rozmiaru liścia flagowego, a największe różnice w akumulacji białek obserwowano między grupami o największym i najmniejszym liściu flagowym. Dotyczyło to m.in. białek rybosomalnych oraz związanych z aparatem fotosyntetycznym; na poziome transkryptomu również stwierdzono dużą odrębność profili ekspresji genów związanych z fotosyntezą pomiędzy grupą S i L. Uwagę zwraca fakt, że w grupie L stwierdzono negatywny wpływ stresu na akumulację białek związanych z fotosystemem PS II, a w grupie S z fotosystemem PS I. Warto zauważyć, że w grupie S wykazano poprzednio wzmożoną ekspresję genu kodującego białko z kompleksu OEC (komponent PS II) w warunkach stresu, jednakże potencjalna zależność między nadekspresją tego genu a brakiem zaburzeń w akumulacji białek fotosystemu PS II w liściach flagowych S w warunkach stresowych wymaga potwierdzenia w toku dalszych badań. Na podstawie analizy różnicowej wykryto w liściach z grupy L dwa DEP związane z transferazą glutationową, które wykazały zwiększoną akumulację w niekorzystnych warunkach; w jednym przypadku wzrost poziomu białka wystąpił we wszystkich wariantach stresu. Rezultat ten może wskazywać na efektywniejszą detoksykację i redukcję wolnych rodników w liściach z grupy L w odpowiedzi na stres oksydacyjny poprzez glutation.

Stosując podobne podejście jak w przypadku analizy DEG (w publikacji P4), w oparciu o rozkład brzegowy dla DEP o wzmożonej i zredukowanej akumulacji (356:794) wykrytych w całym doświadczeniu przeanalizowano funkcje białek (w oparciu o terminy GO), których ilość była szczególnie zwiększona lub zmniejszona pod wpływem zastosowanych stresów. Dowiedziono, że czynnik stresowy w największym stopniu determinował zmiany w akumulacji białek związanych z odpowiedzią na bodziec (*ang*. response to stimulus, np. dehydryny) oraz białek transportowych (np. akwaporyny).

Ponadto, aby lepiej zrozumieć rolę białek o niepotwierdzonych jak dotąd funkcjach u jęczmienia czyli takich, które nie zostały opisane w bazach danych, wykorzystano adnotacje Pfam zawierające informacje na temat powiązań między domenami/rodzinami białek. Przyporządkowanie identyfikatorów Pfam do części wykrytych DEP (178 białek) umożliwiło identyfikację funkcji kilku niescharakteryzowanych białek, które mogą pośredniczyć w odpowiedzi na stres abiotyczny. Wyodrębniono trzy nieznane białka, które posiadły domenę EF-hand obecną w białkach sygnałowych, i która odpowiada za wiązanie jonów wapnia (Lakowski i in. 2007). Na tej podstawie zasugerowano, że wspomniane trzy nieznane białka o zróżnicowanej akumulacji pod wpływem stresu mogą pełnić funkcję kalomduliny zwłaszcza, że żadna znana u jęczmienia kalmodulina nie wykazała zróżnicowanej akumulacji w naszych badaniach. Na podstawie analizy różnicowej wnioskowano, że transmisja sygnału stresu za pośrednictwem jonów wapnia przez jedno z wspomnianych powyżej białek zachodziła w liściach flagowych z grupy L wcześniej niż w pozostałych grupach. W ten sam sposób zidentyfikowano kilka niescharakteryzowanych białek indukowanych stresem jako białka szoku cieplnego HSP, czy białka rybosomalne. Dodatkowo w oparciu o adnotacje Pfam potwierdzono, że białko SGT1, zawiera strukturalny motyw TPR (*ang*. tetratricopeptide repeat) i to prawdopodobnie za jego pomocą może uczestniczyć w tworzeniu kompleksów wielobiałkowych, jak na przykład kompleksu związanego z procesem ubikwitynacji (Thompson i in. 2021).

W drugiej części pracy podjęto próbę integracji danych transkryptomicznych oraz proteomicznych uzyskanych z jednego doświadczenia za pomocą niezależnych od siebie metod. Ogółem do 1073 białek o znanych identyfikatorach udało się przyporządkować (poprzez identyfikatory Uniprot TrEMBL) identyfikatory genów, a wśród nich 306 białek wykazało zróżnicowaną akumulację w co najmniej jednym analizowanym kontraście. Następnie wśród tych 306 DEP stwierdzono 50 przypadków, gdzie oprócz ilości białka zmianie ulegała również ekspresja powiązanego genu. W ich obrębie 14 par gen-białko (prawdopodobnie gen kodujący przyporządkowane białko) wykazało jednakowy kierunek regulacji w tym samym kontraście; głównie obserwowano zwiększenie ich poziomu w odpowiedzi na suszę i podwójny stres. Doniesienia literaturowe wskazują, że trudno wnioskować o kierunku zmian w obrębie proteomu na podstawie danych sekwencjonowania mRNA, choćby ze względu na modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne. Jednakże zbieżna reakcja transkryptu i odpowiadającego mu białka uchwycona w tym samym czasie pomiaru może wskazywać, że roślina potrzebowała ciągłej (podczas ekspozycji na stres), a nie okazjonalnej ekspresji danego genu, aby wytworzyć funkcjonalne białko podczas stresu. Stąd uznano, że zidentyfikowane pary gen-białko związane były z szybką, bezpośrednią reakcją na stres, a nie uwikłaną w skomplikowane kaskady regulacyjne. Tym samym wybrane pary gen-białko reprezentują potencjalnie cenną pulę kandydatów w ulepszaniu odporności jęczmienia na stresy abiotyczne. Analiza adnotacji wykazała, że ta podstawowa odpowiedź na stres odbywała się poprzez dehydryny, białko z rodziny PR10 (*ang*. pathogenesis-related protein) zawierające domenę Bet_v_1, dehydrogenazę mrówczanową – wszystkie o potwierdzonej funkcji w reakcji na stres u innych gatunków modelowych. Ponadto wśród wspomnianych par gen-białko wykryto białko (A0A287LIR7) zawierające domenę BURP, które kodowane było przez gen HORVU3Hr1G069650 będący ortologiem genu *RD22 u Arabidopsis.* Obecnie uważa się, że domena BURP pośredniczy w szlakach sygnałowych kwasu abscysynowego

(ABA) i kwasu salicylowego (SA), które są kluczowymi fitohormonami zaangażowanymi w reakcję rośliny na stres (Sun i in. 2019; Li i in. 2021). W dalszej perspektywie wynik ten może stanowić punkt wyjścia do nowych badań nad rozszyfrowaniem roli tej domeny w szlakach sygnałowych związanych z odpowiedzią jęczmienia na czynniki stresowe, gdyż jak dotąd niewiele wiadomo na ten temat u zbóż.

W kolejnym etapie, aby dokładniej poznać jakie sieci regulacyjne mogą warunkować odpowiedź w liściu flagowym jęczmienia na suszę i stres cieplny, zbadano korelacje między zmianami w ekspresji genów i w akumulacji białek wywołanymi zastosowanymi stresami. Największą liczbę istotnych korelacji zidentyfikowano dla inhibitora proteinazy z rodziny Bowman-Birk (BBI). Białko to wykazało zwiększoną akumulację w większości analizowanych kontrastów i dlatego może stanowić skuteczny biomarker odporności jęczmienia na różne stresy środowiskowe. Początkowo uważano, że BBI pełni funkcję ochronną przed patogennymi infekcjami poprzez hamowanie egzogennych proteaz, ale w ostatnich latach zasugerowano również, że białko to może łagodzić skutki spowodowane stresem oksydacyjnym (Malefo i in. 2020). Wykryto związek między zwiększoną akumulacją białka F2D3S4 indukowanego kwasem abscysynowym a ekspresją genu kodującego cytochrom P450 oraz genu kodującego czynnik transkrypcyjny SANT/Myb. Taka korelacja wydaje się uzasadniona, gdyż ABA wpływa na zamykanie aparatów szparkowych podczas stresu co może ograniczać fotosyntezę, a wspomniane geny pośredniczą w procesie fotosyntezy (Waters i in. 2009; Sah i in. 2016; Mellor i in. 2019). Ponadto wykryto związek dehydryny z genami kodującymi białka o domenach zawierających powtórzenia ankirynowe, co może wskazywać, że w odpowiedzi na stres dehydryny pełnią swoją funkcje ochronną oddziałując z innymi białkami właśnie poprzez tą domenę, gdyż potwierdzono udział tego motywu w interakcji białko-białko jak i sygnalizacji między komórkami (Li i in. 2006). Na podstawie analizy sieci korelacji wykazano istotny związek między zmianą akumulacji glutaredoksyny a zmianą ekspresji genu kodującego taumatynę (białko z rodziny PR5, *ang*. pathogenesis-related protein). Dane literaturowe wskazują, że akumulacja białek z tej rodziny wzrasta podczas reakcji obronnej, w której pośredniczy kwas salicylowy. Hormon ten może wpływać na regulację sygnałów redoks związanych z procesami adaptacyjnymi rośliny do niekorzystnych warunków otoczenia m.in. poprzez indukowanie genów związanych z glutaredosyną. Na tej podstawie można wnioskować, że w toku niniejszych badań wyodrębniono ważne elementy regulacyjne odpowiedzi na stres oksydacyjny, w której pośredniczy kwas salicylowy.

Podsumowując, przeprowadzone badania dostarczyły nowej wiedzy o molekularnej reakcji zachodzącej u jęczmienia pod wpływem stresów abiotycznych poprzez określenie, po raz pierwszy w liściu flagowym, całościowych profili ekspresji genów i akumulacji białek w warunkach suszy i stresu cieplnego. Wyznaczono geny/białka o zróżnicowanej ekspresji/akumulacji, które były wspólne oraz specyficzne dla genotypów jęczmienia o różnym rozmiarze liścia flagowego, dla wariantów stresu abiotycznego oraz dla punktów czasowych, tj. wczesnej i później reakcji na stres. W oparciu o adnotacje funkcjonalne rozpoznano funkcje biologiczne tych genów i białek. Wśród nich wyodrębniono takie, które były związane z odpornością na suszę i wysoką temperaturę, w tym takie, które warunkowały odpowiedź zarówno w stresie pojedynczym jak i łączonym, np. dehydryny. W ten sposób poznano molekularne podstawy zmian zachodzących w liściu flagowym jęczmienia w zależności od

jego morfologii jak i od czynnika stresowego. Ponadto określono funkcje kilku białek dotychczas niescharakteryzowanych u jęczmienia, które mogą pośredniczyć w odpowiedzi na stres abiotyczny. Oryginalnym podejściem była także integracja cało-genomowych danych transkryptomicznych i proteomicznych, która umożliwiła zidentyfikowanie genów i odpowiadających im białek o zbieżnym kierunku regulacji podczas stresu abiotycznego, a tym samym warunkujących szybką i efektywną reakcję na stres. Dzięki integracji tych danych wykryto też ważne komponenty szlaków regulujących odpowiedź na stres oksydacyjny.

C. Określenie zmian w profilu akumulacji lipidów zachodzących w liściach jęczmienia pod wpływem stresów abiotycznych

Prowadzone przeze mnie badania wskazywały na związek między kształtowaniem plonu a genami metabolizmu lipidów. Lipidy obecne są we wszystkich tkankach roślinnych i pełnią wiele funkcji, w tym funkcje sygnałowe w odpowiedzi na czynniki stresowe (Mamode Cassim i in. 2019). Z danych literaturowych wynika, że ilościowo-jakościowe oznaczanie lipidów w ziarnie jęczmienia było szeroko badane, natomiast profilowanie lipidomu w liściach prowadzone było jak dotąd w bardzo ograniczonym zakresie, zwłaszcza w kontekście zmian wywołanych wielorakim stresem abiotycznym. W związku z tym podjąłem badania nad charakterystyką zmian lipidowych w liściu jęczmienia jarego wywołanych działaniem suszy, szoku cieplnego i zasolenia oraz kombinacji tych stresów (**publikacja P6)**. Materiał roślinny stanowiły dwie linie homozygotyczne MCam wybrane na podstawie wcześniejszych badań własnych (MCam053 i MCam071) oraz ich formy rodzicielskie Maresi i CamB1 (opisane powyżej). Ponadto wykorzystano cztery genotypy o polimorfizmie genu *ns-LTP2* pochodzące z kolekcji Zespołu Fenomiki Zbóż IGR PAN: MPS37 (wzniosły pokrój wzrostu w stadium młodocianym, allel *ns-LTP2.a*) i MPS106 (płożący pokrój wzrostu związany z locus *sdw1*, allel *ns-LTP2.b*), a także dwie linie uzyskane z ich krzyżowania wstecznego MPW14/19 (*ns-LTP2.a*) i MPW15/14 (*ns-LTP2.b*). Charakterystykę otrzymywania tego materiału przedstawiłem w pracy Mikołajczak i in. (2016b) (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 20). Doświadczenie prowadzono w pełni kontrolowanych warunkach, a poszczególne warianty stresu aplikowano na początku krzewienia (21 w skali BBCH) przez 14 dni. Stres stosowano pojedynczo oraz we wszystkich możliwych kombinacjach co dało siedem różnych wariantów, a równolegle prowadzono doświadczenie w warunkach optymalnych. Liście do analiz lipidomicznych zbierano w ostatnim dniu stresu. Analiza obejmowała główne klasy lipidów, przy użyciu GC/FID, tj. wolne kwasy tłuszczowe (FFA), wolne sterole (STE) jak i zestryfikowane sterole (E-STE), monoacyloglicerole (MAG), diacyloglicerole (DAG) oraz triacyloglicerole (TAG). Szczegółowej analizie celowanej, przy użyciu Fast-GC/MS, poddano również profil akumulacji różnych steroli, gdzie oceniano poziom β-sitosterolu, kampesterolu, stigmasterolu, sitostanolu, Δ5-awenasterolu oraz kampestanolu. Analizując średni efekt poszczególnych traktowań na zmiany akumulacji głównych klas lipidów (zbiorczo dla wszystkich genotypów), istotne zmiany obserwowano jedynie dla DAG w warunkach zasolenia. Z drugiej strony ocena profili lipidów dla poszczególnych genotypów wykazała liczne, istotne różnice w zmiennych warunkach środowiska. Przykładowo linia syryjska CamB1 odznaczała się największym poziomem TAG pośród badanych genotypów w odpowiedzi na łączony stres suszy i cieplny. Dowiedziono także, że poziom akumulacji

wolnych kwasów tłuszczowych w warunkach stresu znacząco różnił się pomiędzy genotypami o polimorfizmie pod względem genu *ns-LTP2*, zatem allelo-specyficzny wzór ekspresji tego genu mógł wpływać na lipidom. Jednoczesne działanie suszy i zasolenia powodowało największy przyrost FFA w MPS37 (*ns-LTP2.a)* w przeciwieństwie do linii MPW15/4, która genetycznie była najbardziej podobna do MPS37, ale posiadała allel *ns-LTP2.b,* i dla której odnotowano najniższy poziom FFA, podobnie jak w MPS106 (*ns-LTP2.b*). Wynik ten może wskazywać na pewien pośredni wpływ białka LTP2 na odpowiedź jęczmienia na stres abiotyczny, na przykład poprzez transport kwasów tłuszczowych. Jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań nad aktywnością genu i białka LTP2, a poprzednie nasze badania wykazały, że ekspresja genu *LTP2* może pod wpływem silnego stresu zachodzić również w liściu flagowym (publikacja P4).

Na podstawie oceny głównych klas lipidów nie obserwowano istotnych zmian w akumulacji steroli i ich form estryfikowanych w warunkach stresu, jednakże analiza celowana GC/MS wykazała istotny wpływ traktowań na poszczególne sterole. Generalnie stwierdzono, że susza i stres cieplny występujące jednocześnie wywierały największy wpływ na zawartość steroli w liściach badanych genotypów, zwłaszcza w przypadku kampesterolu i β-sitosterolu. Sterole są ważnym składnikiem błon biologicznych i wpływają na ich funkcjonowanie. Wzrost zawartości steroli w liściach w niekorzystnych warunkach może wynikać z próby ograniczenia dehydratacji przez roślinę, ponieważ zwiększona akumulacja steroli może prowadzić do zmniejszenia przepuszczalności błon komórkowych i ograniczenia transpiracji (Hussain i in. 2018). Na podstawie badań u roślin modelowych uważa się, że kampesterol wpływa na wzrost komórek i utrzymanie ciągłości błon komórkowych u roślin rosnących w warunkach stresu abiotycznego (Schaller 2004). Z kolei β-sitosterol pośredniczy w syntezie celulozy i w tworzeniu mikrodomen białkowych, które pozytywnie wpływają na stabilność struktur błonowych i tym samym na aktywność kanałów jonowych (Grosjean i in. 2015). Niewykluczone, że taki mechanizm funkcjonował efektywnie w linii MCam053, która w porównaniu do badanych genotypów charakteryzowała się wysoką wrodzoną (tzn. w warunkach optymalnych) zawartością większości analizowanych grup lipidów oraz frakcji steroli. Ponadto linia ta wykazała największy wzrost akumulacji kampesterolu i β-sitosterolu pod wpływem wszystkich stresów abiotycznych działających jednocześnie na roślinę. Może to sugerować, że lepsza odporność tego genotypu na zmieniające się warunki środowiskowe obserwowana w naszych poprzednich badaniach może być związana z profilem lipidomicznym tej linii. Z kolei linia CamB1 pochodząca z Syrii wyróżniała się największym wzrostem akumulacji stigmasterolu w odpowiedzi na łączony stres cieplny i suszę, co może być jednym z czynników warunkujących przystosowanie tego genotypu do suchego i ciepłego klimatu, ponieważ stigmasterol wykazuje zdolność do stymulowania aktywności pompy H^+ i uczestniczy w sygnalizacji komórkowej w warunkach stresowych (Dalal i in. 2016). Warto zauważyć, że w kontekście całego badanego lipidomu (na podstawie grupowania hierarchicznego) profil obserwowany u CamB1 w kontroli nie różnił się znacząco od profilu obserwowanego w warunkach łączonej suszy i wysokiej temperatury. Stąd tym bardziej pojedyncza zmiana w obrębie akumulacji stigmasterolu mogła mieć duże znaczenie dla odporności linii syryjskiej.

Grupowanie hierarchiczne badanych genotypów ze względu na profil całego lipidomu (główne klasy lipidów oraz analizowane frakcje steroli) analizowany w poszczególnych

warunkach traktowania dowiodło, że różne czynniki stresowe aplikowane jednocześnie wywołują w dużej mierze odmienną reakcję rośliny na poziomie lipidomu niż gdy każdy z czynników występuje osobno; choć wyglądało to w różny sposób dla badanych genotypów. Przykładowo profil akumulacji lipidów u linii MCam053 i MCam071 w warunkach trzyczynnikowego stresu znacząco różnił się od profili obserwowanych, gdy stresy te występowały pojedynczo. Z kolei u MPS37 reakcja lipidomiczna na zasolenie oraz wariant trzyczynnikowego stresu była zbliżona i zdecydowanie odmienna od reakcji na pozostałe traktowania. W przypadku MPS106 profile akumulacji lipidów w warunkach pojedynczych stresów były zbliżone, ale różniły się od profili obserwowanych podczas stresu cieplnego i suszy oraz solnego i suszy występujących jednocześnie.

Podsumowując, po raz pierwszy opisano szczegółowe profile akumulacji lipidów, w tym steroli, w liściach jęczmienia w różnych warunkach stresów abiotycznych odziałujaych razem i osobno na roślinę. Uzyskane wyniki wskazują, że stres abiotyczny wywołuje istotne zmiany w obrębie lipidomu w liściach jęczmienia jarego, a reakcja ta na różne czynniki stresowe występujące jednocześnie jest w dużej mierze odmienna niż na każdy czynnik działający osobno. Podłoże genetyczne również ma istotny wpływ na profil akumulacji lipidów oraz steroli. Stwierdzono, że wzmożona synteza steroli w liściach, głównie β-sitosterolu, kampesterolu i stigmasterolu, może determinować zwiększoną odporność jęczmienia na stresy abiotyczne. Przeprowadzone badania mogą wskazywać, że określanie profilu akumulacji steroli może stanowić efektywny wskaźnik zwiększonej odporności rośliny na stresy środowiskowe co może być użyteczne w opracowaniu nowych, ulepszonych odmian. Ponadto uzyskane wyniki mogą sugerować, że gen/białko LTP2 pośredniczy w akumulacji wolnych kwasów tłuszczowych i tym samym wpływa na odpowiedź jęczmienia na stres abiotyczny, jednakże potwierdzenie tego wymaga dalszych badań.

D. Charakterystyka zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu cieplnego w węźle krzewienia roślin jęczmienia jarego o polimorfizmie genu *sdw1*

Półkarłowość *sdw1* jest cechą recesywną, a jej występowanie wiąże się nie tylko ze zmniejszoną wysokością roślin, ale również ze zmianami wielu cech na poziomie fenotypowym (Kuczyńska i in. 2013). Ma to swoje uzasadnienie genetyczne co wykazały moje poprzednie badania (publikacje P1, P2) wskazujące na kolokalizację loci cech ilościowych w miejscu chromosomu 3H, w którym położony jest *sdw1*. Uważa się, że genem kandydującym dla locus *sdw1* jest *HvGA20ox2* zaangażowany w biosyntezę giberelin (Jia i in. 2009). Rośliny półkarłowe *sdw1* wykazują zredukowaną ekspresję tego genu (Jia i in. 2009), a także charakteryzują się płożącym pokrojem wzrostu w stadium młodocianym, co może stanowić morfologiczny marker tego genu (Kuczyńska i Wyka 2011). Wielofunkcyjność giberelin była przedmiotem licznych badań u wielu gatunków roślin. Jednakże ich rola na wczesnym etapie rozwoju roślin jęczmienia, to jest podczas kształtowania się węzła krzewienia nie została poznana. Węzeł krzewienia odpowiada za regulację rozgałęziania pędów, jest magazynem składników pokarmowych dla rozwijających się pędów. Ponadto odpowiada on za regenerację korzeni i pędów po ekspozycji na stres, dlatego zdolność rośliny do przetrwania stresu zależy w dużej mierze od żywotności tkanek węzła krzewienia (Vítámvás i in 2015). Pomimo swojego znaczenia węzeł krzewienia jest znacznie rzadziej przedmiotem zainteresowania ze strony

badaczy w porównaniu do innych części rośliny. W związku z tym podjąłem badania mające na celu poznanie zmian w obrębie transkryptomu w węzłach krzewienia u roślin jęczmienia, a ciekawym obiektem do tych badań wydały się genotypy wykazujące zaburzenia w funkcjonowaniu giberelin. Stąd materiał roślinny do badań stanowiła odmiana Bowman (genotyp referencyjny o normalnym typie wzrostu) oraz jej dwie linie blisko-izogeniczne (NIL) o różnej mutacji w obrębie *sdw1*: BW827 (*sdw1.a*) i BW828 (*sdw1.d*). Badania miały także na celu poznanie czy mutacja w *sdw1* wpływa na zmiany na poziome transkryptomu zachodzące pod wpływem stresu cieplnego. Warunki stresowe aplikowano od momentu wysiewu do końca krzewienia. Węzły krzewienia zbierano do analiz w warunkach kontrolnych i stresu cieplnego, w dwóch punktach czasowych w odstępie 10-dniowym, zaczynając od momentu, gdy wykształcił się węzeł krzewienia.

Sekwencjonowanie metodą Sangera potwierdziło opisaną w literaturze częściową delecję w eksonie *sdw1.d* oraz całkowitą delecję w przypadku mutacji *sdw1.a.* Jednakże w oparciu o analizę polimorfizmu genetycznego SNP oraz o profile ekspresji genów stwierdzono, że delecja genu *sdw1.a* u BW827 obejmowała znacznie większy region niż sądzono do tej pory, ok. 500 Mpz (region 3H:634071757-634626826), zawierający kilkanaście innych genów o potencjalnym znaczeniu dla ważnych procesów biologicznych (np. geny związane z regulacją transkrypcji lub metylacją). Głębokie genotypowanie przy użyciu różnych metod (analiza polimorfizmu SNP w sekwencjach mRNA, genotypowanie przez sekwencjonowanie GBS, wykorzystanie macierzy SNP 50k Illumina Infinium iSelect) pozwoliło na znacznie dokładniejszy niż dotychczas dostępny opis różnic genomów odmiany Bowman i linii blisko-izogenicznych BW827 i BW828. Dowiedziono, że linie te były genetycznie znacznie bardziej odległe od odmiany referencyjnej Bowman niż przypuszczano; BW828 bardziej odległy niż BW827. W związku z tym, aby ograniczyć wpływ introgresji na wyniki analizy ekspresji genów z listy transkryptów uzyskanej z RNA-seq usunięto geny polimorficzne z wyjątkiem tych, które były położone we wspominanym regionie *sdw1*.

Zidentyfikowano geny różniące się ekspresją między genotypami, warunkami temperaturowymi i momentem obserwacji (DEG) oraz geny o odmiennej reakcji na stres cieplny w różnych genotypach lub różnych punktach czasowych (DRG). Największe zmiany w profilach ekspresji genów pod wpływem czynnika stresu obserwowano w węźle krzewienia odmiany Bowman. Linia BW827 okazała się bliższa odmianie referencyjnej niż BW828 pod względem transkryptomicznej odpowiedzi na podwyższoną temperaturę. Analiza wzbogacenia terminów GO dla wykrytych DEG i DRG wykazała różnice pomiędzy liniami blisko-izogenicznymi w funkcjach genów indukowanych stresem. U BW827 stres cieplny szczególnie indukował zmiany w ekspresji genów związanych z replikacją DNA oraz proteolizą. Z kolei w węźle krzewienia u BW828 odpowiedź na stres była głównie związana ze zmianą ekspresji genów odnoszących się do procesów oksydacji i redukcji. Dodatkowo wśród puli genów, które wykazały zróżnicowaną ekspresję w porównaniu między genotypami, termin związany z procesami oksydacji i redukcji był również nadreprezentowany co świadczy o tym, że chociaż badane genotypy jęczmienia były genetycznie blisko spokrewnione, ich odpowiedź na poziomie transkryptomu na stres oksydacyjny była różna. Z drugiej strony nadreprezentacja terminu GO dotyczącego wiązania tetrapirolu u obu linii NILs i jej brak dla Bowmana może sugerować, że detoksykacja reaktywnych form tlenu za pośrednictwem tetrapiroli była specyficzna dla obu mutantów *sdw1*. Niespodziewanie u linii BW827 stwierdzono silny wpływ

stresu cieplnego na ekspresję genów o adnotacji dotyczącej fotosyntezy. Węzeł krzewienia jest nieaktywny fotosyntetycznie stąd można założyć, że niektóre geny wpływające na fotosyntezę mogą również uczestniczyć w przeciwdziałaniu niekorzystnym skutkom stresu cieplnego. Podobne sugestie można znaleźć w literaturze, ale w odniesieniu do stresu niskiej temperatury (Skinner 2009; Janská i in. 2011).

W pracy szczegółowo przeanalizowano profile ekspresji genów zaangażowanych w szlaki biosyntezy i transdukcji sygnału giberelin. Stwierdzono, że w większości przypadków stres cieplny ograniczał ekspresję tych genów w porównaniu do ekspresji w warunkach optymalnych. Przykładowo w odpowiedzi na działanie podwyższonej temperatury zaobserwowano obniżoną ekspresję genu HORVU1Hr1G086810 kodującego oksydazę GA2, czyli enzym odpowiedzialny za dezaktywację gibereliny. Wykazano, że stres cieplny nie wpływał istotnie na regulację ekspresji genu *HvGA20ox2* (HORVU3Hr1G090980) związanego z locus *sdw1* zarówno u Bowmana jaki i linii BW828 (u BW827 była całkowita delecja tego genu). Warty podkreślenia jest fakt, że zidentyfikowano nowy paralog genu *HvGA20ox*2, którego ekspresja była wyższa u linii BW828 (czyli z częściową delecją w *sdw1*) w porównaniu z odmianą referencyjną i linią BW827 w warunkach optymalnych oraz stresu cieplnego w pierwszym momencie zbioru. Może to świadczyć o częściowym przejęciu roli zmutowanego genu *sdw1* przez jego paralog podczas biosyntezy gibereliny na wczesnym etapie rozwoju rośliny. W oparciu o badania prowadzone u ryżu i zjawisko syntenii genomów ryżu i jęczmienia (Pearce i in. 2015) można zasugerować, że powyższy paralog to *HvGA20ox4* (HORVU1Hr1G063780).

W kolejnym etapie szczegółowo przeanalizowano zmiany ekspresji genów, których adnotacja wskazywała na ich zaangażowanie w reakcję na podwyższoną temperaturę. Stres cieplny w większym stopniu wpływał na zmianę ekspresji powyższych genów u Bowmana i linii BW827 niż u BW828. Największą grupę stanowiły geny kodujące białka szoku cieplnego (np. HSP70) oraz geny kodujące czynnik transkrypcyjny szoku cieplnego (HSF). Wydaje się to uzasadnione, gdyż HSP i HSF oddziałują między sobą regulując wiele procesów związanych z reakcją rośliny na stres środowiskowy, nie tylko termiczny (Mishra i in. 2020). Pośród genów kodujących HSF, które zidentyfikowano u jęczmienia, pięć wykazało zróżnicowaną ekspresję pod wpływem stresu cieplnego w węźle krzewienia, co wykazano po raz pierwszy. Ponadto profile ekspresji tych genów *HvHSF* znacząco różniły się pomiędzy liniami NIL w warunkach stresu.

Na podstawie oceny fenotypowej (22 cechy związane z kłosami/pędami głównym i bocznymi) potwierdzono znane już wcześniej efekty mutacji w locus *sdw1* na fenotyp. Jednakże w odróżnieniu do wyników innych badań wykazano, że redukcja wysokości linii blisko-izogenicznych była spowodowana skróceniem dokłosia, a nie dwóch pierwszych międzywęźli. Nie zaobserwowano opisywanego uprzednio wpływu mutacji *sdw1* na wzrost liczby rozkrzewień. Stres cieplny miał negatywny efekt na większość obserwowanych cech u wszystkich genotypów, jednakże redukcja wysokości rośliny u Bowmana pod wpływem stresu była znacznie większa niż u obu półkarłowych linii NIL. Z drugiej strony działanie podwyższonej temperatury skutkowało zwiększeniem liczby pędów, które jednak często były bezpłodne, co w konsekwencji prowadziło do spadku plonu ziarna. Na podstawie pomiarów parametrów fizjologicznych w liściach badanych genotypów stwierdzono, że linia BW828 wyróżniała się największym wzrostem poziomu pigmentów pod wpływem stresu cieplnego.

Możliwe, że aparat fotosyntetyczny roślin BW828 był chroniony przed podwyższoną temperaturą poprzez zagęszczenie centrów reakcyjnych fotosytemu PS II (RC/CS) podczas stresu; odwrotny wpływ wysokiej temperatury na PS II wykazano dla linii BW827.

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań scharakteryzowano reakcję roślin jęczmienia na podwyższoną temperaturę w aspekcie ich fenotypu oraz pod względem reakcji zachodzących w węźle krzewienia na poziomie molekularnym. Po raz pierwszy, za pomocą sekwencjonowania mRNA, opisano całościowe profile ekspresji genów w węźle krzewienia jęczmienia, który pełni ważną rolę w reakcji rośliny na stresy abiotyczne, gdyż odpowiada za regenerację pędów i korzeni. Przeanalizowano szczegółowo zmiany ekspresji genów zaangażowanych w szlaki biosyntezy i transdukcji sygnału giberelin oraz związanych z reakcją na stres cieplny. Nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genu *HvGA20ox2* w węźle krzewienia pod wpływem stresu niezależnie od genotypu, jednakże zidentyfikowano paralog tego genu, tj. *HvGA20ox4,* o wzmożonej ekspresji w BW828 z częściową delecją w obrębie *sdw1*. Wykazano, że badane linie blisko-izogeniczne były genetycznie znacznie bardziej odległe od odmiany referencyjnej Bowman niż przypuszczano. Dowiedziono, że mimo iż badane linie BW827 i BW828 są genetycznie spokrewnione, reakcja ich transkryptomu w obrębie węzła krzewienia na podwyższoną temperaturę była specyficzna dla genotypu, a różnice wynikały bardziej z różnorodności tła genetycznego niż z mutacji pojedynczego genu, delecji wielu genów lub allelo-specyficznego wzoru ekspresji genu *sdw1*. Najbardziej zróżnicowaną odpowiedź na działanie podwyższonej temperatury między liniami NIL odnotowano dla genów *HvHSF* kodujących czynniki szoku termicznego. Różnice na poziomie molekularnym przedstawiono na tle dokładnej charakterystyki porównawczej linii blisko-izogenicznych i odmiany referencyjnej Bowman pod względem zmian fenotypowych i fizjologicznych zachodzących pod wpływem stresu cieplnego. Dostarczenie nowej wiedzy na temat genotypów z kolekcji linii blisko-izogenicznych utworzonej w oparciu o odmianę Bowman ma duże znaczenie, gdyż kolekcja ta jest ogólnodostępna i często służy do badań nad jęczmieniem prowadzonych przez badaczy na całym świecie.

Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Wyniki przedstawione w cyklu publikacji (P1-P7) stanowiących osiągnięcie naukowe pozwoliły na wielowymiarową charakterystykę reakcji jęczmienia na stresy abiotyczne. Za najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych badań uważam:

- szczegółową charakterystykę zmian w obrębie fenotypu roślin jęczmienia jarego zachodzących w zróżnicowanych warunkach środowiska, obserwowanych zarówno podczas wzrostu jaki i po zbiorze; dowiedziono, że predykcja niektórych komponentów plonu możliwa jest na podstawie obserwacji prowadzonych we wczesnym etapie wzrostu rośliny w warunkach suszy;
- określenie położenia genetycznego loci związanych z potencjałem plonowania w zmiennych warunkach środowiska (naturalnych oraz prowokowanej suszy) i wyznaczenie markerów molekularnych blisko sprzężonych z tymi cechami oraz poznanie funkcji genów położonych w obrębie wybranych loci cech ilościowych;

- wykazanie, że locus *sdw1* może pozytywnie wpływać na kształtowanie komponentów plonu, także w warunkach deficytu wody;
- wykazanie podobieństw i różnic w zmianach profili ekspresji genów w warunkach suszy, stresu cieplnego i ich jednoczesnego odziaływania na liść flagowy jęczmienia i wytypowanie genów, które mogą determinować odporność roślin na stres abiotyczny;
- wykazanie podobieństw i różnic w zmianach profili akumulacji białek w warunkach suszy, stresu cieplnego i ich jednoczesnego odziaływania na liść flagowy jęczmienia i wytypowanie białek, które mogą determinować odporność roślin na stres abiotyczny;
- wytypowanie genów i odpowiadających im białek o zgodnym kierunku regulacji w odpowiedzi na stres, które mogą pośredniczyć w pierwszej, podstawowej reakcji obronnej na stres abiotyczny;
- scharakteryzowanie profili ekspresji genów w węźle krzewienia roślin jęczmienia o polimorfizmie genu *sdw1* i poznanie zmian ekspresji genów zaangażowanych w szlaki biosyntezy i transdukcji sygnału giberelin oraz związanych z reakcją na stres cieplny;
- scharakteryzowanie na poziomie lipidomu reakcji liści jęczmienia na suszę, zasolenie, stres cieplny występujących osobno oraz jednocześnie w różnych kombinacjach, a także wyodrębnienie tych steroli, które w największym stopniu mogą determinować zwiększoną odporność na stresy abiotyczne.

Uzyskane wyniki znacząco rozszerzają wiedzę na temat molekularnych zmian zachodzących pod wpływem stresów abiotycznych u jęczmienia jarego w częściach roślin rzadko dotychczas badanych, a niezwykle ważnych dla funkcjonowania rośliny w warunkach stresowych, tj. w węźle krzewienia i w liściu flagowym. Kompleksowe badania molekularne w powiązaniu z szczegółową charakterystyką fenotypową przyczyniają się do lepszego zrozumienia obserwowanej zmienności fenotypowej jęczmienia w zróżnicowanych warunkach środowiska. Uzyskanie nowej wiedzy o funkcjach genów i ich efektach fenotypowych, np. locus *sdw1*, może przyczynić się do opracowania nowych markerów funkcjonalnych dla wybranych cech.

Zgromadzona wiedza, wyznaczony zbiór transkryptów jęczmienia, białek z przyporządkowanymi identyfikatorami genów czy też scharakteryzowane profile lipidów i steroli będą mogły stanowić odniesienie dla innych badaczy dyscypliny naukowej determinując jej rozwój. Jęczmień coraz częściej określany jest mianem rośliny modelowej wśród zbóż, stąd wiedza zdobyta w toku prowadzonych przeze mnie badań może przyczynić się do lepszego zrozumienia reakcji innych gatunków zbóż na stresy abiotyczne. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują, że rozszyfrowanie mechanizmów warunkujących funkcjonowanie roślin w zmiennym środowisku wymaga poświęcenia większej uwagi badaniom nad wpływem wielorakich czynników stresowych oddziałujących jednocześnie na rośliny. Prace w ramach osiągnięcia naukowego znacznie rozszerzyły skalę zastosowań wysokoprzepustowych technik badawczych (typu mRNA-seq, HPLC/MS, automatyczne fenotypowanie) w prowadzeniu biologicznych badań systemowych roślin użytkowych.

Poza aspektem poznawczym wyniki przedstawione w osiągnięciu naukowym mają również potencjał aplikacyjny począwszy od predykcji plonowania na podstawie specjalistycznej oceny fenotypowej we wczesnym etapie wzrostu rośliny, poprzez identyfikację markerów molekularnych sprzężonych z interesującą cechą ilościową, które mogą stanowić obiecujące narzędzia wspomagające selekcję tradycyjną. Ponadto wykryte geny związane z odpowiedzią na suszę i stres cieplny oraz zdefiniowane białka i sterole mogą posłużyć w przyszłości jako narzędzia/wskaźniki do ulepszania odporności roślin na stresy środowiskowe. W toku badań wytypowano również genotypy jęczmienia, które mogą być wykorzystane jako źródło korzystnych genów w opracowaniu odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę. Wiedza zgromadzona na podstawie badań stanowiących osiągnięcie naukowe może w przyszłości służyć jako podstawa metod poprawy cech użytkowych zbóż.

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

5.1. Aktywność naukowa w uczelni/instytucji zagranicznej

- Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Molecular Genetics Department, Gatersleben, Niemcy; współpraca naukowa z prof. Thomasem Altmannen, dr Astrid Junker

  W trakcie pobytu (14 tygodni) w tej jednostce wykonywałem prace badawcze nad charakterystyką zmian fenotypowych u jęczmienia jarego pod wpływem suszy z wykorzystaniem infrastruktury do nieinwazyjnego obrazowania roślin.

  Efektem współpracy jest publikacja (**P3**) wchodząca w skład mojego osiągnięcia naukowego: **Mikołajczak K**., Ogrodowicz P., Ćwiek-Kupczyńska H., Weigelt-Fischer K., Mothukuri S.R., Junker A., Altmann T., Krystkowiak K., Adamski T., Surma M., Kuczyńska A., Krajewski P. (2020) Image phenotyping of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) RIL population under drought: selection of traits and biological interpretation. *Frontiers in Plant Science* 11:743. DOI: 10.3389/fpls.2020.00743

- University of Bologna, Department of Agricultural and Food Sciences, Bolonia, Włochy; współpraca naukowa z prof. Marią Teresą Rodriguez-Estrada, prof. Vladimiro Cardenią

  W trakcie pobytu (łącznie 4 miesiące) w tej jednostce zapoznałem się z metodyką ekstrakcji lipidów i steroli z tkanki roślinnej oraz z metodyką jakościowo-ilościowego oznaczania tych związków za pomocą GC/MS i wykonałem te analizy dla próbek jęczmienia poddanych działaniu różnych stresów abiotycznych.

  Efektem współpracy jest publikacja (**P6**) wchodząca w skład mojego osiągnięcia naukowego: Kuczyńska A., Cardenia V., Ogrodowicz P., Kempa M., Rodriguez-Estrada M.T., **Mikołajczak✉ K**. (2019) Effects of multiple abiotic stresses on lipids

and sterols profile in barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 141: 215-224. DOI: doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.033

oraz

manuskrypt Kuczyńska A., Ogrodowicz P., Kempa M., Krajewski P., Cardenia V., Rodriguez-Estrada M., Pérez-Llorca M., Munné-Bosch S., **Mikołajczak✉ K**. Disorders in brassinosteroids signal transduction triggers the profound molecular alterations in the crown tissue of barley under drought; będący w trakcie recenzji w czasopiśmie *BMC Plant Biology*.

- ALSiA-Metapontum Agrobios Research Center, Metaponto, Włochy; współpraca naukowa z dr. Francesco Cellinim, dr. Angelo Petrozzą

  W trakcie pobytu (łącznie 30 tygodni w różnych okresach) w tej jednostce realizowałem badania nad charakterystyką zmian fenotypowych u jęczmienia jarego pod wpływem suszy z wykorzystaniem infrastruktury do nieinwazyjnego obrazowania roślin. Obserwacje obejmowały zarówno część nadziemną jak i system korzeniowy roślin jęczmienia; badano także wpływ melatoniny na rozwój korzeni w warunkach deficytu wody.

  Efektem współpracy zapoczątkowanej w 2019 roku były kolejne wspólne krajowe projekty badawcze (NCN, MRiRW) oraz zagraniczny finansowany przez EPPN2020 (w ramach programu Horyzont 2020). Wstępne rezultaty wynikające ze współpracy przedstawiono na konferencji SEB 2021 Annual Conference w formie posteru „Image-based phenotyping of roots developmental aspects of spring barley RIL population exposed to water scarcity". Uzyskane wyniki będą przedmiotem wspólnych publikacji.

- University of Adelaide, Plant Accelerator Unit, Adelajda, Australia; współpraca naukowa z prof. Bettiną Berger

  W trakcie pobytu (5 tygodni) w tej jednostce realizowałem badania nad charakterystyką zmian fenotypowych u mutantów jęczmienia o zaburzonej biosyntezie/transdukcji sygnału giberelin, brassinosteroidów i strigolaktonów z wykorzystaniem infrastruktury do nieinwazyjnego obrazowania roślin.

  Efektem współpracy nawiązanej w 2019 roku jest nowy projekt badawczy NCN OPUS_21 realizowany pod moim kierunkiem, w którym zaplanowano wspólne doświadczenia oraz pobyt krótkoterminowy wykonawców projektu w tej zagranicznej instytucji. Uzyskane wyniki będą przedmiotem wspólnych publikacji. Wstępne rezultaty wynikające ze współpracy przedstawiono na konferencji SEB 2021 Annual Conference w formie posteru „Development of phenotyping screens to identify dynamics of hormone-depended architectural responses of barley plants to drought".

- Servicio de Cuantificacion de Hormonas del IBMCP, Instituto de Biologia Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politecnica de Valencia, Walencia, Hiszpania; współpraca naukowa z dr Esther Carrera Bergua

  Przedmiotem współpracy w ramach projektu NCN OPUS_18 było oznaczanie różnych fitohormonów roślinnych w korzeniach jęczmienia traktowanych melatoniną w warunkach okresowej suszy przy użyciu UHPLC/MS. Efektem tej współpracy jest nowy projekt badawczy NCN OPUS_21 realizowany pod moim kierunkiem, w którym zaplanowano wspólne badania nad oznaczeniem fitohormonów w liściach jęczmienia oraz trzy pobyty krótkoterminowe wykonawców projektu w tej zagranicznej instytucji. Uzyskane wyniki będą przedmiotem wspólnych publikacji.

- Universitat de Barcelona, Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals Secció de Fisiologia Vegetal, Barcelona, Hiszpania; współpraca naukowa z prof. Sergi Munné-Boschem

  Przedmiotem współpracy w ramach projektu NCN OPUS_12 było ilościowe oznaczanie wybranych brassinosteroidów w węzłach krzewienia jęczmienia jarego w próbkach kontrolnych i poddanych stresowi suszy.

  Efektem współpracy jest manuskrypt Kuczyńska A., Ogrodowicz P., Kempa M., Krajewski P., Cardenia V., Rodriguez-Estrada M., Pérez-Llorca M., Munné-Bosch S., **Mikołajczak✉ K.** Disorders in brassinosteroids signal transduction triggers the profound molecular alterations in the crown tissue of barley under drought; będący w trakcie recenzji w czasopiśmie *BMC Plant Biology*.

  Wstępne wyniki zaprezentowano na IV Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany", Poznań 2019, w formie plakatu "Multilevel characteristics of barley genotypes varied in brassinosteroid signal transduction under optimal and drought conditions".

- Humboldt University in Berlin, Plant Cell and Molecular Biology, Berlin, Niemcy; współpraca naukowa z prof. Kerstin Kaufmann

  Przedmiotem współpracy w ramach projektu NCN HARMONIA_8 była izolacja jąder komórkowych z węzłów krzewienia mutantów *sdw1* jęczmienia oraz badania nad strukturą chromatyny metodą ATAC-seq.

  Efektem współpracy będzie publikacja, która obecnie jest w trakcie przygotowywania. Wyniki wstępne zaprezentowano na konferencji 9th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology (2019) w formie posteru „Genome-wide characterization of polymorphism and gene expression of barley *sdw1* near-isogenic lines".

- National Plant Phenomics Centre, Aberystwyth University, Wielka Brytania; współpraca naukowa z prof. Johnem H. Doonanem

Przedmiotem współpracy w ramach projektu MRiRW HOR hn-801-8/14 zad. 106 było automatyczne fenotypowanie korzeni jęczmienia jarego poprzez analizę obrazu, mające na celu poznanie różnic fenotypowych w całym okresie wegetacji. Efektem współpracy będzie publikacja (w przygotowaniu).

5.2. Aktywność naukowa w innej uczelni/instytucji krajowej

W ramach współpracy krajowej powstały publikacje mojego współautorstwa, które są afiliowane do różnych uczelni/instytucji naukowych:

- Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych

  Efektem współpracy są publikacje: Mikołajczak i in. 2016a, 2017, 2022 (publikacje P1, P2, P7); Ogrodowicz i in. 2017 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 15); Gudyś i in. 2018 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 13); Janiak i in. 2020 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 8).

- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

  Efektem współpracy są publikacje: Piasecka i in. 2020 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 7) Rodziewicz i in. 2019 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 11); Chmielewska i in. 2016 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 19).

- Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej

  Efektem współpracy jest publikacja Wyka i in. 2019 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 12).

- Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

  Efektem współpracy jest publikacja Mikołajczak i in. 2016a (publikacja P1).

- Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

  Efektem współpracy są publikacje: Piasecka i in. 2020 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 7); Surma i in. 2016, 2017 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 21 i 17).

- Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach oraz Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

  Efektem współpracy jest publikacja Surma i in. 2019 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 10).

- Politechnika Bydgoska, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Pracownia Mykologii Molekularnej, Fitopatologii i Entomologi

  Efektem współpracy jest publikacja Wiśniewska i in. 2016 (Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 22).

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

6.1. Działalność dydaktyczna

Prowadzenie zajęć:

- seminaria naukowe dla studentów Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Sulechowie, maj 2012, 2013, 2014, Poznań;
- seminaria naukowe dla studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach cyklu tematycznego „Biologia roślin użytkowych", maj 2014-2023, Poznań.
- ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach cyklu tematycznego „Biologia roślin użytkowych", maj 2014-2018, Poznań.

Promotorstwo i opieka nad studentami:

Funkcja promotora pomocniczego zakończonych przewodów doktorskich (2) oraz opiekuna naukowego (1):

- dr Dorota Jasińska, praca doktorska pt. „Podatność na fuzariozę kłosów a kształtowanie się cech plonotwórczych w populacji mapującej Maresi × CamB1 jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.), stopień doktora nauk rolniczych uzyskany 03.07.2023 roku decyzją Rady Naukowej IGR PAN w Poznaniu;
- dr Michał Kempa, praca doktorska pt. „Wpływ stresów abiotycznych na zmiany metabolomu ze szczególnym uwzględnieniem lipidów u form jęczmienia jarego o zróżnicowanym fenotypie i polimorfizmie genu *ns-LTP2*", stopień doktora nauk rolniczych uzyskany 23.03.2023 roku decyzją Rady Naukowej IGR PAN w Poznaniu;
- Dominika Maryniak, V r. studiów 2. stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, kierunek Biotechnologia, praca magisterska „Profil reakcji jęczmienia jarego na stres abiotyczny i biotyczny działające symultanicznie", planowana obrona pracy magisterskiej - czerwiec 2024 r.

Opieka merytoryczna nad stażystami:

- 2023 - V r. studiów 2. stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, 240 h (Najlepsi z natury 2.0. Zintegrowany Program Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu POWR.03.05.00-00-Z210/18) – 1 osoba;
- 2022 - III r. studiów 2. stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, 336 h (UNIWERSYTET JUTRA – zintegrowany program rozwoju Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu POWR.03.05.00-00-Z303/17) – 3 osoby;
- 2020 - V studiów 2. stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, 360 h (Studiujesz? Praktykuj! Program staży zawodowych dla studentów

Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu POWR.03.01.00-00-S126/17) – 3 osoby;

- 2020 - V r. studiów 2. stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, staż naukowy/wolontariat – 1 osoba;
- 2018 - II r. studiów 2. stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, 504 h (Bądź konkurencyjny na rynku pracy – wysokiej jakości programy stażowe dla studentów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu POWR.03.01.00-00-S145/17) – 5 osób;
- 2017 - III r. studiów 2. stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, 160 h (Studiujesz – praktykuj. Program stażowy dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu UDA-POWR.03.01.00-00-S237/15) – 4 osoby;
- 2010-2013 - Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Sulechowie, miesięczne praktyki studenckie w okresie wakacyjnym – łącznie 16 osób.

6.2. Działalność organizacyjna

- członek komitetu organizacyjnego IV Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany", Poznań, 05-07 listopada 2019;
- członek komitetu organizacyjnego III Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych", Poznań, 5-7 listopada 2014;
- członek komitetu organizacyjnego corocznych Warsztatów Projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania zbóż o zwiększonej odporności na suszę": 11-12.01.2011 (Poznań), 05-06.01.2010 (Poznań);
- organizacja i prowadzenie comiesięcznych, otwartych seminariów naukowych dla pracowników nauki odbywających się w j. angielskim w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (2020 – 2022);
- sekretarz Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (w kadencji 2019-2022);
- członek Komisji ds. Rozwoju Kadry Naukowej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (kadencji 2019-2022) jako przedstawiciel pracowników naukowych zatrudnionych na stanowisku adiunkta i asystenta;
- członek Rady Młodych Pracowników Naukowych IGR PAN (2018 – 2019).

6.3. Działalność popularyzująca naukę

- PAS/CNR Horizon Europe Networking Event, prezentacja Zakładu Fenomiki Zbóż w kontekście potencjalnej współpracy z włoskimi badaczami związanymi z CNR jako podstawa budowy konsorcjów naukowych, które mogłyby się ubiegać o finansowanie w konkursach programu ramowego Horyzont Europa, 17 listopada 2022;

- artykuł na portalu sekcji Rzecz o Innowacjach www.rzeczo.pl „Nie straszny im stres i wysoka temperatura!" (2020);
- wykład „Możliwości fenotypowania roślin w sieci EPPN2020" w ramach seminarium „Nowoczesne metody fenotypowania roślin", SGGW, Warszawa, 15 listopada 2019;
- zajęcia laboratoryjne w ramach Nocy Biologów w latach 2013, 2014, 2015, Poznań;
- współautor instrukcji wdrożonych do praktyki hodowli roślin:

1) „Metody biotechnologiczne otrzymywania form homozygotycznych i mieszańcowych roślin strączkowych" (2020), wdrożona przez: Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.;
2) „Metody biotechnologiczne w hodowli pszenicy – wybrane zagadnienia" (2016), wdrożona przez: Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.;
3) „Otrzymywanie linii DH i SSD jęczmienia jarego" (2013), wdrożona przez: Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o.

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

7.1. Osiągnięcia naukowe niewymienione w pkt. 4

Badania nad funkcjonowaniem jęczmienia jarego w zróżnicowanych warunkach środowiskowa prowadziłem także poza głównym nurtem stanowiącym osiągnięcie naukowe powiązane cyklem publikacji P1-P7. Dotyczyło to badania zmienności linii homozygotycznych jak i odmian rekomendowanych przez spółki hodowli roślin w warunkach kontrolowanych oraz naturalnych. Prace obejmowały ocenę zmian cech agronomicznych (z wykorzystaniem populacji mapującej Lubuski × CamB1; Ogrodowicz i in. 2017 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 15) a także fizjologicznych i biochemicznych w połączeniu z identyfikacją genów kandydackich warunkujących dane QTL o efektach istotnych w warunkach suszy (Gudyś i in. 2018 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 13). W ten sposób wytypowano szereg genów kandydackich kodujących m.in. antyoksydanty, enzymy biosyntezy kwasów karboksylowych, białka szoku cieplnego, sulfurylazy ATP i białka zaangażowane w regulację czasu kwitnienia. Zbadano potencjał plonowania kilkudziesięciu odmian jęczmienia w warunkach polowych oraz kontrolowanej okresowej suszy i wyodrębniono te odmiany, które wykazały wysoki i stabilny plon we wszystkich eksperymentach na przestrzeni trzech lat (Surma i in. 2019 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 10). Ponadto charakterystyka genotypowa tych odmian pozwoliła wyznaczyć markery SNP, które wykryto wcześniej jako powiązane z loci cech ilościowych w populacjach mapujących linii homozygotycznych. Na tej podstawie wybrano kilka markerów, których allele mogą wywierać pozytywny wpływ na cechę (np. masę tysiąca ziaren) u odmian o różnym rodowodzie. Markery te mogą stanowić niezwykle obiecujące narzędzie wspomagające selekcję tradycyjną. Następnie materiał roślinny rozszerzono (o nowe odmiany i rody wybrane przez spółki hodowli roślin) do 150 genotypów i na podstawie obserwacji cech struktury plonu w warunkach naturalnych oraz genotypowania przez sekwencjonowanie (*ang*. GBS) wykonano

mapowanie asocjacyjne (*ang*. GWAS) (Ogrodowicz i in. 2023 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 3). Z uwagi na wciąż ograniczone badania nad rozwojem systemu korzeniowego (w porównaniu do części nadziemnych roślin) nie tylko u jęczmienia, ale i u innych zbóż, obserwacje rozszerzono o biomasę i długość sytemu korzeniowego mierzone destrukcyjnie po zbiorze. Dodatkowo wykonano przyżyciowo pomiary przewodności/pojemności elektrycznej w różnych stadiach rozwoju, aby zweryfikować czy ta metoda może korespondować z biomasą korzenia. Wykryto sprzężenia marker-cecha, a w oparciu o adnotacje funkcjonalne wytypowano potencjalne geny, które mogą determinować daną cechę. Zidentyfikowano cztery regiony genomu w chromosomach 2H, 4H, 5H i 7H, które warunkowały biomasę korzenia po zbiorze. Co więcej, sprzężenie markerów we wspomnianych regionach 2H i 7H z innymi cechami plonotwórczymi i terminem kłoszenia wskazuje, że geny tam zlokalizowane pełnią ważną rolę w kształtowaniu całej rośliny.

Ponadto badania nad mechanizmami odpowiedzi jęczmienia na suszę, w których uczestniczyłem, obejmowały profilowanie proteomu (Rodziewicz i in. 2019 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 12) i metabolomu (Piasecka i in. 2017 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 17) w populacji linii homozygotycznych jęczmienia jarego. Zidentyfikowano liczne białka (w liściach i korzeniach) i metabolity (w liściach), które znacząco zmieniły profil akumulacji w warunkach suszy oraz takie, których profile akumulacji istotnie wahały się pomiędzy testowanymi genotypami. Powiązanie tych wyników z mapą genetyczną (opracowaną w ramach publikacji P1) umożliwiło określenie położenia genetycznego loci związanych z tymi białkami i metabolitami. Niektóre z nich wykazały kolokalizację z QTL dla cech struktury plonu wykryte we wcześniejszych badaniach przy użyciu tego samego materiału roślinnego (publikacje P1 i P2), przykładowo w rejonie chromosomu 3H wokół locus *sdw1* zmapowano QTL dla enzymu amoniakoliaza fenyloalaniny (PAL).

W ramach współpracy z innymi zespołami byłem także zaangażowany w badania nad mechanizmami odpowiedzi jęczmienia na suszę z wykorzystaniem genotypów o różnej podatności na deficyt wody (pochodzących z różnych stref klimatycznych). Badania te obejmowały: (i) charakterystykę zmian w akumulacji białek i metabolitów w liściach i korzeniach (Chmielewska i in. 2016 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 20); (ii) określenie profili akumulacji związków fenolowych o właściwościach antyoksydacyjnych w liściach (Piasecka i in. 2020 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 8); (iii) profilowanie ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, które mogą regulować odpowiedź korzeni na suszę (Janiak i in. 2019 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 9); (iv) scharakteryzowanie zmian anatomicznych w liściach poddanych działaniu suszy (Wyka i in. 2019 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 13). Powyższe badania obejmowały szczegółowe analizy w danym temacie i poszerzyły wiedzę na temat zmian zachodzących na różnych poziomach u jęczmienia pod wpływem suszy. Najważniejsze osiągnięcia płynące z tych prac dotyczą wykazania istotnych różnic pomiędzy genotypami o odmiennej podatności na niedobór wody w profilach akumulacji białek opiekuńczych (*ang*. chaperones), osmoprotektantów i antyoksydantów w tym proliny, kwasu askorbinowego, związków cukrowych. Ponadto ujawniono zmiany w akumulacji białek i metabolitów pod wpływem suszy, które były specyficzne dla korzeni lub dla liści. Wykazano, że zmiany w akumulacji związków fenolowych pod wpływem suszy były zależne nie tylko od genotypu, ale również od stadium rozwojowego rośliny, a stres znacząco wpływał m.in. na akumulację pochodnych luteoliny i na hordatyny. Zidentyfikowano geny o zróżnicowanej ekspresji

w korzeniach po wpływem suszy, które kodowały czynniki transkrypcyjne (TFs) z różnych rodzin, w tym AP2, WRKY, NAC, MYB, bHLH, czy bZIP. Niektóre z nich mogą pośredniczyć w szklakach sygnałowych giberelin i kwasu jasmonowego indukowanych deficytem wody. Porównano wzór ekspresji genów kodujących TFs pomiędzy genotypami o różnej podatności na stres oraz zbadano różnice w ich ekspresji w warunkach umiarkowanego i silnego stresu. Dowiedziono, że susza silnie wpływała na modyfikację cech anatomicznych liści; ich długość i szerokość oraz wymiary struktur wewnętrznych uległy redukcji pod wpływem stresu, podczas gdy gęstość użyłkowania, aparatów szparkowych i trichomów wzrosła.

Ponadto brałem udział w opracowaniu pracy przeglądowej zawierającej zbiór informacji o locus półkarłowatości *sdw1* i jego efektach na poziomie molekularnym i fenotypowym (Kuczyńska i in. 2013 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 26). Pośród licznych genów determinujących obniżenie wysokości roślin jęczmienia tylko kilka znalazło szerokie zastosowanie w programach hodowlanych a *sdw1* jest jednym z najważniejszych w uprawie jęczmienia. Co więcej, poza redukcją wysokości wpływa on na szereg innych cech związanych z plonowaniem, jednakże nie jest jasne czy to wynik plejotropii czy sprzężenia genów. Dlatego kolejne badania, w których uczestniczyłem miały na celu rozwikłanie tego problemu badawczego (Kuczyńska i in. 2014 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 25). Wykorzystano dwie populacje mapujące linii homozygotycznych otrzymanych różnymi metodami, tj. rekombinacyjne linie wsobne (RIL) oraz linie podwojonych haploidów (DH), zatem różniące się liczbą rund *crossing-over*; w procesie otrzymywania RIL istnieje większe prawdopodobieństwo przerwania sprzężeń między genami. W oparciu o porównanie wyników mapowania QTL wokół regionu *sdw1* wykonane dla tych dwóch populacji mapujących stwierdzono, że wpływ locus *sdw1* na wczesność, tj. termin kwitnienia i kłoszenia, to efekt plejotropowy.

Moje zainteresowania naukowe nie ograniczały się jedynie do badań nad reakcją jęczmienia na stresy abiotyczne. Uczestniczyłem w pracach mających na celu scharakteryzowanie populacji linii rekombinacyjnych jęczmienia jarego, badanych uprzednio pod kątem reakcji na suszę, pod względem odporności na fuzariozę kłosów na podstawie wyników doświadczeń polowych z zastosowaniem inokulacji zarodnikami *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. (Ogrodowicz i in. 2020 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 7; Jasińska i in. 2017 – Zał. 4, II, pkt. 4.2, poz. 7 oraz praca doktorska D. Jasińskiej – Zał. 3, pkt. 6.1). Potwierdzono, że stopień porażenia ziarna nie zawsze jest skorelowany ze wzrostem akumulacji deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie; odnotowano liczne przypadki o niewielkim porażeniu, ale o wysokiej zawartości DON i odwrotnie. W oparciu o analizę QTL zidentyfikowano regiony genomu jęczmienia związane z objawami porażenia przez *F. culmorum* (np. liczba i masa ziaren porażonych, indeks fuzariozy kłosów), zawartości mykotoksyny DON w ziarnie i z kształtowaniem się cech plonotwórczych w warunkach naturalnych oraz prowokowanego stresu biotycznego. Na podstawie analizy nadreprezentacji genów zlokalizowanych w obrębie wykrytych QTL stwierdzono, że pirymidyzacja genów związanych głównie z aktywnością oksydoreduktaz, w tym z aktywnością dehydrogenazy NADH/NAD(P)H, może determinować zwiększoną odporność na różne stresy środowiskowe jednocześnie, w tym fuzariozę kłosów i suszę.

Zaangażowany byłem w podobne badania nad odpornością pszenicy na fuzariozę kłosów (Surma i in. 2016 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 22; Wiśniewska i in. 2016 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1,

poz. 23). Poza oceną fenotypową blisko 200 linii homozygotycznych w trzyletnich doświadczeniach przetestowano użyteczność markerów molekularnych, uznawanych za sprzężone z cechami dotyczącymi objawów fuzariozy, pod kątem ich stosowania w selekcji materiałów o zwiększonej odporności na ten stres biotyczny. Ponadto uczestniczyłem w opracowaniu metod selekcji genotypów pszenicy ze względu na obecność wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych *Glu1* z wykorzystaniem allelo-specyficznych markerów molekularnych (Adamski i in. 2014 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 24).

Uczestniczyłem również w pracach zmierzających do skrócenia okresu pozyskiwania linii homozygotycznych grochu i łubinu (Surma i in. 2013, 2017 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.1, poz. 27 i 18; Ogrodowicz i in. 2018 – Zał. nr 4, II, pkt. 4.2, poz. 1). Przyspieszenie cyklu hodowlanego może korzystnie wpłynąć na skuteczność wyprowadzania nowych odmian o pożądanych cechach, a z drugiej strony może zwiększyć dostępność interesujących materiałów homozygotycznych do badań nad mechanizmami związanymi z reakcją roślin na zróżnicowane warunki środowiska, zwłaszcza w przypadku gatunków, dla których dostępność kolekcji mutantów do badań jest bardzo ograniczona.

Obecnie kontynuuję badania nad wyjaśnianiem mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź jęczmienia na stresy środowiskowe, głównie mających na celu zrozumienie podstaw działania i współdziałania hormonów roślinnych, zarówno w częściach nadziemnych i podziemnych rośliny. Funkcjonowanie tych złożonych sieci regulacyjnych u gatunków jednoliściennych jest wciąż słabo poznane. W kierowanym przeze mnie projekcie NCN OPUS_21 podejmuję próbę poznania roli mikroRNA w regulacji współdziałania fitohormonów w odpowiedzi na suszę. Równolegle badania w tym projekcie koncentrują się na zweryfikowaniu przesłanek wskazujących na udział podjednostki α białka G w percepcji fitohormonów i transdukcji sygnału w warunkach suszy. Ponadto uczestniczę w badaniach mających na celu lepsze zrozumienie procesów molekularnych warunkujących reakcję jęczmienia na jednoczesne odziaływanie stresu abiotycznego (susza) i biotycznego na roślinę (plamistość siatkowa i fuzarioza kłosów).

7.2. Udział w warsztatach/szkoleniach naukowych

- szkolenie „Zastosowanie techniki Real Time PCR w analizie ekspresji genów”, Amplicon, Wrocław, 2017.
- szkolenie „Wprowadzenie do analizy danych RNA-seq”, Ideas4biology, UAM, Poznań, 2017.
- IV Warsztaty Projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, Kraków, 25-26.03.2013.
- scientific Workshop transPLANT „Plant genomics resources and phenotypic data standardization” Poznań, 27-28.06.2013.
- warsztaty „Zastosowanie technik qPCR i LAMP w biologii molekularnej i biotechnologii” Novazym, Poznań, 17.06.2013.
- scientific Workshop "High-throughput measurement protocols in plant physiology", POLAPGEN, Institute of Plant Genetics PAS, Poznań 11.12.2012.

- szkolenie „Sekwencjonowanie DNA”, Centrum Badań DNA, Poznań, 17-18.10.2012.
- III Warsztaty Projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, Puławy, 10-11.05.2012.
- XXI Szkoła Letnia „Postępy Biologii Molekularnej”, Poznań 25-31.07.2011.
- II Warsztaty Projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, - wygłoszony wykład „Patenty w dziedzinie genomiki i hodowli roślin”, Poznań, 11-12.01.2011.
- I Warsztaty Projektu POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, Poznań, 5-6.01.2010.

7.3. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

- krajowa Nagroda II stopnia z Zakresu Genetyki Roślin im. S. Barbackiego za badania dotyczące reakcji jęczmienia jarego na stresy abiotyczne (2020);
- laureat Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju „Naukowiec Przyszłości” (2020);
- nagroda Dyrektora IGR PAN za osiągnięcia publikacyjne w 2013 roku;
- wyróżnienie pracy doktorskiej uchwałą Rady Naukowej IGR PAN z dania 15 września 2015 r.;
- medal Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za osiągnięcia w studiach (2009).

Signed by / Podpisano przez:

Krzysztof Jacek Mikołajczak

Date / Data: 2023-08-18 10:24

…….

(podpis wnioskodawcy)

Literatura:

Blum A. (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential: are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? Australian Journal of Agricultural Research 56:1159-1168.

Busch A.W.U. i Montgomery B.L. (2015) Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response. Redox Biol. 4, 260-271.

Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E. i in. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants:an integrated view from breeding to genomics. Field Crops Res.105:1-14.

Dalal J., Lewis D.R., Tietz O., Brown E.M., Brown C.S., Palme K. i in. (2016) ROSY1, a novel regulator of gravitropic response is a stigmasterol binding protein. J. Plant Physiol. 197:28-40.

Desclaux D., Roumet P. 1996. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (Glycine max L. Merr) cultivars. Field Crops Res. 46:61-70.

Ghatak A. Chaturvedi P., Weckwerth W. (2017) Cereal Crop Proteomics: Systemic Analysis of Crop Drought Stress Responses Towards Marker-Assisted Selection Breeding. Front. Plant Sci. 8, 757.

Górny A.G. (2001) Variation in utilization efficiency and tolerance to reduced water and nitrogen supply among wild and cultivated barleys. Eyphytica 117:59-66.

Grosjean K., Mongrand S., Beney L., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot P. (2015) Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols. J. Biol. Chem. 290:5810-5825.

Gruszka D., Bajguz A., Li Q-F., Hayat S., Hansson M., Wang X., Li J. (2021) Editorial: An Update on Brassinosteroids: Homeostasis, Crosstalk, and Adaptation to Environmental Stress. Front. Plant Sci. 12:673587.

Harb A., Simpson C., Guo W., Govindan G., Kakani V.G., Sunkar R. (2020) The effect of drought on transcriptome and hormonal profiles in barley genotypes with contrasting drought tolerance. Front. Plant Sci. 11, 2060.

Henry R.J. (2020) Innovations in plant genetics adapting agriculture to climate change. Curr. Opin. Plant Biol. 56, 168-173.

Hussain S., Khalid M.F., Saqib M., Ahmad S., Zafar W., Rao M.J. i in. (2018) Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. Acta Physiol. Plant. 40:135.

IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change. Future global climate: Scenario-based projections and near-term information. In Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to The Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2021; pp. 553–672.

IBGSC International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. Nature 491:711-716.

Janská A., Aprile A., Zámečník J.,Cattivelli L., Ovesná J.(2011) Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues. Funct Integr Genomics.11:307-25.

Jayakodi M., Padmarasu S., Haberer G., Bonthala V.S., Gundlach H., Monat C. i in. (2020) The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. Nature 588:284-289.

Jia Q., Hang J., Westcott S., Zhang X., Bellgard M., Lance R., Li C. (2009) *GA-20 oxidase* as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley. Funct. Integr. Genomics 9:255-262.

Jia Q., Zhang X.Q., Westcott S., Broughton S., Cakir M., Yang J., Lance R., Li C. (2011) Expression level of a gibberellin *20-oxidase* gene is associated with multiple agronomic and quality traits in barley. Theor. Appl. Genet. 122:1451-1460.

Kadioglu A., Terzi R., Saruhan N., Saglam A. (2012) Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. Plant Sci. 182, 42-48.

Kuczyńska A., Surma M., Adamski T., Mikołajczak K., Krystkowiak K., Ogrodowicz P. (2013) Effects of the semi-dwarfing *sdw1/denso* gene in barley. J. Appl. Genet. 54:381-390.

Kuczyńska A., Wyka T. (2011) The effect of the *denso* dwarfing gene on morpho-anatomical characters in barley recombinant inbred lines. Breeding Science 61:275-280.

Lakowski T.M., Lee G.M., Okon M., Reid R.E., McIntosh L.P. (2007) Calcium-Induced Folding of a Fragment of Calmodulin Composed of EF-Hands 2 and 3. Protein Sci. 16, 1119-1132.

Li J., Mahajan A., Tsai M.D. (2006) Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein-Protein Interactions. Biochemistry 45, 15168-15178.

Li N., Euring D., Cha J.Y., Lin Z., Lu M., Huang L.J., Kim W.Y. (2021) Plant Hormone-Mediated Regulation of Heat Tolerance in Response to Global Climate Change. Front. Plant Sci. 11, 627969.

Malefo M.B., Mathibela E.O., Crampton B.G., Makgopa M.E. (2020) Investigating the Role of Bowman-Birk Serine Protease Inhibitor in *Arabidopsis* Plants under Drought Stress. Plant Physiol. Biochem. 149, 286-293.

Maluszynski M., Szarejko I. (2005) Induced mutations in the green and gene revolutions. In: Tuberosa R., Phillips R.L., Gale M. (eds) In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution. Avenue media, Bologna, 403-425.

Mamode Cassim A., Gouguet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M. i in. (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. Prog. Lipid Res. 73, 1-27.

Mansour E., Casas A.M., Gracia A.P., Molina-Cano J.L., Moralejo M., Cattivelli L. i in. (2014). Quantitative trait loci for agronomic traits in an elite barley population for Mediterranean conditions. Mol. Breeding 33:249-265

Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T. i in. (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. Nature 544:427-433.

Mascher M., Wicker T., Jenkins J., Plott C., Lux T., Koh C.S. i in. (2021) Long-read sequence assembly: a technical evaluation in barley. The Plant Cell 33:1888-1906.

Mellor S.B., Vinde M.H., Nielsen A.Z., Hanke, G.T., Abdiaziz K. i in. (2019) Defining Optimal Electron Transfer Partners for Light-Driven Cytochrome P450 Reactions. Metab. Eng. 55, 33-43.

Mishra S. K., Poonia A. K., Chaudhary R., Baranwal V. K., Arora D., Kumar R. i in. (2020) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *HSF* gene family in barley during abiotic stress response and reproductive development. Plant Gene 23, 100231.

Monat C., Padmarasu S., Lux T., Wicker T., Gundlach H., Himmelbach A. i in. (2019) TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of Triticeae genomes with open-source tools. Genome Biol. 20:284.

Ost C., Cao H.X., Nguyen T.L., Himmelbach A., Mascher M., Stein N., Humbeck K. (2023) Drought-Stress-Related Reprogramming of Gene Expression in Barley Involves Differential Histone Modifications at ABA-Related Genes. Int. J. Mol. Sci. 24, 12065.

Park C.-J. I Seo, Y.S. (2015) Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. Plant Pathol. J. 31, 323-333.

Pearce S., Huttly A.K., Prosser I.M., Li Y., Vaughan S.P., Gallova B. i in. (2015) Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. BMC Plant Biol. 15:130.

Prasad P.V.V., Pisipati S.R., Momcilovi I., Ristic, Z. (2011) Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-tu expression in spring wheat. J. Agron. Crop Sci. 197, 430-441.

Prasch C.M. i Sonnewald U. (2015) Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. Environ. Exp. Bot. 114, 4-14.

Reddy P.S., Kavi Kishor P.B., Seiler C., Kuhlmann M., Eschen-Lippold L., Lee J. i in. (2014) Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: Its implications in drought stress response and seed development. PloS One 9, e89125.

Rejeb I., Pastor V., Mauch-Mani B. (2014) Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. Plants 3: 458-475.

Sah S.K., Reddy K.R., Li J. (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. Front. Plant Sci. 7, 571.

Schaller H. (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. Plant Physiol. Biochem. 42:465-476.

Skinner DZ. (2009) Post-acclimation transcriptome adjustment is a major factor in freezing tolerance of winter wheat. Funct Integr Genomics. 9:513-523.

Sun H., Wei H., Wang H., Hao P., Gu L., Liu G. i in. (2019) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the BURP Domain-Containing Genes in Gossypium hirsutum. BMC Genom. 20, 558.

Surma M., Adamski T., Kuczyńska A., Krystkowiak K., Trzeciak R., Mikołajczak K., Ogrodowicz P. (2011) Zmodyfikowana technika pojedynczego ziarna w hodowli jęczmienia ozimego. Biuletyn IHAR 262:59-66.

Suzuki N., River R. M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. (2014) Abiotic and biotic stress combinations. New Phytol. 203, 32-43.

Temel A., Janack B., Humbeck K. (2017) Drought Stress-Related Physiological Changes and Histone Modifications in Barley Primary Leaves at *HSP17* Gene. Agron. 7:43.

Thompson L.L., Rutherford K.A., Lepage C.C., McManus K.J. (2021) The SCF Complex Is Essential to Maintain Genome and Chromosome Stability. Int. J. Mol. Sci. 22, 8544.

Tuberosa R., Salvi S. (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends Plant Sci. 11:405-412.

Verma V., Ravindran P., Kumar P. (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. BMC Plant Biol. 16 (86).

Verma R.K. Santosh Kumar V.V., Yadav S.K., Pushkar S., Rao M.V., Chinnusamy V. (2019) Overexpression of ABA receptor *PYL10* gene confers drought and cold tolerance to indica rice. Front. Plant Sci. 10.

Verma V., Foulkes M.J., Worland A.J., Sylvester-Bradley R., Caligari PD. S., Snape J.W. (2004) Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. Euphytica 135, 255-263.

Vítámvás P., Urban M.O., Škodáček Z., Kosová K., Pitelková I., Vítámvás J. i in. (2015) Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. Front Plant Sci. 6:479.

Wang F. (2021) Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. Front. Plant Sci. 12, 1846.

Wang M., Lee J., Choi B., Park Y., Sim H.J., Kim H. i in. (2018) Physiological and molecular processes associated with long duration of ABA treatment. Front. Plant Sci. 9.

Waters M.T., Wang P., Korkaric M., Capper R.G., Saunders N.J., Langdale J.A. (2009) GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis*. Plant Cell 21, 1109-1128.

Wiegmann M., Maurer A., Pham A. i in. (2019) Barley yield formation under abiotic stress depends on the interplay between flowering time genes and environmental cues. Sci Rep 9, 6397.

Xu Y. i Zhu Z. (2020) Abscisic acid suppresses thermomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav. 15, 1746510.

Yang Y., Saand M.A, Huang L., Abdelaal W.B., Zhang J., Wu Y. i in. (2021) Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. Front. Plant Sci. 12, 1846.

Yu Z., Wang X., Zhang L. (2018) Structural and functional dynamics of dehydrins: A plant protector protein under abiotic stress. Int. J. Mol. Sci. 19.