



Autoreferat

**Identyfikacja markerów metabolomicznych w
roślinach z rodziny *Poaceae* i *Brassicaceae*
związanych z odpowiedzią na stresy abiotyczne i
biotyczne**

dr inż. Anna Piasecka
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

Poznań 2024

1. Imię i Nazwisko:

Anna Piasecka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- **2013:** Doktor Nauk Rolniczych (z wyróżnieniem)

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Praca doktorska na temat: "Zmiany w profilach fenolowych metabolitów wtórnych w roślinach jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) poddanych stresowi niedoboru wody".

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Kachlicki

- **2009:** Magister Biotechnologii (z wyróżnieniem)

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Praca magisterska na temat: "Charakterystyka dysmutaz ponadtlenkowych w wybranych gatunkach roślin *Brassica*".

Promotor: Prof. dr hab. Jan Sadowski

- **2009:** Inżynier Technologii Żywności i Żywienia Człowieka

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Człowieka

Praca inżynierska na temat: "Mikroenkapsulacja białek - metody i zastosowania".

Promotor: Dr. hab. Kamila Goderska.

3. Informacje dotyczące poprzednich zatrudnień w instytucjach naukowych:

- **2/2016** - obecnie: Adiunkt,

Zakład Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

- **1/2015 - 09/2020:** Starszy Specjalista,

Zespół Metabolomiki, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

- **1/2011- 12/2014:** Asystent Badawczy,

Zespół Metabolomiki, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

- **10/2008-2/2010:** Doktorant,

Zespół Metabolomiki, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

- Urlopy macierzyńskie i rodzicielskie: **2/2010-8/2010** oraz **3/2015-2/2016**.

4. Omówienie osiągnięć naukowych wymienionych 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 osiągnięć, 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

Identyfikacja markerów metabolomicznych w roślinach z rodziny Poaceae i Brassicaceae związanych z odpowiedzią na stresy abiotyczne i biotyczne

4.2. Cykl prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

H1. Piasecka A[#], Sawikowska A[#], Kuczyńska A, Ogrodowicz P, Mikołajczak K, Krystkowiak K, Gudyś K, Guzy-Wróbelska J, Krajewski P, Kachlicki P*. (2017). Drought-related secondary metabolites of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and their association with mQTLs. *Plant Journal* 2017; 89: 898–913; <https://doi.org/10.1111/tpj.13430>

F₂₀₁₇= 5.901; MNiSW₂₀₁₇=45; MNiSW₂₀₂₄= 140; C=67

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów metabolomicznych oraz udział w powadzeniu eksperymentów szklarniowych, analizie uzyskanych danych, interpretacji danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z pozostałymi współautorami).

H2. Piasecka A, Sawikowska A, Kuczyńska A, Ogrodowicz P, Mikołajczak K, Krajewski P, Kachlicki P*. Phenolic Metabolites from Barley in Contribution to Phenome in soil Moisture

Deficit. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(17): 6032. <https://doi.org/10.3390/ijms21176032>;

IF₂₀₁₉=4.556; MNiSW₂₀₁₉=140 pkt; MNiSW₂₀₂₄=140 pkt; C=4

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów metabolomicznych oraz udział w powadzeniu eksperymentów szklarniowych, analizie uzyskanych danych, interpretacji danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H3. Sawikowska A, **Piasecka A**, Kachlicki P, Krajewski P*. Separation of Chromatographic Co-Eluted Compounds by Clustering and by Functional Data Analysis. *Metabolites* 2021 11(4): 214; <https://doi.org/10.3390/metabo11040214>;

IF₂₀₂₀=4.097; MNiSW₂₀₂₀=100 pkt; MNiSW₂₀₂₄=100 pkt; C=2

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów metabolomicznych, analizie uzyskanych danych, interpretacji uzyskanych danych (wraz z pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym), napisaniu części pierwszej wersji manuskryptu, redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i jego poprawie w odpowiedzi na recenzje (wraz z pozostałymi współautorami).

H4. **Piasecka A**, Kachlicki P, Stobiecki M*. Analytical Methods for Detection of Plant Metabolomes Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(2): 379; <https://doi.org/10.3390/ijms20020379>;

IF₂₀₁₈=4.183; MNiSW₂₀₁₈=30 pkt; MNiSW₂₀₂₄=140 pkt; C=60

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu koncepcji pracy (wraz z autorem korespondencyjnym), zebraniu i przeanalizowaniu materiałów źródłowych i ich opracowaniu wraz z pozostałymi współautorami, napisaniu części pierwszej wersji manuskryptu oraz przygotowaniu ilustracji, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H5. **Piasecka A***, Sawikowska A, Witaszak N, Waśkiewicz A; Kańczurzevska M; Kaczmarek J; Lalak-Kańczugowska J. Metabolomic Aspects of Conservative and Resistance-related

Elements of Response to *Fusarium culmorum* in the Grass Family. *Cells* 2022; 11(20): 3213; <https://doi.org/10.3390/cells11203213>

F₂₀₂₁= 7.666; MNiSW₂₀₂₁=140 pkt; MNiSW₂₀₂₄=140 pkt; C=1

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy oraz zaplanowaniu eksperymentów, opracowaniu metodyki badawczej, wykonaniu eksperymentów, analizie danych, interpretacji danych, napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu, pełnej edycji i poprawie manuskryptu w odpowiedzi na recenzje.

H6. Piasecka A*, Sawikowska A, Jedrzejczak-Rey N, Piślewska-Bednarek M, Bednarek P. Targeted and Untargeted Metabolomic Analyses Reveal Organ Specificity of Specialized Metabolites in the Model Grass *Brachypodium distachyon*. *Molecules* 2022; 27(18): 5956; <https://doi.org/10.3390/molecules27185956>

IF₂₀₂₁= 4.927; MNiSW₂₀₂₁=100 pkt; MNiSW₂₀₂₄=140 pkt; C=1

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: sformułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy, udziale w opracowaniu metodyki badawczej, wykonaniu eksperymentów, analizie uzyskanych danych, interpretacji danych (wraz z autorem korespondencyjnym), napisaniu w całości pierwszej wersji manuskryptu redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (wraz z autorem korespondencyjnym).

H7. Winkelmüller TM, Entila F, Anver S, **Piasecka A**, Song B, Dahms E, Sakakibara H, Gan X, Kułak K, Sawikowska A, Krajewski P, Tsiantis M, Garrido-Oter R, Fukushima K, Schulze-Lefert P, Laurent S, Bednarek P, Tsuda K.* Gene expression evolution in pattern-triggered immunity within *Arabidopsis thaliana* and across *Brassicaceae* species. *Plant Cell* 2021; 33, 1863-1887; doi:10.1093/plcell/koab073;

IF₂₀₂₀=11.277; MNiSW₂₀₂₀=200; MNiSW₂₀₂₄=200; C=21

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zaplanowaniu eksperymentów metabolomicznych (wraz z autorem korespondencyjnym), opracowaniu metodyki badawczej, wykonaniu eksperymentów, analizie danych metabolomicznych, napisaniu części manuskryptu dotyczącej analiz metabolomicznych oraz interpretacji danych (przy udziale pozostałych współautorów).

H8. Czerniawski P, **Piasecka A**, Bednarek P*. Evolutionary changes in the glucosinolate biosynthetic capacity in species representing Capsella, Camelina and Neslia genera. *Phytochemistry* 2021; 181:112571; doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112571;

IF₂₀₂₀= 4.072; MNiSW₂₀₂₀=100; MNiSW₂₀₂₄=100; C=19

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: analizie i interpretacji uzyskanych danych metabolomicznych, napisaniu części pierwszej wersji manuskryptu dotyczącej analiz metabolomicznych, redagowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

Imię i nazwisko habilitanta jest pogrubione; * autor korespondencyjny; # autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

Tabela 1. Dane naukometryczne dotyczące osiągnięcia habilitacyjnego podano według bazy Web of Science Core Collection, 12.04.2024.

	Cykl (8)	Wszystkie publikacje z IF (27)
IF	50.518	110.796
MNiSW	890	1667
MNiSW ₂₀₂₄	1030	2670
Liczba cytowań (z wyłączeniem autocytowań)	176 (167)	1046 (960)
H-index	4	16

IF: Impact Factor za rok poprzedzający datę publikacji;

MNiSW: Punkty przyznawane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego za rok poprzedzający datę publikacji;

MNiSW₂₀₂₃: Punkty przyznawane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (zgodnie z najnowszym „Wykazem czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych” opublikowanym w dniu 17.07.2023 r.).

Tabela 2. Całkowity dorobek naukowy z rozdzieleniem na okresy przed oraz po uzyskaniu stopnia doktora.

Typ publikacji		Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Suma
1.	Publikacje oryginalne z IF	3	24	27
2.	Abstrakty	2	23	25
3.	Referaty	2	12	14

4.	Plakaty	2	23	25
----	---------	---	----	----

Oświadczenia potwierdzające wkład Wnioskodawcy w powstanie ww. opracowań zawiera Załącznik nr 9. Kopie ww. publikacji znajdują się w Załączniku nr 8.

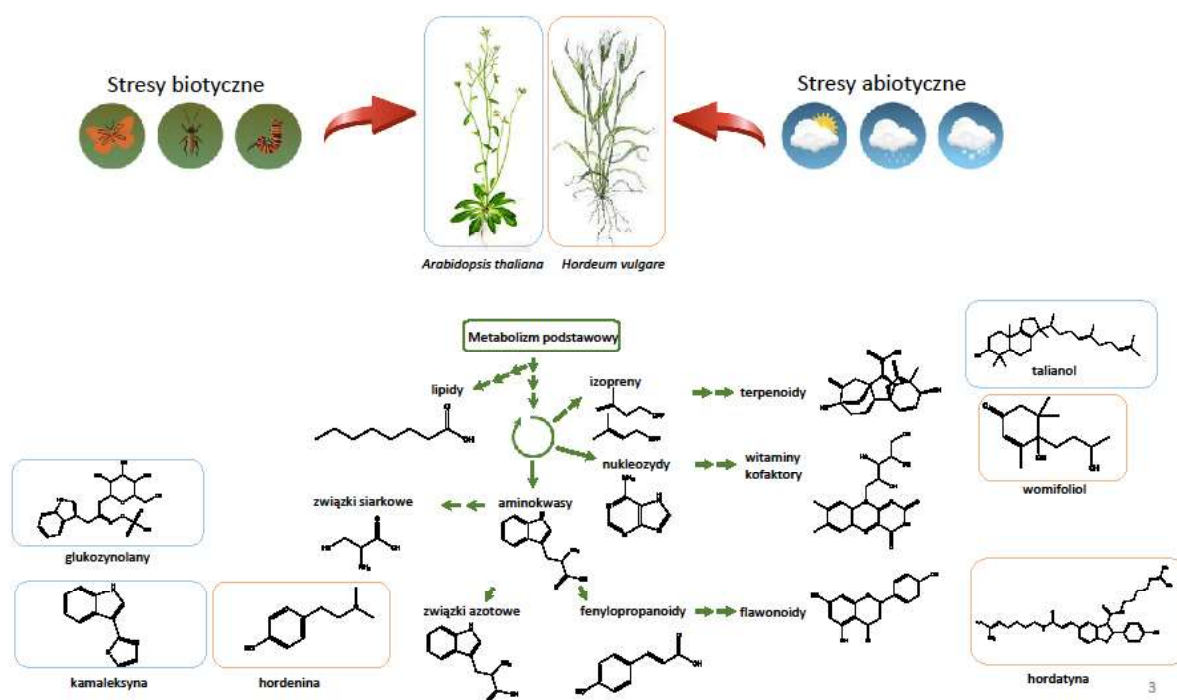
4.3. Omówienie dorobku habilitacyjnego

4.3.1. Wstęp

Abiotyczne i biotyczne stresy mają szkodliwy wpływ na kondycję i produktywność roślin uprawnych. Zmiany klimatyczne oznaczają, że uprawy są stale narażone na drastyczne stresy środowiskowe, co prowadzi do prognozy niższej globalnej produkcji roślinnej. Tendencja do wydłużania czasu trwania i nasilenia stresów środowiskowych, takich jak susza lub powódzie, nie tylko negatywnie wpłynie na plony, ale także zwiększy inwazję patogenów i roślinożerców przystosowanych do suszy (Liu and Liu, 2016). Dlatego konieczne jest wprowadzenie nowych odmian roślin uprawnych, które są w stanie przetrwać te niekorzystne warunki.

Niskocząsteczkowe związki są niezbędnymi składnikami metabolizmu roślin. Rośliny produkują duży i zróżnicowany zbiór takich struktur, które odgrywają rolę w szlakach sygnalizacyjnych, regulacji wielu bioprocessów oraz mechanizmach obrony przed szerokim zakresem stresów biotycznych i abiotycznych (Böttger et al., 2018). Znaczna grupa metabolitów reguluje ciśnienie osmotyczne i procesy fotosyntezy w stresach abiotycznych a także działa jako antyoksydanty zapobiegając utlenianiu składników komórkowych (Szepesi, 2020). Od dawna uważane są za czynniki wpływające na interakcje roślin z innymi organizmami, w tym z mikroorganizmami symbiotycznymi (Wolinska et al., 2021) a także patogenami i szkodnikami (Piasecka et al., 2015a). Metabolity produkowane przez rośliny są szeroko badane w procesach odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe, jako ich elementy, przyczyniające się do ograniczenia negatywnych skutków oddziaływania stresów na rośliny. Metabolity wtórne mają szerokie spektrum aktywności, a akumulacja fenylopropanoidów, flawonoidów, stilbenoidów i kwasów tłuszczowych może być obserwowana u wielu roślin po infekcji patogenami (Bollina et al., 2010) oraz w stresach abiotycznych, tj. susza (Piasecka et al., 2017) czy nadmierne promieniowanie UV (Ferreira et al., 2021). Można zatem przypuszczać, że te grupy strukturalne stanowią kluczowe elementy odpowiedzi roślin na różne bodźce.

Niektóre grupy metabolitów wtórnych, takie jak terpenoidy, fenylopropanoidy i flawonoidy, są rozpowszechnione w całym królestwie roślin, co sugeruje podobne, zakonserwowane funkcje biologiczne tych związków. Z drugiej strony, elementy konserwatywnych szlaków biochemicznych podległy dynamicznej ewolucji, czego konsekwencją jest występowanie metabolitów specyficznych dla ograniczonej grupy roślin, np. w taksonomicznie powiązanych rodzajach lub gatunkach, a nawet w jednym gatunku (Rysunek 1) (Wang et al., 2019). Przykładem są metabolity specyficzne dla rodziny *Brassicaceae* reprezentowanej przez modelową roślinę rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), tj. pochodzące z tryptofanu związki zawierające siarkę kamaleksyna oraz glukozynolany, czy terpenoidowy talianol (Field et al., 2011). Metabolity charakterystyczne dla rodziny *Poaceae* reprezentowanej przez jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare*) są to m.in. związek indolowy hordeina oraz hordatyny będące koniugatami kwasów hydroksycynamonowych z poliaminą agmatyną.



Rysunek 1. Wyspecjalizowane metabolity roślinne zaangażowane w odpowiedź na bodźce środowiskowe są zróżnicowane strukturalnie. Wszystkie pochodzą z pierwotnego metabolizmu i dzielą pierwsze etapy szlaków biosyntezy. Niektóre z nich są zakonserwowane w królestwie roślin, a inne są specyficzne dla gatunku lub rodzaju. Przykładowe metabolity charakterystyczne dla *Brassicaceae* reprezentowanej przez modelową roślinę *Arabidopsis thaliana* zaznaczono niebieskimi obwódkami. Metabolity charakterystyczne dla *Poaceae* reprezentowanej przez *Hordeum vulgare* zaznaczono czerwonymi obwódkami.

Zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi roślin na stres jest niezwykle ważne dla opracowania nowych odmian roślin o zwiększonej tolerancji na stres. W ostatnich latach naukowcy coraz bardziej interesują się możliwością wykorzystania specjalistycznych metabolitów jako źródeł biomarkerów tolerancji roślin na różne stresy (Sakurai, 2022).

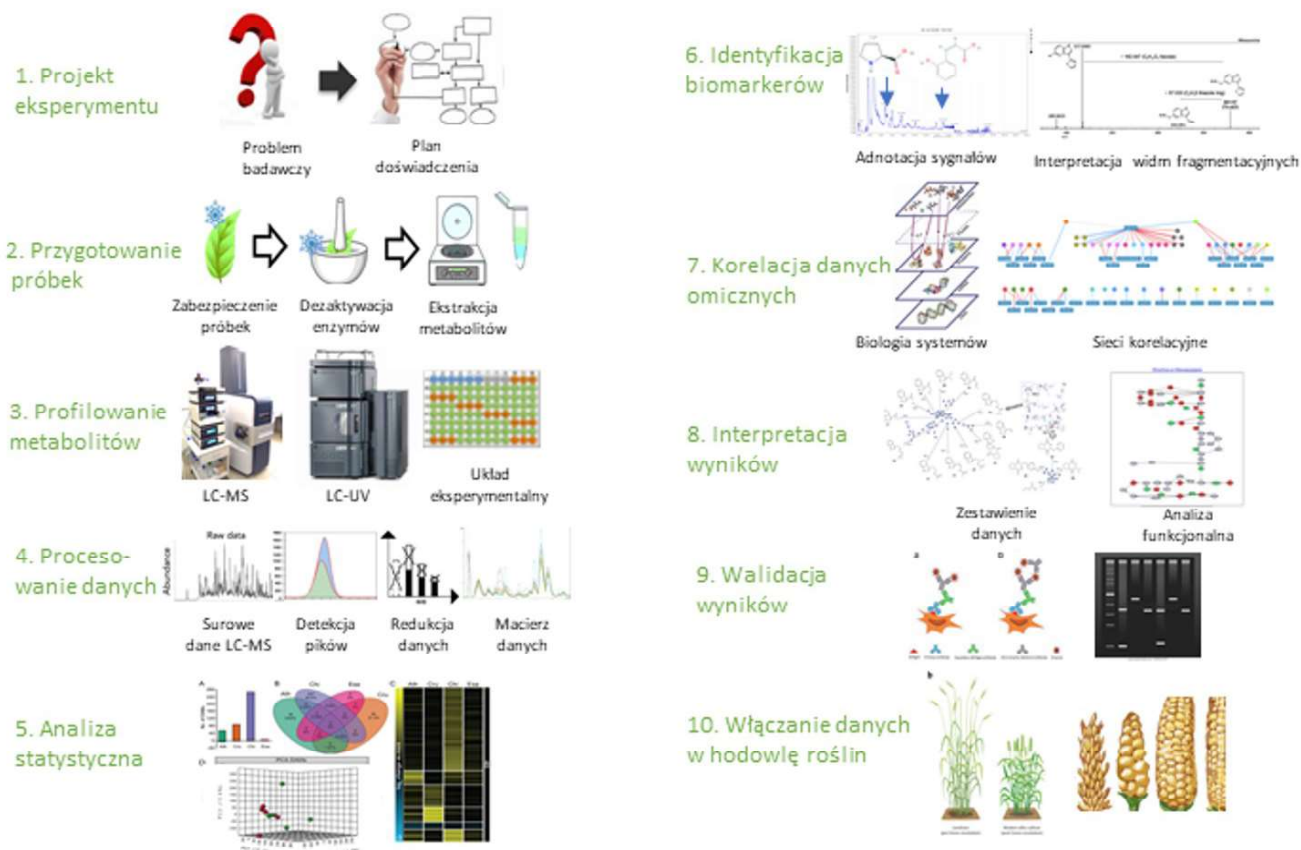
Metabolomika, która obejmuje kompleksową analizę związków niskocząsteczkowych obecnych w układach biologicznych, stała się potężnym narzędziem do badania złożonych interakcji między roślinami a środowiskiem. Gdy receptory roślinne są stymulowane przez sygnały stresowe, aktywowana jest ekspresja genów reagujących na stres, między innymi przyczyniającymi się do zmian profilu metabolitów wtórnych (Hong et al., 2016). Szybkie analizy screeningowe pomagają zidentyfikować fenotypową odpowiedź roślin na stresy abiotyczne i biotyczne oraz wyszukać osobniki odporne na stres. Dodatkowo pomagają ujawnić mechanizmy genetyczne i biochemiczne leżące u podstaw zrozumienia plastyczności roślin na potrzeby przyszłej inżynierii genetycznej roślin odpornych/tolerujących stres. Dzięki metabolomice możliwe jest uzyskanie wglądu w szlaki metaboliczne, które są elementami odpowiedzi roślin na stresy, oraz identyfikacja potencjalnych biomarkerów tolerancji na stres (Hong et al., 2016). Metabolomika stała się cennym narzędziem w różnych dziedzinach nauki, w tym w rolnictwie, medycynie, naukach o żywności i żywieniu, toksykologii, genomice funkcjonalnej i nutrigenomice.

Chromatografia cieczowa (LC) lub jej połączenie ze spektrometrią mas (LC-MS) jest najczęściej wykorzystywana w badaniach metabolomicznych. Postępy technologiczne umożliwiły kompleksową i szczegółową identyfikację kluczowych elementów zaangażowanych w odpowiedź roślin na stres. Czynniki przyczyniające się do szerokiego zastosowania spektrometrii mas w badaniach roślinnych to przede wszystkim łatwość łączenia z metodami separacji metabolitów ze złożonych mieszanin ekstrakcyjnych jakimi są tkanki roślinne, oraz możliwość wykorzystania różnych zjawisk fizycznych do jonizacji różnorodnych struktur. Metody magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) stanowią alternatywne podejście do badań metabolomu roślin. NMR jest nieporównywalnie mniej czuły niż spektrometria mas, jednak liczne cechy, w tym jego wysoka powtarzalność, nieselektywny i nieinwazyjny charakter oraz zdolność do identyfikacji nieznanymi metabolitów w złożonych mieszaninach (Nagana Gowda and Raftery, 2021). Metody oparte na NMR, jak i MS mogą być wykorzystywane komplementarnie w badaniach metabolomicznych (Piasecka et al., 2015b).

Identyfikacja markerów metabolomicznych roślin wymaga kompleksowego podejścia, które obejmuje przygotowanie próbek, pozyskanie danych, przetwarzanie uzyskanych surowych danych, następnie ich weryfikację i korektę jakości otrzymanych danych (Rysunek 2.) (Piasecka et al., 2019). Poprawne planowanie eksperymentu jest kluczowe dla sformułowania hipotezy badawczej. Metody ekstrakcji powinny zapewnić możliwości pozyskania szerokiego spektrum metabolitów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Jest to szczególnie ważne dla analizy związków, takich jak np. glukozynolany, obecne w rodzinie *Brassicaceae*, które wymagają skomplikowanego procesu przygotowania próbek i mogą być bardzo trudne do analizy. Ze względu na obecność w pojedynczej próbce materiału roślinnego tysięcy metabolitów o zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych a także zróżnicowanym zakresie stężeń, wybór odpowiednich podejść MS i optymalizacja parametrów jonizacji i detekcji jonów to tylko pierwszy krok w długim procesie uzyskiwania znaczących danych. Wykorzystanie różnych faz stałych i rozpuszczalników pomaga zmniejszyć stężenie naturalnych produktów obecnych w analizowanych próbkach, co skutkuje zwiększoną czułością i zakresem dynamicznym w urządzeniach MS. Analizy metabolomu cechują dwa podejścia: niecelowane (globalne) i celowane. Niecelowane podejście jest przydatne do monitorowania zmian jakościowych i ilościowych metabolitów w różnych warunkach eksperymentalnych a także ułatwi formułowanie hipotez badawczych. To podejście analityczne okazało się uzupełnieniem innych technik omicznych, identyfikując metabolomiczne markery, które mogą zostać wykorzystane w poprawie składu odżywczego kukurydzy (Venkatesh et al., 2016), czy ryżu (Silva et al., 2017) lub cech przyczyniających się do poprawy plonowania w warunkach stresów środowiskowych u kukurydzy (Obata et al., 2015), ryżu (Degenkolbe et al., 2013) czy sorgo (Borrell et al., 2014). Podejście ukierunkowane (celowane) służy do badania określonej znanej grupy związków chemicznych w próbkach. Przy użyciu standardów wewnętrznych analiza może być przeprowadzona w sposób ilościowy. Ta metoda umożliwia monitorowanie szerokiej gamy enzymów, ich kinetyki, a także elementów składowych szlaków metabolicznych. W przypadku wykorzystania metabolomiki ukierunkowanej, przygotowanie próbek może być zoptymalizowane, co zmniejsza wpływ elementów tła powstałych w detektorze. Ponadto, mimo analizowania jasno zdefiniowanych metabolitów, nowe związki również mogą być zidentyfikowane w kontekście określonych stanów fizjologicznych.

Dzięki wysokiej czułości systemów LC-MS, możliwa jest detekcja tysięcy sygnałów w pojedynczej próbce, a co za tym idzie, powstają duże, wielowymiarowe zbiory danych.

Konieczne jest zatem ograniczenie wymiarowości danych za pomocą odpowiednich metod matematycznych. W tym celu powstały zaawansowane narzędzia do przetwarzania surowych



danych LC-MS do formy macierzy, która może być następnie poddana analizie statystycznej. Jednym z największych wyzwań w metabolomice roślin jest wydobycie użytecznych informacji o wyspecjalizowanych metabolitach z ogromnej ilości danych generowanych przez nowoczesne systemy LC-MS. Aby to osiągnąć, konieczna jest selekcja danych, a następnie zaawansowane metody statystyczne w celu porównania wszystkich sygnałów we wszystkich próbkach i szybkiego zidentyfikowania odpowiednich sygnałów. Interpretacja uzyskanych danych opiera się na wykorzystaniu istniejących programów oraz baz danych do identyfikacji metabolitów i analizy statystycznej.

Rysunek 2. Techniki spektrometrii mas w metabolomice funkcjonalnej roślin - przydatne narzędzie do profilowania metabolomu i odkrywania biomarkerów metabolomicznych roślin w odpowiedzi na czynniki abiotyczne i biotyczne. Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów badań nad kompleksową analizą metabolitów roślin związanych ze stresem środowiskowym, wykorzystujących nowoczesne podejścia metabolomiczne.

4.3.2. Motywacja i cel badań

Przedstawione osiągnięcie naukowe składa się z cyklu ośmiu publikacji, w tym siedmiu prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej. Prace te powstały w ramach grantów naukowych, w których pełniłam rolę wykonawcy lub kierownika projektu. Jestem pierwszym autorem w pięciu pracach i autorem korespondencyjnym w jednej z nich. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w czasopismach zawartych w bazie Journal Citation Reports (JCR), o łącznym współczynniku wpływu (IF) wynoszącym 49.667 i liczbie cytowań 167 (stan na 12.04.2024 r. według Web of Science Core Collection). Cykl prac skupia się na identyfikacji składników metabolomicznych związanych z odpowiedzią roślin na stresy środowiskowe, wykorzystując techniki spektrometrii mas i chromatografii cieczowej.

Badania przedstawione w pracach **H1-H3** były częścią wielodyscyplinarnego projektu mającego na celu badanie genetycznych, ekofizjologicznych, morfologicznych, anatomicznych, biochemicznych i biofizycznych aspektów tolerancji zbóż na niedobór wody. Badania były prowadzone w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka "Biotechnologiczne narzędzia do otrzymywania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę, POLAPGEN-BD" nr WND-POIG.01.03.01-00-101/08, POIG. Piotra Kachlickiego w Zespole Metabolomiki w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk. Badania zostały zaprojektowane z założeniem, że jęczmień posiada duże i niezbadane bogactwo metabolitów, wśród których znajdują się takie, które odgrywają rolę w odpowiedzi roślin na niedobór wody i procesy aklimatyzacji. Ponadto, istnieje duża zmienność zawartości metabolitów wtórnych między odmianami pochodzącymi z różnych części świata.

Podstawowym celem badań przedstawionych w publikacjach **H1-H3** było zastosowanie podejść metabolomicznych i chemometrycznych do poszukiwania biomarkerów molekularnych odporności na suszę w roślinach uprawnych. W wyniku prowadzonych badań w ramach projektu POLAPGEN-BD opublikowałam cztery prace badawcze, w tym trzy z moim udziałem jako pierwszej autorki. Jedną z publikacji, (Piasecka et al. 2015. Combined mass spectrometric and chromatographic methods for in-depth analysis of phenolic secondary metabolites in barley leaves. *Journal of Mass Spectrometry* 2015; 50 (3): 513-532), była ściśle związana z moją pracą doktorską dotyczącą identyfikacji metabolitów w dziewięciu genotypach jęczmienia i opisem zmienności metabolomu między genotypami pochodzącymi z różnych warunków klimatycznych. Wykorzystanie uzupełniających się wzajemnie technik: LC-MSⁿ (spektrometrii mas z wieloetapową fragmentacją) i LC-HRMS/MS (spektrometrii mas

wysokiej rozdzielczości z podwójną fragmentacją) oraz techniki NMR umożliwiło charakterystykę 152 metabolitów fenolowych.

Zidentyfikowane struktury zostały wykorzystane do dalszej analizy zmian metabolomu 100 linii wsobnych RIL oraz ich form rodzicielskich pod wpływem suszy za pomocą metod chromatografii cieczowej z detektorem fotodiodowym (UPLC-PDA) i korelacji uzyskanych wyników z danymi genomowymi, co opisałam w publikacji **H1**. Stało się to możliwe dzięki opracowaniu przez moich współpracowników z Instytutu Genetyki Roślin, konsensusowej mapy genetycznej znaczników SSR i SNP o wysokiej rozdzielczości dla trzech populacji RIL pochodzących z krzyżówek europejskich i syryjskich odmian jęczmienia jarego. W pracy **H1** podjęłam próbę zrozumienia molekularnych podstaw odpowiedzi jęczmienia na stres suszy poprzez mapowanie locus metabolomicznych cech ilościowych kontrolujących zmienność cech fizjologicznych i biochemicznych związanych z reakcją na niedobór wody.

W publikacji **H2** zaproponowałam innowacyjne podejście łączące metabolomikę z chemometrią w celu opisanía różnic w mobilizacji metabolomu w czasie suszy między fazami wegetatywnymi i generatywnymi roślin oraz ich korelacji z konsekwencjami fenotypowymi. Obserwacje plonu roślin i biomasy dostarczyły informacji o długoterminowych konsekwencjach niedoboru wody dla kondycji roślin.

Niezaprzeczalnym wyzwaniem projektu było wdrożenie i optymalizacja metody profilowania metabolitów za pomocą metody UPLC-PDA. Miałam przyjemność uczestniczyć w pracach bioinformatycznych, które doprowadziły do stworzenia innowacyjnych metod przetwarzania tego typu danych, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału ko-eluuujących metabolitów opisanych w publikacji **H3**.

Po zakończeniu projektu POLAPGEN-BD otrzymałam własny projekt badawczy SONATA finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). W ramach projektu wykonywałam badania równoległe w Instytucie Genetyki Roślin PAN, w Zespole Metabolomiki (pod kierunkiem prof. Piotra Kachlickiego) oraz w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin (pod kierunkiem prof. Pawła Bednarka). Projekt ten powstał z zamiarem rozwoju moich kompetencji w dziedzinie technik metabolomicznych oraz poszerzenia wiedzy na temat udziału metabolomu roślinnego w stresach biotycznych. Celem projektu było wskazanie metabolomicznych biomarkerów tolerancji roślin z rodzaju *Poaceae* na patogena grzybowego *Fusarium culmorum*. (https://projekty.ncn.gov.pl/index.php?projekt_id=290019). Fuzarioza kłosa wywoływana przez *F. culmorum* stanowi poważną chorobę zbóż o ekonomicznych konsekwencjach

związanych z obniżeniem plonów oraz produkcją mykotoksyn w ziarnach. Projekt skupiał się na ważnych roślinach uprawnych takich jak pszenica (*Triticum aestivum*) i jęczmień (*Hordeum vulgare*), a także na modelowej roślinie dla zbóż kłosownicy dwukłoskowej (*Brachypodium distachyon*). Do badań wybrałam genotypy o zróżnicowanej podatności na infekcję *F. culmorum*. Poszukiwanie metabolitów związanych z odpornością w rodzinie traw stanowi ogromny potencjał dla hodowli roślin i inżynierii metabolicznej w kontekście zwiększenia kontroli nad istniejącymi stratami plonów (Sakurai, 2022).

Zadania badawcze w projekcie zostały zaplanowane w oparciu o techniki spektrometrii mas, w tym LC-HR MS/MS i LC-MSⁿ (niskorozdzielcza spektrometria mas z wielostopniową fragmentacją, MS1-MS5). Jednym z największych wyzwań podczas realizacji projektu było opracowanie i optymalizacja metodologii przetwarzania danych LC-MS w odniesieniu do metabolomiki roślinnej oraz skuteczne zastosowanie metod statystycznych w wieloczynnikowym eksperymencie. Specyfika analiz metabolomiki niecelowanej danych LC-MS wymaga gruntownej wiedzy na temat zasad planowania eksperymentu, przygotowania próbek, przetwarzania danych oraz metod ich wizualizacji. Aby przygotować się do tego typu analiz, które stanowiły dla mnie nowość, ukończyłam kurs online "Metabolomics Data Processing and Data Analysis" zorganizowany przez Uniwersytet w Birmingham oraz uczestniczyłam w warsztatach "Metabolomic Bio & Data" w Voralpe w Austrii. Dodatkowo, odbyłam krótkoterminowy staż w Instytucie Nauk o Roślinach im. Albrechta von Hallera na Uniwersytecie Georga Augusta w Getyndze, w Katedrze Biochemii Roślin, w celu poznania specyfiki analiz danych metabolomicznych z materiału roślinnego.

Uzyskaną wiedzę na temat strategii prowadzenia analiz metabolomiki roślin podsumowałam w pracy przeglądowej **H4**. Praca ta skupiała się na opracowaniu schematu przeprowadzania kompleksowych eksperymentów metabolomicznych w celu efektywnego poszukiwania metabolitów istotnych statystycznie i biologicznie dla badanego zagadnienia. W pracy tej zdefiniowałam pojęcie metabolitów o zróżnicowanej akumulacji (DAM, differentially accumulated metabolites) tożsame do pojęcia DEG (genów o zróżnicowanej ekspresji, differentially expressed genes) stosowanego dla analiz transkryptomicznych. Wprowadzenie definicji DAMs a następnie odpowiednie filtrowanie sygnałów LC-MS w oparciu o tę definicję umożliwia korelację danych metabolomicznych z danymi z innych dziedzin „omicznych”. Stworzony schemat i metodologia zostały wykorzystane do identyfikacji zmian immunologicznych określonych genotypów *Poaceae* o niskiej i wysokiej podatności na infekcję *F. culmorum* opisanych w pracy **H5**. Badania te łączyły profilowanie metabolomiczne

z analizą funkcjonalną szlaków biochemicznych oraz analizą korelacyjną, co pomogło odróżnić elementy konserwatywnej odpowiedzi immunologicznej między badanymi gatunkami od unikalnych elementów odpowiedzi immunologicznej określonych genotypów.

Dzięki stażowi naukowemu w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, dotyczącemu pomiaru potencjału przeciwutleniającego w tkankach roślinnych, skutecznie połączyłam swoją wiedzę i doświadczenie w dziedzinie biochemii i fizjologii roślin z nowoczesnymi technikami spektrometrii mas.

W publikacji **H6** przedstawiłam szczegółową charakterystykę metabolomu *B. distachyon*, który pomimo intensywnego wykorzystywania jako modelowy system dla genomiki funkcjonalnej zbóż, jest słabo poznany pod względem profilu metabolomicznego. Kompleksowy opis metabolitów oparty na fragmentacyjnych widmach mas pochodzących z dwóch systemów LC-MS i adnotacji w bazach danych został wzbogacony o analizę funkcjonalną szlaków metabolicznych. Zbadanie metabolomu *B. distachyon* było konieczne, aby wykazać podobieństwa i różnice między *B. distachyon* a zbożami przedstawionymi w publikacji **H5** w zakresie obrony przed *F. culmorum* na poziomie metabolomu. **H6** kończy serię analiz metabolomicznych związanych z mechanizmami stymulacji środowiskowych w roślinach z rodziny *Poaceae*.

Główną motywacją moich badań jest zdobycie rozległej wiedzy na temat działania metabolitów roślinnych w odpowiedzi na stresy. Udział w międzynarodowym projekcie badawczym dotyczącym układu odpornościowego roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) dał mi możliwość poszerzenia warsztatu analitycznego o nowe gatunki i mechanizmy działania metabolitów. Publikacja **H7** opisuje badania ewolucji odpowiedzi immunologicznej wywołanej wzorcem (PTI, pattern-triggered immunity) poprzez analizę zmian transkryptomicznych i metabolomicznych w *A. thaliana* i innych gatunkach *Brassicaceae* pod wpływem mikrobowych wzorców molekularnych (MAMPs, microbe-associated molecular patterns). Celem pracy było zidentyfikowanie genów i metabolitów, które wspólnie i specyficznym reagują na MAMP jakim jest oligopeptyd pochodzący z bakteryjnego białka, flg22. Porównanie odpowiedzi immunologicznej indukowanej poprzez flg22 na poziomie transkryptomu między liniami *A. thaliana* oraz między czterema gatunkami *Brassicaceae* ujawniło fundamentalne cechy ewolucji transkryptomu w obrębie roślin *Brassicaceae*. Zespół konserwatywnych genów biorących udział w PTI wśród *Brassicaceae* prawdopodobnie odzwierciedla ważne procesy regulacji genów w PTI, podczas gdy gatunkowo-specyficzna odpowiedź jest efektem ewolucji w specyficznych warunkach środowiskowych. Jednolity układ eksperymentalny dla wszystkich

porównań umożliwił wykrycie zmienności w akumulacji metabolitów między badanymi gatunkami. Zaobserwowane różnice w profilach metabolomicznych między blisko spokrewnionymi gatunkami opisanymi w **H7** zostały następnie kompleksowo zbadane i objaśnione w **H8**. W publikacji tej przeprowadzono analizę porównawczą dystrybucji i biosyntezy glukozynolanów w różnych organach wybranych gatunków blisko spokrewnionych z *A. thaliana* należących do plemienia *Camelineae* (analiza celowana) a następnie uzupełniona przez identyfikację ortologów genów biosyntetycznych glukozynolanów w opublikowanych genomach niektórych z badanych gatunków. Zarówno badania genetyczne, jak i metabolomiczne dostarczyły wglądu w ewolucyjne zmiany w szlaku biosyntezy glukozynolanów w plemieniu *Camelineae*.

Większość prac z cyklu (poza pracą przeglądową **H4** oraz stricte metabolomiczną pracą **H6**) to interdyscyplinarne badania, które prezentuje szeroki zakres nowoczesnych podejść i technik analitycznych w dziedzinie biochemii, biologii molekularnej, biologii obliczeniowej, bioinformatyki i fizjologii roślin. Badania nad interakcją roślin ze środowiskiem są niewątpliwie jednym z najbardziej interdyscyplinarnych projektów biologii roślin ze względu na złożoność tych procesów.

Zasadniczym celem moich badań było zidentyfikowanie elementów metabolomicznej odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe przy użyciu technik spektrometrii mas.

Specyficzne cele z wcześniej opisanych badań można przedstawić w następujący sposób:

1. Identyfikacja składników metabolomicznych w odpowiedzi roślin uprawnych na stresy środowiskowe:
 - Wykorzystanie technik spektrometrii mas do identyfikacji kluczowych składników metabolomicznych, które odgrywają rolę w reakcji roślin uprawnych na stresy środowiskowe, ze szczególnym uwzględnieniem rodziny traw.
 - Korelacja profilu metabolomicznego z genetycznym tłem roślin poddanych stresowi środowiskowemu.
2. Badanie fenotypu molekularnego jęczmienia i jego odporności na suszę:
 - Zastosowanie podejść metabolomicznych i chemometrycznych do badania fenotypu molekularnego jęczmienia.
 - Poszukiwanie biomarkerów molekularnych odporności na suszę w jęczmieniu i innych roślinach uprawnych.

3. Kompleksowa analiza metabolitów fenolowych w jęczmieniu:

- Charakteryzacja szerokiej gamy metabolitów fenolowych w różnych genotypach jęczmienia.
- Zrozumienie zmienności tych metabolitów wśród genotypów z różnych warunków klimatycznych.

4. Rozwój i optymalizacja metodologii metabolomiki roślin:

- Opracowanie i optymalizacja metod przetwarzania danych metabolomicznych LC-MS dla roślin.
- Wdrożenie efektywnych metod statystycznych do eksperymentów wieloczynnikowych w celu uzyskania kontekstu biologicznego.
- Optymalizacja metod przetwarzania danych metabolomicznych w celu zwiększenia jakości i efektywności analizy danych.

5. Identyfikacja biomarkerów metabolomicznych tolerancji na *Fusarium* w rodzinie *Poaceae*:

- Identyfikacja biomarkerów metabolomicznych związanych z tolerancją na patogen mykotoksynogeny *Fusarium* w rodzinie *Poaceae*.
- Wykazanie zachowania funkcji w obronie przed chorobami na poziomie metabolomicznym między *B. distachyon* i zbożami.
- Skupienie się na uprawach o znaczeniu gospodarczym, takich jak pszenica i jęczmień, oraz roślinach modelowych, takich jak stokłosa purpurowa (*B. distachyon*) w kontekście zmienności odporności roślin.

6. Badanie reakcji na wzorce wyzwajające odporność (PTI) w *A. thaliana* i innych gatunkach *Brassicaceae*:

- Badanie zmian transkryptomicznych i metabolomicznych w *A. thaliana* i innych gatunkach *Brassicaceae* po ekspozycji na MAMPy.
- Identyfikacja genów i metabolitów reagujących na MAMP flg22 i zrozumienie ewolucji reakcji PTI w tych gatunkach.
- Korelacja profilu metabolomicznego z danymi transkryptomicznymi w kontekście ewolucyjnym zmienności odporności roślin.

7. Porównawcza analiza biosyntezy glukozynolanów w plemieniu *Camelineae*:

- Przeprowadzenie analizy porównawczej dystrybucji i biosyntezy glukozynolanów w różnych organach wybranych gatunków z plemienia *Camelineae*.
- Identyfikacja ortologów genów biosyntetycznych glukozynolanów i zrozumienie ewolucyjnych zmian w ścieżce biosyntezy

4.3.3. Dyskusja wyników

Identyfikacja biomarkerów metabolomicznych w odpowiedzi jęczmienia na suszę (H1-H2)

Deficyt wody to główny czynnik ograniczający wzrost i produktywność roślin na całym świecie. Odporność roślin na deficyt wody jest zależna od wielu czynników, w tym warunki glebowe, klimatyczne i agronomiczne, stresy towarzyszące oraz fazę rozwojową. Opisanie tych zależności jest kluczowe dla opracowania skutecznych strategii radzenia sobie ze skutkami agronomicznymi deficytu wody. Złożony charakter odporności roślin na suszę obejmuje zmiany genetyczne, fizjologiczne i morfologiczne jest warunkowany przez różne czynniki, takie jak stopień suszy i faza rozwojowa rośliny. Implikuje to konieczność systemowego podejścia do jego zrozumienia.

Badania przedstawione w publikacji **H1** miały na celu identyfikację metabolitów, które znacząco zmieniają swą akumulację w warunkach deficytu wody oraz zbadanie wpływu tła genetycznego na te zmiany. Opracowanie sieci korelacji gen-metabolit na podstawie korelacji mapy loci cech ilościowych (mQTL) z metabolitami o zróżnicowanej akumulacji w suszy dostarczyła wartościowych wskazówek dotyczących molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. Zaproponowane podejście pozwoliło na zidentyfikowanie 98 elementów metabolomicznych związanych z suszą. Analiza wykazała znaczące zmiany w poziomie związków fenolowych i terpenoidowych. Pochodne kwasów hydroksycynamonowych okazały się dominujące w przypadku przedłużającej się suszy, podczas gdy proste pochodne fenylopropanoidów zwiększały akumulację na początkowym etapie suszy. Metabolity zawierające grupy metoksyłowe, zwłaszcza kwas ferulowy i jego pochodne, okazały się wyróżniającymi czynnikami reagującymi na suszę. Związki te już wcześniej były postulowane jako znacząca grupa nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, które biorą udział w reakcji na suszę a także wytwarzaniu tolerancji roślin na niekorzystne warunki środowiskowe (Hura et al., 2008). W przypadku suszy związki fenolowe działają jako dyssypatory energii i zapobiegają fotoinhibicyjnym uszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego. W publikacji (Stochmal and Oleszek, 2007) opisano istotne zwiększenie absorpcji promieniowania UV-B przez acylowane flawonoidy w porównaniu do ich form glikozydowych. Wydaje się, że biosynteza związków acylowanych w jęczmieniu w okresie suszy jest związana ze zwiększoną efektywnością dyssypacji promieniowania UV-B. Uzyskane dane potwierdzają wnioski z pracy (Schmitz-Hoerner and Weissenböck, 2003), w której

wykazano rolę związków fenolowych w ochronie DNA przed uszkodzeniami spowodowanymi nadmiernym promieniowaniem UV. Procesy metylacji kwasów hydroksycynamonowych zwiększają zakres pochłaniania długości fal UV, a połączenie tych acyli z flawonoidami znacząco wzmacnia intensywność absorpcji. Jednocześnie zaobserwowano procesy blokowania grup hydroksylowych flawonoidów poprzez glikozydy, co zmniejsza ich reaktywność i umożliwia akumulację tych metabolitów w wakuoli. Ponadto badania wykazały, że metabolity blumenolowe i pochodne poliamin hordatyny dotąd łączone z odpowiedzią immunologiczną roślin, mogą mieć nieznane funkcje w reakcji jęczmienia na suszę.

Analizy opisane w **H1** pokazują regiony i kandydujące geny zaangażowane w regulację metabolomu lub grup metabolitów podczas suszy. Większość mQTL była związana z pochodnymi flawonoidów, często zawierające 2''-O-glikozydy, co może być ważnym czynnikiem w ich transportowaniu i magazynowaniu w wakuoli. Co ciekawe, nie zaobserwowano korelacji między metabolitami i genami uczestniczącymi w ich biosyntezie. Wiele cech metabolicznych była z kolei związana z procesami antyoksydacyjnymi i mechanizmami obronnymi.

Wyniki **H1** sugerują, że metabolity w suszy związane są z procesami antyoksydacyjnymi, regulacją ekspresji genów oraz modulacją funkcji białek w roślinach jęczmienia. Identyfikacja metabolomicznych locus ilościowych w regionach genomowych związanych z reakcją na stres może ułatwić hodowlę roślin odpornych na stres.

W publikacji **H2** badałam zjawiska związane z aklimatyzacją roślin do niedoboru wody i skutków suszy, znajdując korelacje między akumulacją określonych metabolitów, takich jak pochodne kwasu sinapowego i flawonoidy, a określonymi cechami fenotypowymi, takimi jak łodyga boczna i plon słomy. Aklimatyzacja do deficytu wody to proces nieodziedziczalny, który modyfikuje struktury i funkcje roślin. Jednym z następstw suszy jest nadmierne gromadzenie się związków niskocząsteczkowych, wpływających na wiele procesów fizjologicznych oraz na produkcję biomasy i plonów. Wywołane suszą przeprogramowanie metabolomiczne wiązało się ze zwiększoną akumulacją związków zawierających grupy metylowe. Badanie wykazało korelację między gromadzeniem się pochodnych kwasu sinapinowego a cechami fenotypowymi dotyczącymi wydajności pędów bocznych i słomy. Akumulacja metabolitów zawierających grupy metylowe, takie jak glukozyd kwasu sinapinowego i acylowane kwasem synapinowym glikozydy apigeniny, wskazują na znaczenie tego związku we wzmacnianiu ścian komórkowych. Flawonoidy, zwłaszcza zawierające jeden hydroksyl w strukturze pierścienia B, zostały powiązane z transportem auksyn z pędów

głównych do bocznych, a ich gromadzenie jest ważne dla wzrostu biomasy w warunkach deficytu wody. Ponadto, metody LC-MSⁿ umożliwiły wykrycie nowych, związanych z suszą metabolitów, wśród których dominowały struktury acylowanych flawonoidów, w kilku przypadkach nawet acylacji dwoma resztami kwasów hydroksycynamonowych (disynapoyloizowiteksyny 2"-*O*-glukozyd). Wydaje się jednak, że najważniejszy efekt metylacji flawonoidów zachodzącej podczas suszy dotyczy przesunięcia maksimum absorpcji UV w kierunku dłuższych długości fal, co wcześniej sugerowano (Stochmal and Oleszek, 2007). Warto podkreślić, że u pszenicy przejście przez suszę powoduje wzrost tolerancji na UV-B, i vice versa, co wskazuje na krzyżowanie się mechanizmów tolerancji na suszę i UV-B (Veselá et al., 2022).

Optymalizacja schematu przetwarzania danych metabolomicznych z materiału roślinnego (H3 i H4)

W ostatnich latach metabolomika staje się coraz ważniejszym obszarem badań w kontekście poprawy różnych cech hodowlanych, a także dla badań roślin modelowych w celu zrozumienia podstawowych procesów molekularnych. Profilowanie metabolitów za pomocą chromatografii cieczowej z detektorami UV i/lub FLR, jest szybką i dokładną metodą analizy ilościowej związków takich jak karotenoidy, chlorofile, fenole, flawonoidy i betalainy. Metody HPLC-UV są również powszechnie stosowane do oznaczania mykotoksyn w żywności oraz do przesiewowego profilowania metabolitów. W ekstraktach roślinnym występują tysiące różnych metabolitów o zbliżonych właściwościach fizyko-chemicznych, stąd zjawisko ko-elucji metabolitów i nakładanie się pików chromatograficznych jest w tym przypadku bardzo powszechne. Publikacja **H3** opisuje dwie unikalne metody procesowania dużych zestawów danych LC-UV ze szczególnym uwzględnieniem rozwiązań dedykowanych dla separacji nakładających się pików. Pierwsza metoda wykorzystuje klasteryzację, podczas gdy druga metoda opiera się na analizie funkcjonalnej głównych składowych (FPCA). Obie metody obejmują normalizację danych, usuwanie linii bazowej, wyrównywanie czasu retencji i detekcję pików. Wyniki symulowanych i eksperymentalnych danych uzyskanych z badania zmian metabolomicznych w liściach jęczmienia podczas stresu suszy sugerują, że obie metody są odpowiednie do separacji ko-eluujących pików. FPCA ma dodatkową zaletę oceny zmienności poszczególnych związków obecnych w tych samych pikach różnych chromatogramów, jak to zostało zademonstrowane na przykładach kilku dużych zestawów danych z analizy UPLC-PDA odpowiedzi roślin jęczmienia na różne bodźce środowiskowe.

Postępy w zakresie czułości i selektywności systemów LC-MS prowadzą do uzyskiwania dużych zestawów danych z pojedynczej próbki. W rezultacie konieczne stało się rozwijanie narzędzi do ich przetwarzania, poprawy dokładności i ewaluacji uzyskanych wyników. Jednocześnie konieczne stało się wypracowanie narzędzi statystycznych do filtrowania informacji istotnych ze złożonych, wieloczynnikowych eksperymentów. Złożoność i wielostopniowa natura procesowania danych LC-MS może prowadzić do generowania nieświadomych błędów i uzyskania niepoprawnych wyników. Moje staranne i szczegółowe przygotowanie do pracy z metabolomiką roślin za pomocą LC-MS zostało podsumowane w pracy przeglądowej **H4** dotyczącej zastosowania metabolomiki w badaniu reakcji roślin na stresy środowiskowe. O ile mi wiadomo, była to pierwsza publikacja z kompleksowym wyjaśnieniem zasad i problemów stosowania algorytmów przetwarzania danych LC-MS. Ponadto, położyłam szczególny nacisk na przegląd dostępnych narzędzi, w tym platform internetowych, do przetwarzania danych oraz do wyodrębniania metabolitów istotnie różnicujących pod kątem statystycznym i biologicznym z wieloczynnikowych zestawów danych. Publikacja podkreśla znaczenie walidacji i integracji z innymi poziomami biologii systemów dla pełnego zrozumienia molekularnych mechanizmów układu metabolicznego roślin podczas stresu. Przedstawiłam także przykłady wykorzystania metabolomiki do poszukiwania molekularnych biomarkerów istotnych dla hodowli roślin o zwiększonej odporności i produkcji plonów. Dodatkowo, przegląd kontrastuje techniki analityczne oparte na chromatografii gazowej (GC) i jądrowym rezonansie magnetycznym (NMR) z podejściami LC-MS, zwracając uwagę na zmniejszoną czułość tych pierwszych, ale proste jakościowe możliwości analityczne.

Identyfikacja metabolomicznych biomarkerów reakcji roślin z rodziny wiechlinowatych na infekcję *Fusarium* (H5)

Patogeny grzybowe *Fusarium* spp., w tym szczególnie *F. culmorum*, są przyczyną fuzariozy kłosów (FHB) upraw zbożowych na całym świecie. Choroba prowadzi do drastycznego zmniejszenia plonów i produkcji mykotoksyn w ziarnie, takich jak zearalenon (ZEN) i deoksyniwalenol (DON), co eliminuje z użytku całe zbiory. Chociaż pewien postęp został dokonany w zrozumieniu mechanizmów obronnych przeciwko infekcji *Fusarium* w niektórych gatunkach zbóż, tj jak poznawanie QTL związanych z odpornością na FHB w jęczmieniu (Huang et al., 2018), wciąż istnieje ograniczona wiedza na temat molekularnej odpowiedzi na FHB wspólnej dla wielu gatunków. W roślinach z rodziny wiechlinowatych

różne metabolity obronne pochodzą ze szlaku biosyntezy fenylopropanoidów/kwasu szikimowego. Ekspresja genów kluczowych enzymów biosyntezy fenylopropanoidów zwiększa się w odpowiedzi na *Fusarium* i produkcję DON. Akumulacja amidów kwasu hydroksycynamonowego i glikozydów kwasów fenolowych w odpowiedzi pszenicy na FHB korelowała z pogrubieniem ściany komórkowej i inhibicją wzrostu patogenu. Ostatnio zwrócono również uwagę na właściwości przeciwgrzybicze poliamin, tj. putrescyna, spermidyna i spermina jako szybko indukowane w FHB i przyczyniające się do indukcji biosyntezy DON przez *Fusarium* (Wojtasik et al., 2015). Poliaminy acylowane kwasami hydroksycynamonowymi gromadzą się podczas patogenezы w wielu gatunkach zbóż.

W wielodyscyplinarnych badaniach opisanych w publikacji **H5** pokazałam różnice w zmianach molekularnych i fizjologicznych w ziarnach genotypów jęczmienia i pszenicy o zróżnicowanej odporności na FHB, jak również w modelowej trawie *B. distachyon*. Ilościowe pomiary DNA *F. culmorum* i jego toksyn pozwoliły na zobrazowanie postępu infekcji u różnych genotypów roślin z rodziny *Poaceae* oraz wyodrębnienie genotypów o zwiększonej i obniżonej podatności na patogena. Wrażliwe genotypy jęczmienia i pszenicy wykazywały wyższy poziom biomasy grzyba w porównaniu do genotypów odpornych, podczas gdy *B. distachyon* wykazywał pośredni poziom podatności na *F. culmorum*. Badałam także poziom akumulacji mykotoksyn, w tym trichotecenów i estrogenowego zearalenonu, które były dodatnio skorelowane z biomasą patogenu w ziarnie. Akumulacja mykotoksyn była zróżnicowana we wszystkich badanych genotypach i mogła wpływać na zmiany fizjologiczne i molekularne w roślinach po inokulacji *F. culmorum*. Zaobserwowana powszechność akumulacji zearalenonu może wpływać na agresywność grzyba w kłosach roślin.

Pojemność antyoksydacyjna oraz antyoksydanty niskocząsteczkowe odgrywają kluczową rolę w detoksykacji ROS oraz w utrzymaniu równowagi fotosyntetycznej. *F. culmorum*, patogen hemibiotroficzny, korzysta z martwych tkanek uszkodzonych przez ROS. W genotypach odpornych jęczmienia i pszenicy, pojemność antyoksydacyjna pozostawała stała nawet podczas zaawansowanej infekcji *F. culmorum*, natomiast akumulacja metabolitów wtórnych wzrosła. Obserwacja ta pozwoliła na sformułowanie sugestii, że genotypy odporne wykazywały wysoką efektywność układu antyoksydacyjnego, co ograniczało postęp patogenezы. Kompensacja potencjału antyoksydacyjnego podczas infekcji nastąpiła poprzez wzrost zawartości antyoksydantów niskocząsteczkowych we wszystkich badanych genotypach. Odpowiedź fizjologiczna *B. distachyon* na *F. culmorum* była zbliżona do tej u odpornych genotypów jęczmienia i pszenicy, jednak zmiany metabolomiczne były silnie zróżnicowane.

Głównym celem badań przedstawionych w publikacji **H5** było zidentyfikowanie podobieństw i różnic w odpowiedzi immunologicznej różnych gatunków i genotypów zbóż na inokulację *F. culmorum*. Zidentyfikowałam wspólne i genotypowo-specyficzne metabolity zmieniające akumulację w odpowiedzi na inokulację *F. culmorum*. Infekcja spowodowała masowe przeprogramowanie metabolomu roślin, ale z dużym poziomem konserwatyzmu między badanymi gatunkami. Badanie wykazały również udział w odpowiedzi immunologicznej metabolitów związanych z metabolizmem węglowodanów i ewolucyjnie konserwatywnymi szlakami biosyntezy fenylopropanoidów, flawonoidów i porfiryń. Obserwowałam również silne zmiany w akumulacji metabolitów związanych z magazynowaniem cukrów w nasionach i procesami kiełkowania. Największe zmiany zaobserwowałam dla struktur fenylopropanoidowych, takich jak kwasy hydroksycynamonowe, chalcony, flawany, flawanole i antocyjany, które są związane z usuwaniem ROS lub hamowaniem peroksydacji lipidów. Zauważono już wcześniej, iż akumulacja amidów kwasu hydroksycynamonowego i glikozydów kwasów fenolowych w odpowiedzi na FHB wiąże się z pogrubieniem ścian komórkowych (Gunnaiah et al., 2012). W pszenicy genotyp odporny na FHB wykazywał zwiększoną akumulację kwasu *p*-kumarowego w tkankach kłosek w porównaniu do genotypu podatnego na infekcję *F. culmorum* (SIRANIDOU et al., 2002). Amoniakoliza fenyloalaniny (PAL), enzym zaangażowany w biosyntezę szlaku fenylopropanoidów, odgrywa kluczową rolę w odporności pszenicy na *F. graminearum* i działanie mykotoksyny deoksynivalenol (DON). Zwiększona transkrypcja PAL w zainfekowanej tkance kłosek pszenicy została skorelowana z odpornością na FHB (Steiner et al., 2009). Inne kluczowe enzymy w biosyntezie fenylopropanoidów, takie jak dehydrogenaza alkoholu cynamonowego, *O*-metylotransferaza kawoilo-CoA, *O*-metylotransferaza flawonoidowa i peroksydaza, są również indukowane w odpowiedzi na infekcję *F. graminearum* i DON (Pasquet et al., 2016).

Struktury charakterystyczne dla genotypów mniej podatnych na infekcję należały do metabolitów azotowych związanych z "Metabolizmem kofeiny" oraz do aminokwasów takich jak prolina, alanina i seryna. Kwasy dikarboksylowe zawierające siarkę i związki pokrewne z "Metabolizmem cysteiny i metioniny", zostały również powiązane ze zwiększoną odpornością na patogena. Zaobserwowałam z kolei, że sama metionina i kwas 12-hydroksyjasmonowy są związane ze zwiększoną podatnością na infekcję *F. culmorum*. Akumulacja benzoksazynoidów była zauważona w przypadku odpowiedzi immunologicznej u pszenicy, ale nie u innych gatunków. W **H5** skupiłam się na interakcji między roślinami a patogenem *F. culmorum* i

produkcji przeciwutleniaczy i fitoaleksyn, a także ich korelacji z szlakami gospodarowania cukrami i fotosyntezą. Wyniki uwzględniły złożoną interakcję między metabolitami roślinnymi a drobnoustrojami chorobotwórczymi oraz znaczenie konserwowanych i specyficznych dla genotypu elementów w odporności roślin. W artykule stwierdziłam, że badania metabolomiczne mogą potencjalnie zidentyfikować biomarkery odporności na FHB i pomóc w rozwoju gatunków roślin uprawnych o zwiększonej odporności.

Charakterystyka metabolomu *Brachypodium distachyon* z uwzględnieniem specyficzności genotypów i organów (H6)

B. distachyon, zwany też kłosownicą dwukłoskową, to modelowa roślina do badań genomowych, blisko spokrewniona z pszenicą i jęczmieniem (Draper et al., 2001). Charakteryzuje się małym genomem oraz szybkim cyklem życiowym, co czyni go idealnym przedmiotem badań. Od czasu zsekwencjonowania genomu *B. distachyon*, przeprowadzono wieloaspektowe badania nad tym organizmem, w tym badania interakcji z patogenami roślin zbożowych, które ujawniły, że *Fusarium* spp. infekuje *B. distachyon* w sposób podobny do pszenicy (Peraldi et al., 2014). Mimo to, profil metabolomiczny *B. distachyon* pozostaje w dużej mierze nieznany, mimo potencjalnej roli w interakcjach roślina-środowisko. W związku z tym, w badaniach opisanych w publikacji **H6** zastosowałam celowane i niecelowane techniki LC-MS, aby zidentyfikować specjalistyczne metabolity w dwóch genotypach Bd21 i Bd3-1, różniących się morfologią, rozwojem oraz odpornością na stres.

Analiza porównawcza kłosów, liści i korzeni ujawniła szlaki metaboliczne istotnie różniące badane organy i genotypy. Na podstawie dwóch komplementarnych systemów LC-MS, tj. systemu wysokiej rozdzielczości LC-MS/MS z detektorem typu orbitrap oraz systemu LC-MSⁿ z detektorem typu pułapka jonowa, zostały zidentyfikowane 93 metabolity, głównie należące do fenylopropanoidów oraz flawonoidów. Widma masowe MSⁿ zostały wykorzystane do identyfikacji złożonych struktur, takich jak glikokonjugaty flawonoidów, podczas gdy analiza wysokiej rozdzielczości MS/MS była stosowana do potwierdzenia struktur zaproponowanych na podstawie widm MSⁿ. Unikalne połączenie dwóch systemów LC-MS pozwoliło na opisanie struktur specyficznych dla *B. distachyon*, których nie można zadnotować za pomocą zautomatyzowanych podejść bioinformatycznych. Metabolity zostały zaklasyfikowane na poziomach 1-3 zgodnie z Inicjatywą Standardów Metabolomicznych (Sumner et al., 2007).

Szczegółowa analiza widm masowych uzyskanych podczas analizy MS/MS i MSⁿ organów *B. distachyon*, w połączeniu z przeszukiwaniem baz danych i literatury, skupiła się na pochodnych fenylopropanoidów i flawonoidów. Kwasy fenolowe i hydroksycynamonowe oraz ich pochodne były obecne w dużych ilościach we wszystkich badanych organach. Kwas *p*-kumarynowy, kwas kawowy i ferulowy zostały zidentyfikowane jako koniugaty z kwasami (metylo)chinowymi, kwasami cukrowymi lub poliaminami. Dodatkowo, kwas kawowy i ferulowy były obserwowane jako wolne cząsteczki i zidentyfikowane poprzez porównanie z ich standardami.

Najlichniesze sygnały wykryte we wszystkich badanych organach odpowiadały pochodnym kwasów uronowych, zwłaszcza kwasu treonowego skonjugowanego z kwasami hydroksycynamonowymi. Dodatkowo, wybrałam 30 metabolitów o najwyższej różnorodności między badanymi genotypami i zwizualizowałam różnice w ich akumulacji. szczególnie licznie reprezentowane różnicujące związki należały do flawonoidów, takich jak pochodne flawonu apigeniny i proantocyjanidyny B. Co ciekawe, związek tego typu, 3-*O*-glukozyd cyjanidyny (chryzantemina) już wcześniej została opisana jako metabolit różnicowo gromadzący się w kłosach różnych genotypów *B. distachyon* (Onda et al., 2019). Kwas metylotiopentylmalonowy, metabolit zawierający siarkę w łańcuchu 2-oksokarboksylowym, został zidentyfikowany jako jeden z najbardziej różnicujących metabolitów, z dominacją w Bd3-1, zwłaszcza w korzeniach. Duże różnice w akumulacji pojawiły się wśród struktur należących do giberelin, które są ważnymi czynnikami dla rozwoju korzeni u roślin jednoliściennych. Metabolity zawierające cztery atomy azotu, w tym alkaloidy purynowe, różniły się również istotnie między dwoma genotypami. Przeprowadziłam także analizę funkcjonalną obejmującą zbadanie szlaków metabolicznych w obu genotypach *B. distachyon*. Metabolizm histydyny i witaminy B6 pokrywał się w obu genotypach zarówno w liściach jak i kłosach, podczas gdy szlak metabolizmu cysteiny i metioniny różnicował specyficznie między kłosami obu linii, co może wskazywać na różnice w asymilacji związków siarkowych.

W artykule **H6** starałam się zrozumieć różnice metaboliczne między dwiema liniami *B. distachyon*, Bd21 i Bd3-1. Najmniejsze różnice zaobserwowałam w korzeniach, a największe w kłosach. Główne związki różnicujące należały do giberelin, znanych jako czynniki wydłużania korzeni u roślin jednoliściennych. Metabolizm histydyny i witaminy B6 miał wspólny wpływ na liście i kłosy, podczas gdy szlak metabolizmu cysteiny i metioniny szczególnie różnił się między kłosami obu linii, co wskazuje na możliwe różnice w asymilacji siarczanów.

Identyfikacja metabolomicznych biomarkerów reakcji roślin z rodziny kapustowatych w odpowiedzi immunologicznej wywołanej wzorcem w kontekście ewolucyjnym (H7 i H8)

W badaniach opisanych w **H7** i **H8** prowadzono badania nad odpornością wyzwalaną wzorcem (PTI) w kontekście ewolucyjnym. Pomimo znaczenia PTI dla adaptacji roślin do środowiska, nasze zrozumienie ewolucji PTI pozostaje ograniczone. Zastosowane w publikacji **H7** porównawcze podejście metabolomiczne zostało wykorzystane do zbadania ewolucji odpowiedzi immunologicznej wywołanej wzorcem (PTI) między różnymi gatunkami roślin z rodziny kapustowatych. Międzynarodowa grupa badawcza skupiła się na zestawie genów, które zwykle reagują na molekularny wzorzec związany z mikroorganizmami (MAMP), flg22. Stwierdzono, że zmienność PTI na poziomie transkryptomu u różnych gatunkach *Brassicaceae* nie była zgodna z ich podobieństwem filogenetycznym. Badanie wykazało również, że sygnalizacja kwasu salicylowego (SA) była odpowiedzialna za trwałe przeprogramowanie transkrypcji w *A. thaliana*. Jednak sama akumulacja SA nie wyjaśnia odmiennej czasowej dynamiki przeprogramowania transkrypcji w tych roślinach *Brassicaceae*. Badania ujawniły gatunkowo-specyficzne wzorce ekspresji genów u badanych roślin, zaangażowanych w szereg procesów biologicznych, także związanymi z metabolizmem wtórnym. Ta obserwacja skłoniła do badań nad profilami metabolitów roślin z rodziny kapustowatych w odpowiedzi na flg22. Odkryłam, że większość zmian w akumulacji metabolitów wywołanych przez flg22 była gatunkowo-specyficzna, co wskazuje na znaczącą dywersyfikację ich metabolomów w odpowiedzi na flg22. To podkreśla różnorodność metabolitów zaangażowanych w odpowiedź na ten wzorzec molekularny, pomimo bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego roślin *Brassicaceae*. Ten interesujący fenomen został dalej rozszerzony i uzupełniony w badaniach opisanych w **H8**, które dotyczyły zmian ewolucyjnych w szlaku biosyntezy produkcji glukozynolanów w różnych organach przedstawicieli plemienia *Camelineae*, w tym gatunków *A. thaliana*, *Capsella*, *Camelina* i *Neslia*. Glukozynolany to specjalistyczne metabolity pełniące funkcję obronną roślin. Składają się z reszty β -tioglikozydu połączonego z sulfonowanym aldoksymem z łańcuchem bocznym, którego właściwości są determinowane przez prekursorowy aminokwas. Glukozynolany można podzielić na trzy grupy: alifatyczne, benzytowe i indolowe. Glukozynolany i ich enzymy hydrolityczne, myrozynazy, tworzą system obronny, który jest aktywowany w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, prowadzące do powstania izotiocyjanianów. Biosynteza wszystkich rodzajów glukozynolanów oparta jest na szlaku podstawowym, a także na szlakach modyfikacji prekursorów specyficznych dla każdego

typu. W **H8** zidentyfikowano geny biosyntezy glukozynolanów oraz ewolucyjne zmiany w ich transkrypcji i sekwencjach białkowych. Wykorzystaliśmy system LC-MS/MS do analizy ekstraktów z różnych części roślin, w tym liści, korzeni, kwiatostanów i łodyg, i zidentyfikowaliśmy 30 różnych glukozynolanów, przy czym *A. thaliana* wytwarzała największą liczbę struktur. Wszystkie gatunki były w stanie wytwarzać glukozynolany alifatyczne i indolowe, ale glukozynolany benzytowe wykryto tylko u *A. thaliana*. Doszliśmy do wniosku, że badane gatunki miały zmniejszoną różnorodność strukturalną glukozynolanów w porównaniu do *A. thaliana*. Wyniki badań **H8** wskazują, że glukozynolany są powszechne w łodygach i korzeniach, ale prawie nie są produkowane w liściach badanych roślin. Wyniki sugerują, że regulacja biosyntezy glukozynolanów u gatunków *Camelineae* różni się od tej u *A. thaliana* i jest prawdopodobnie związana z ich unikalnymi wzorcami akumulacji glukozynolanów w różnych organach. Dodatkowo, istnieje zmniejszona różnorodność strukturalna alifatycznych glukozynolanów pochodzących z metioniny, natomiast podwyższona akumulacja rzadkich długołańcuchowych AG, co jest skorelowane ze zmianami ewolucyjnymi w genach kodujących syntazy metylotioalkilomalalanowe. Występowanie długołańcuchowych glukozynolanów alifatycznych w pleminiu *Camelineae* sugeruje przewagę adaptacyjną ze względu na ich zwiększoną aktywność biologiczną, ale wpływ charakteru chemicznego, w tym długości łańcucha bocznego, na toksyczność ITC wobec roślinożerców lub patogenów nie jest w pełni zrozumiany. Z kolei szlak biosyntezy indolowych glukozynolanów pochodzących z tryptofanu prawdopodobnie został ewolucyjnie wyłączony u badanych gatunków.

4.3.4. Podsumowanie i perspektywy

Moje naukowe osiągnięcie miało kilka ważnych efektów, w tym:

- Opracowanie i optymalizacja metodologii dla porównawczej metabolomiki wspomaganej podejściem statystycznym w celu poszukiwania biomarkerów odporności na suszę u roślin.
- Wykazanie, że integracja metabolomiki z genomiką lub danymi fenotypowymi oferuje nowe spojrzenie na poszukiwanie biomarkerów odporności na suszę z perspektywy biologii systemowej.
- Opracowanie i optymalizacja metodologii dla prowadzenia kompleksowej analizy metabolomicznej elementów związanych z odpornością roślin na patogeny grzybowe.

- Wykazanie skuteczności wykorzystania metabolomiki opartej na chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej do poszukiwania biomarkerów odporności na *Fusarium* w rodzinie *Poaceae*.
- Porównanie i identyfikacja procesów metabolicznych i sygnalizacyjnych zależnych od odporności u roślin z wysoką i niską odpornością na infekcję *Fusarium* w rodzinie *Poaceae*.
- Opisanie metabolomu różnych organów i genotypów modelowej rośliny z rodziny *Poaceae*, *B. distachyon*.
- Podkreślenie znaczenia metabolomiki w badaniach ewolucji odporności roślin.
- Wykazanie dynamicznych zmian w składzie metabolomicznym podczas ewolucji roślin z rodzaju *Camelineae*.

Podsumowując, moje badania przyczyniły się do rozwoju dziedziny metabolomiki i jej zastosowań w naukach roślinnych, zwłaszcza w badaniach odporności roślin na stresy środowiskowe i choroby. Przyszłe badania mogą opierać się na tych wynikach w celu opracowania praktycznych zastosowań dla poprawy wydajności i zrównoważonego rozwoju upraw.

Kontynuację pracy badawczej planuję w oparciu o zastosowaniem podejść multiomicznych opartych na technikach spektrometrii mas w ramach projektu nr 2022/45/B/NZ9/03572, NCN, OPUS zatytułowanego "Opis kluczowych mechanizmów koordynacji i priorytyzacji reakcji jęczmienia na jednoczesne stresy biotyczne i abiotyczne - podejście multiomiczne". Głównym celem obecnego projektu jest identyfikacja unikalnych składników molekularnych związanych z mechanizmami kompensacyjnymi w reakcjach roślin na łączone stresy biotyczne i abiotyczne. Wykorzystanie platformy multiomicznej jest idealne do osiągnięcia celu projektu poprzez dokładne opisanie złożoności tych mechanizmów oraz zrozumienie współdziałania fitohormonów w ich regulacji. Dwie odmiany jęczmienia (*Hordeum vulgare*) o różnej tolerancji na suszę i jednocześnie infekowane patogenem z rodzaju *Fusarium* będą służyć do poszukiwania markerów molekularnych odporności zbóż na stresy łączone. Przeanalizowanie zmian w metabolomie, lipidomie, proteomie i transkryptomie przyczyni się do poszerzenia naszej wiedzy na temat tła molekularnego w ważnej agronomicznie rodzinie *Poaceae*. Projekt ten ma potencjał wzmocnienia naszego zrozumienia, jak rośliny reagują na wiele jednoczesnych stresów i może mieć praktyczne zastosowania w opracowywaniu bardziej odpornych odmian roślin uprawnych, aby zapewnić bezpieczeństwo żywnościowe w obliczu zmieniających się warunków środowiskowych.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH - Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.

Moje badania obejmują wykorzystanie chromatografii cieczowej z detektorem UV oraz chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas do badania metabolitów w interakcjach roślin z otoczeniem. Analizy metabolomiczne w kontekście biologii systemowej były moim głównym tematem prac prowadzonych po osiągnięciu stopnia doktora w Instytucie Genetyki Roślin PAN, natomiast analizy metabolomiczne w kontekście ewolucyjnym są motywem przewodnim mojej pracy naukowej związanej z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN.

Ważnym aspektem mojej pracy jest opracowywanie i optymalizacja metod analizy masowej, w tym LC-MS/MS i LC-MSⁿ, na różnych materiałach roślinnych, takich jak tkanki, kultury *in vitro* i wydzieliny korzeniowe. Ta szeroka wiedza analityczna pozwala mi prowadzić interdyscyplinarne projekty badawcze obejmujące biologię, chemię i fitoterapię.

Ponadto współpracowałem z grupami badawczymi z Polski i za granicą, co zaowocowało publikacjami naukowymi (ich liczba jest podana w nawiasach). Wyniki współpracy będą omówione szczegółowo w następnych podsekcjach (5.1 oraz 5.2):

- 2017-2023: zespół badawczy prof. dr hab. Monika Rakoczy-Trojanowska, Wydział Genetyki, Hodowli Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Warszawie (1)
- 2020-2022: zespół badawczy dr. Stéphane'a Hacquarda, Instytut Maxa Plancka ds. Hodowli Roślin, Kolonia, Niemcy (1);
- 2017-2022: zespół badawczy dr. Kenichi Tsuda, Zakład Interakcji Roślina-Mikroorganizm, Instytut Maxa Plancka ds. Hodowli Roślin, Kolonia, Niemcy (2);
- 2013-2020: zespół badawczy prof. dr hab. Przemysław Ł. Mikołajczaka, Katedra Farmakologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (3)
- 2013 roku zespół badawczy prof. Przemysław M. Mrozkiewicza z Laboratorium Farmakogenetyki Doświadczalnej w Katedrze Farmacji Klinicznej i Biofizyce Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (1).
- 2013 - 2020 roku dr hab. Marcin Ożarowski z Katedry Biotechnologii w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu (9).
- 2013 - 2015 prof. dr hab. Paweł Bednarek z zespołem badawczym z Katedry Biochemii Naturalnych Produktów w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (1)

- 2010 - 2017 prof. dr hab. Iwona Szarejko z zespołem badawczym z Uniwersytetu Śląskiego, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Katedry Genetyki w Katowicach (1)
- 2010 - 2022 roku prof. dr hab. Paweł Krajewski z zespołem badawczym z Katedry Biometrii i Bioinformatyki w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (5)
- Od 2010 do 2020 roku dr Anetta Kuczyńska z zespołem badawczym prof. IGR z Katedry Biotechnologii w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (3)
- W latach 2010-2015 prof. dr hab. Maciej Stobiecki z zespołem badawczym z Katedry Biochemii Naturalnych Produktów w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Polska (2)
- 2010-2013 zespół badawczy dr Juana Francisco Zamora-Natera z Uniwersytetu Guadalajara, Meksyk (2)

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie mojego doktoratu współpracowałam z innymi grupami badawczymi, aby rozwijać swoje umiejętności związane z interpretacją widm masowych i przetwarzania danych metabolomicznych. Przykładowo, współpracowałam z zespołem prof. Macieja Stobieckiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN nad profilowaniem metabolitów łubinów meksykańskich. Badania te, opublikowane odpowiednio w *Phytochemistry* i *Journal of Natural Products* w 2013 i 2010 roku, opisywały identyfikację glikokonjugatów flawonoidów z 12 gatunków łubinów za pomocą dwóch systemów LC/MS. Za pomocą eksperymentów CID/MSⁿ zidentyfikowaliśmy 175 glikokonjugatów flawonoidów i scharakteryzowaliśmy ich struktury poprzez identyfikację aglikonów, typu reszt cukrowych i podstawień acylowych. Informacje uzyskane z profilowania koniugatów flawonoidów zostały wykorzystane do porównania chemotaksonomii badanych gatunków łubinów, co doprowadziło do wyraźnego rozróżnienia między łubinami północnoamerykańskimi i śródziemnomorskimi.

W ramach projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego prowadzonego przez prof. Przemysława M. Mrozikiewicza z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin z udziałem Katedry Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, przeprowadziłam badania profilowania metabolitów rozmarynu (*Rosmarinus officinalis*) mających istotny wpływ na pamięć modelowych zwierząt. Wyniki opublikowane w czasopiśmie *Fitoterapia* w 2013 roku, oceniały efekty podania ekstraktu z liści rozmarynu na reakcje behawioralne i poznawcze szczurów związane z aktywnością acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE) w hipokampie

i kory przedczołowej. Moim zadaniem badawczym w projekcie było profilowanie metabolitów wtórnych w ekstrakcie z liści. Wyniki sugerują, że metabolity zawarte w *R. officinalis* przyczyniają się do poprawy pamięci długotrwałej u szczurów, co można częściowo wyjaśnić poprzez hamowanie aktywności AChE w mózgu szczurów. Badania sugerują zatem, że *R. officinalis* może być cennym narzędziem w zapobieganiu i leczeniu demencji.

Wysoka jakość moich badań w dziedzinie metabolomiki fenolowych metabolitów wtórnych znalazła odzwierciedlenie w moich publikacjach w międzynarodowych czasopismach z listy JCR, z całkowitym wskaźnikiem wpływu 9,513 i łączną liczbą cytowań wynoszącą 215, opublikowanych między 2010 a 2013 rokiem.

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Techniki charakterystyki strukturalnej związków fenolowych

Podczas studiów doktoranckich w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, a konkretnie w Zakładzie Genetyki Patogenów i Odporności Roślin, Zespół Metabolomiczny, pod kierunkiem prof. Piotra Kachlickiego, moje badania koncentrowały się na projekcie Polapgen-BD (WND-POIG.01.03.01-00-101/08, POIG), którego celem była identyfikacja molekularnych markerów odporności na suszę. Wyniki mojej pracy doktorskiej zostały opublikowane w Journal of Mass Spectrometry w 2015 roku (Piasecka, et al. 2015; 50 (3): 513-532). Przeprowadziłam badania, które koncentrowały się na profilowaniu i analizie strukturalnej fenolowych metabolitów wtórnych w ekstraktach metanolowych uzyskanych z liści dziewięciu różnych odmian jęczmienia. Opracowałam i zastosowałam cztery różne podejścia analityczne w celu uzyskania komplementarnych informacji strukturalnych o fenolowym metabolomie jęczmienia. Niskorozdzielczy spektrometr masowy wyposażony w analizator pułapek jonowych dostarczył szczegółowych informacji o strukturze 165 metabolitów jęczmienia na podstawie fragmentacji związków. Wartość badania została podkreślona przez zastosowanie dwóch trybów jonizacji, które dostarczyły komplementarnych informacji na temat glikozydów i acylowanych glikozydów flawonów, acylowanych poliamin i pochodnych kwasu hydroksycynamonowego. Dodatkowo, po raz pierwszy szczegółowo opisałam mechanizm fragmentacji hordatyn, flawonów acylowanych bezpośrednio na aglikonie, izomerów kwasów chlorogenowych i pochodnych kwasu hydroksyferulowego.

Wyniki identyfikacji związków zostały następnie potwierdzone poprzez analizę widm masowych o wysokiej rozdzielczości przy użyciu spektrometru tandemowego z detektorem czasu przelotu jonów. Za pomocą analiz NMR ustaliłam struktury pięciu metabolitów, w tym

trzech nieznanych wcześniej w jęczmieniu. Opracowano również procedury chromatografii preparatywnej do izolacji i oczyszczania wybranych metabolitów z liści jęczmienia. Zastosowanie dwustopniowej separacji z dwoma rodzajami materiałów wypełniających kolumny, poliamidem i RP C18, znacznie poprawiło wydajność separacji i pozwoliło na rozszerzoną identyfikację 109 metabolitów obecnych w śladowych ilościach. Metoda dwuetapowej separacji metabolitów była przedmiotem zgłoszenia patentowego. W ramach badań zidentyfikowałam szeroki zakres struktur dotychczas nieznanych w jęczmieniu, w tym takie związki jak 6-C-(6"-O-glukozylo)-glikozydy flawonów, poliaminy acylowane kilkoma kwasami hydroksycynamonowymi oraz izomery kwasu chlorogenowego. Profilowanie fenolowych metabolitów wtórnych wykorzystano również do chemotaksonomicznej klasyfikacji dziewięciu odmian jęczmienia z różnych regionów geograficznych oraz do znalezienia markerów metabolomicznych, które różnicowały odmiany w warunkach suszy.

Umiejętności badawcze, które zdobyłam podczas prac związanych z rozprawą doktorską, a w szczególności interpretacja widm masowych, zostały podsumowane w artykule przeglądowym autorstwa Kachlicki i in. z 2016 roku (Molecules 2016, 21 (11): 1494). W artykule omówiono zastosowanie spektrometrii mas w charakterystyce strukturalnej glikokonjugatów flawonoidowych. Przedstawiono charakterystykę strukturalną związków fenolowych, omówiono różne techniki spektrometrii mas oraz kilka strategii do charakteryzowania izomerycznych i izobarycznych glikokonjugatów flawonoidowych i ich pochodnych. Zastosowanie spektrometrów z detektorem typu pułapka jonowa umożliwia wielokrotną fragmentację jonów, co dostarcza dodatkowych informacji na temat zależności strukturalnych fragmentów. Jest to szczególnie istotne dla analizy flawonoidów i ich pochodnych, gdzie konieczne może być scharakteryzowanie aglikonów, które występują w różnych kombinacjach. Do identyfikacji aglikonów w koniugatach flawonoidowych konieczna jest co najmniej fragmentacja MS^3 , którą można osiągnąć poprzez fragmentację w źródle jonów (tzw fragmentacja pseudo- MS^3) w przypadku tandemowych spektrometrów mas lub kolejną fragmentację w spektrometrach typu pułapka jonowa. Te metody pozwalają na rozróżnienie izomerów położeniowych aglikonów o różnych wzorach hydroksylacji.

5.2.2. Metabolomika w badaniach fitofarmakologicznych dotyczących leków na choroby neurodegeneracyjne

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam owocną współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu oraz Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych, na rzecz

badania profili metabolicznych roślin o potencjale fitofarmakologicznym. Podczas tych badań wykorzystywałam, jak poprzednio, dwie uzupełniające się metody analityczne: LC-MS/MS i LC-MSⁿ, wspierane przez analizy przesiewowe z wykorzystaniem UPLC-PDA. Współpraca z zespołem badawczym prof. Przemysława Ł. Mikołajczaka z Katedry Farmakologii na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu, umożliwiła mi dyskusję na temat globalnego trendu wykorzystywania źródeł naturalnych w celu odkrywania i opracowywania nowych leków zapobiegających lub opóźniających postęp chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona. Mój wkład w tę współpracę polegał na identyfikacji biologicznie aktywnych związków pochodzących z ekstraktów roślinnych. Profilowanie metabolitów roślin należących do różnych klas taksonomicznych poszerzyło moją wiedzę na temat bogactwa i różnorodności fitozwiązków a także dało mi doświadczenie w interpretacji fragmentacyjnych widm mas metabolitów należących do różnych grup strukturalnych.

Publikacja [Ożarowski et al. (2015); Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 145140] dotyczyła wpływu subchronicznej administracji 70% ekstraktu etanolowego z korzeni Mikołajka płaskolistnego (*Eryngium planum* L.) na zachowanie i reakcje poznawcze szczurów. Mierzono także poziomy ekspresji i aktywności acetylocholinoesterazy (AChE), butyrylocholinoesterazy (BuChE) i beta-sekretazy (BACE-1) w hipokampie i korze przedczołowej tkanek szczurzych. Wyniki pokazały, że ekstrakty fitozwiązków z *E. planum* poprawiają długotrwałą pamięć u szczurów. W ramach analiz LC-MS ekstraktów *E. planum* zidentyfikowałam 64 dominujące metabolity, należące do saponin triterpenoidowych, kwasów fenolowych i polifenolowchy. Kwasy hydroksycynamonowe: *p*-kumarowy, kawowy i ferulowy zostały zidentyfikowane w jako glikozydy, podczas gdy kwas rozmarynowy został zidentyfikowany w wielorakich połączeniach glikozydowych oraz glukuronidowych. Głównymi składnikami ekstraktu z *E. planum* okazały się saponiny triterpenoidowe o szkielecie barrigenolu. Badania sugerują, że *E. planum* L. może być potencjalnym źródłem nowych leków terapeutycznych w leczeniu demencji i choroby Alzheimera.

Kolejnym projektem wspólnym z zespołem prof. Przemysława Ł. Mikołajczaka były badania nad efektami podchronicznej administracji ekstraktu z melisy lekarskiej (*Melissa officinalis*) na zachowania i możliwości poznawcze indukowane skopolaminą u szczurów [Ożarowski et al., 2016, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 9729818]. *M. officinalis* jest jedną z najstarszych i wciąż najpopularniejszych roślin leczniczych. Stosowana jest w fitomedycynie w profilaktyce i leczeniu zaburzeń nerwowych. Zmierzono poziom ekspresji mRNA dla AChE, BuChE i BACE-1 oraz aktywności AChE i

BuChE w hipokampie i korze przedczołowej szczurów. Mój wkład w ten projekt skupił się na identyfikacji metabolitów w ekstraktach roślinnych na podstawie analiz widm fragmentacyjnych z systemów LC-MS/MS oraz LC-MSⁿ. Największą akumulację w analizowanych próbkach *M. officinalis* obserwowałam dla estrów kwasu kawowego, w tym szczególnie kwasu rozmarynowego i litospermowego oraz glikozydów flawonoidów, tj. glikokoniugaty luteoliny i apigeniny. Badanie wykazało również obecność kwasu hydroksyjasmonowego i jego pochodnych, teukrolu oraz sagekumaryny. Wykazano, iż metabolity te mogą znacząco modulować procesy poznawcze szczurów.

Współpraca z zespołem Prof. Mikołajczaka przyniosła kolejny udany projekt, którego celem było zbadanie wpływu ekstraktu z korzeni szalwii czerwonej (*Salvia miltiorrhiza*) na pamięć oraz aktywność cholinoesterazy u szczurów [Ożarowski et al., 2017, Physiology and Behavior 2017, 173: 223-230]. *S. miltiorrhiza* stosowana była tradycyjnie w medycynie azjatyckiej w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz ośrodkowego układu nerwowego. Nasze badania wykazały, że ekstrakt z *S. miltiorrhiza* hamuje aktywność cholinoesterazy w hipokampie i korze przedczołowej szczurów oraz powoduje zmniejszenie poziomu transkryptów beta-sekretazy, co sugeruje potencjalną rolę w łagodzeniu objawów choroby Alzheimera.

5.2.3. Metabolomika w poszukiwaniu nowych fitofarmaceutyków

W ramach mojej współpracy z prof. Marcinem Ożarowskim i prof. Agnieszką Seremak-Mrozikiewicz z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych, ocenialiśmy potencjał fitofarmakologiczny blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Salvia*: *S. miltiorrhiza* i *S. przewalskii* [Ożarowski et al. 2017, Phytochemistry Letters 20: 331-338]. Rośliny te wykazują wielorakie działanie neuroprotekcyjne, a ostatnio ich atrakcyjność wzrosła w obszarze potencjału terapeutycznego choroby Alzheimera ze względu na właściwości przeciwapłytkowe, przeciwutleniające, przeciwapoptotyczne czy przeciwzapalne oraz hamowanie acetylocholinoesterazy. Moim zadaniem w projekcie było porównanie profilu metabolomicznego obu gatunków *Salvia* za pomocą dwóch uzupełniających się metod LC-MS. Zidentyfikowałam łącznie 39 metabolitów, należących do polifenoli i diterpenów. Polifenole zostały dalej sklasyfikowane jako monomery, dimery, trimery i tetramery kwasów hydroksycynamonowych, przy czym tylko dwa metabolity nie były pochodnymi kwasu kawowego. Diterpeny tanshinony pochodziły głównie z dwóch form szkieletowych: 20-norabietanów i 19,20-dinorabietanów. Opisałam po raz pierwszy takie metabolity jak

diglukozyd kwasu rozmarynowego, glukozyd kwasu salwianolowego B i kwasu di-dehydro-salwianolowego B. Dominującymi metabolitami były tetramer kwasu kawowego, kwas lithospermowy B, kwasy salwianolowe i kryptotanszynon w obu gatunkach *Salvia*, które postulowano jako potencjalne fitofarmaceutyki o silnej aktywności przeciwutleniającej.

We współpracy z prof. Marcinem Ożarowskim i prof. Agnieszką Seremak-Mrozikiewicz z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych, opublikowanym w *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* [Hadas et al. 2017; 74921-928], badano wpływ ekstraktów z roślin rodzaju *Passiflora* na przewlekłe postępujące choroby ośrodkowego układu nerwowego wywołane przez wolno żyjące ameby. Skuteczne leczenie tej choroby jest trudne ze względu na cystowate stadium ameb, co sprawia, że są one bardzo odporne na leki przeciwamebowe. Roślinny materiał uzyskany z hodowli *in vitro* jest obiecującym źródłem przyszłych leków w tym obszarze. Ocenialiśmy alkoholowe ekstrakty z liści *P. incarnata*, *P. caerulea* oraz *P. alata*, a także z hodowli kalusa pod kątem ich aktywności przeciwamebowej. Analiza fitochemiczna wykazała, że wszystkie ekstrakty zawierają głównie fenylpropanoidy i flawonoidy. Wszystkie ekstrakty wykazywały właściwości amebostatyczne i amebobójcze. Ekstrakty z liści i kalusa *P. alata* wykazywały największą skuteczność, co korelowało z najwyższą zawartością całkowitych fenolowych i flawonoidowych związków w porównaniu z pozostałymi ekstraktami.

Ekstrakty z opisanych wcześniej gatunków *Passiflora* zostały ocenione także pod kątem ich działania przeciwnowotworowego na dwie ludzkie linie komórek ostrej białaczki limfoblastycznej CCRF-CEM i jego wielolekooporny wariant. [Ożarowski et al. 2018. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 28: 179-191]. Ekstrakty z liści *P. alata* i *P. incarnata* wykazywały silną aktywność hamującą wobec ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej, podczas gdy *P. caerulea* wykazywała niewielką lub żadną aktywność. Ekstrakt z liści *P. alata* został sugerowany jako terapia uzupełniająca dla pacjentów onkologicznych. Skład fitochemiczny został oceniony przy użyciu dwóch systemów LC-MS dla liści trzech gatunków *Passiflora*. Różnice w ilości związków chemicznych mogą determinować różną skuteczność farmakologiczną ekstraktów. Do najliczniejszej grupy metabolitów należały flawonoidy o mocno zróżnicowanej glikozylacji. *O,C*-glikozydy przeważały we wszystkich gatunkach *Passiflora*. Co ciekawe, wysoką zawartość *C*-glikozydów obserwowano w przypadku *P. caerulea* (ponad 30% powierzchni pików). Wśród podstawników glikozydowych wykryto heksozy, deoksyheksozy, pentozę i dideoksyheksozy. Analiza fragmentacyjnych widm masowych zarówno w trybie jonizacji ujemnej, jak i dodatniej pozwoliła na rozróżnienie

wiązań glikozydowych 6-C i 8-C oraz 2''-O i 6''-O glikozydów flawonoidów. Dodatkowo, zidentyfikowano również struktury terpenoidowe, takie jak blumenole B i C należące do megastigmanów oraz glikozyd kwasu cyklopassiflorowego. Największą zawartość terpenoidów, 38% powierzchni zidentyfikowanych pików, stwierdzono w przypadku *P. alata*.

W modelu przewlekłego zapalenia oskrzeli u szczurów przeprowadzono analizę właściwości leczniczych roślin rozwaru wielokwiatowego (*Platycodon grandiflorum*) (Buchwald et al. *Molecules* 2020, 25(21): 5020). *P. grandiflorum* jest szeroko stosowany w tradycyjnej medycynie azjatyckiej jako środek na choroby układu oddechowego. W badaniu wykorzystano trzy wodne ekstrakty, różniące się zawartością saponin i inuliny. Przewlekłe zapalenie oskrzeli zostało wywołane siarczanem metabisulfitu, a zwierzęta były leczone ekstraktami przez trzy tygodnie. Poziom wskaźników genetycznych zapalenia oskrzeli został określony w płynie płucnym poprzez płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe, podczas gdy poziom CRP został zmierzony w surowicy krwi. Ekstrakty z *P. grandiflorum* w większości odwróciły proces zapalny, prowadząc do wartości kontrolnych. Ekstrakt z korzenia tej rośliny okazał się obiecującą opcją leczenia przewlekłego zapalenia oskrzeli. Analiza LC-MSⁿ i LC-MS/MS umożliwiła identyfikację 48 różnych związków, głównie saponin triterpenoidowych typu oleanowego (23 struktury). Obecne były również wtórne metabolity szlaków fenylopropanoidowych. Zidentyfikowano również O- i C-glikozydy flawonów – apigeninę, chryzoeriol i luteolinę – oraz glikozydy flawonolu kwercetyny. Analiza MSⁿ w trybie jonizacji ujemnej umożliwiła rozróżnienie wiązań 7-O-, 6-C- i 2''-O-glikozydowych oraz 6''-acylację kwasami ferulowym i synapinowym we flawonoidach. Ponadto obserwowano również pochodne kwasu kawowego oraz glukozydy lignanu larycyrezynolu. W korzeniach *P. grandiflorum* zidentyfikowano dużą różnorodność glikozydowych struktur fenylopropanoidowych.

Zainicjowałam nową współpracę z zespołem dr Agnieszki Gryszczyńskiej z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych. Nasze wspólne badania skupiły się na farmakologicznych efektach ekstraktu z ziola wierzbówki koprzyca *Chamaenerion angustifolium* (L.) (*Epilobium angustifolium*). Mój wkład w ten projekt polega na profilowaniu metabolitów i określaniu stężenia związków bioaktywnych w różnych tkankach i fazach rozwojowych roślin. W publikacji Gryszczyńska et al. 2018, (*Industrial Crops and Products*, 123: 208-220 DOI:10.1016/j.indcrop.2018.06.010) porównywałam profile metabolitów dwóch linii uzyskanych z kultur *in vitro* w czasie kwitnienia oraz po nim. Wykorzystując dwa uzupełniające się systemy LC-MS oraz UPLC-PDA, zidentyfikowałam 45 metabolitów

fenolowych, w tym kwas elagowy, oenothien B i 3-*O*-arabinozyd kwercetyny jako metabolity o dominującej akumulacji. Wyniki badań wykazały, że okres kwitnienia jest lepszym źródłem związków aktywnych niż okres po kwitnieniu. Metoda hodowli *in vitro* pozwoliła na uzyskanie profilu metabolicznego roślin *E. augustifolium* zbliżonego do roślin uprawnych, co potwierdza potencjał tej metody dla pozyskiwania związków bioaktywnych. Dodatkowo, odbyłam staż w zespole badawczym dr Gryszczyńskiej, którego celem było zapoznanie się z metodami pomiaru potencjału antyoksydacyjnego, takich jak pomiar zdolności do usuwania DPPH lub całkowity potencjał antyoksydacyjny ekstraktów określony przy użyciu testu FRAP.

W ramach naszych wspólnych działań badawczych z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych oraz Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu w latach 2013-2020 opublikowaliśmy dziewięć artykułów w czasopiśmie JCR, o łącznym IF 20,783 i liczbie cytowań wynoszącej 282.

5.2.4. Metabolomika w badaniu interakcji roślina-mikroorganizm

Po rozpoczęciu pracy jako adiunkt w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, wraz z kierownikiem zakładu prof. Pawłem Bednarkiem nawiązałam współpracę z Zakładem Interakcji Roślina-Mikroorganizm w Instytucie Maxa Plancka ds. Badań Hodowli Roślin w Kolonii w Niemczech, w celu zbadania wpływu metabolitów roślinnych na rozwój mikroorganizmów symbiotycznych. Złożony związek między roślinami a mikroorganizmami, które kolonizują ich korzenie, czyli mikrobiotą, zależy w dużej mierze od metabolitów roślin. Podczas gdy rośliny wykształciły złożony układ odpornościowy, który może wykrywać i reagować na inwazję mikroorganizmów chorobotwórczych, nie jest jasne, jak w tym układzie funkcjonują korzystne mikroorganizmy w korzeniach i utrzymują zdrową równowagę między gospodarzem a mikroorganizmami. W naszej publikacji [Wolińska et al. 2021, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(49):e2111521118] przedstawiliśmy zmiany w akumulacji pochodnych tryptofanu, w tym kamaleksyny i kwasów indolo-3-karboksylowych oraz glukozynolanów indolowych oraz ich produktów hydrolizy, w różnych mutantach *A. thaliana*, których korzenie zasiedlono syntetycznym zestawem mikroorganizmów. Wyniki sugerują, że układ odpornościowy roślin, a konkretnie związki pochodzące z tryptofanu, odgrywają kluczową rolę w kontroli kolonizacji grzybami w korzeniach roślin, pomagając zapobiegać zaburzeniom równowagi w mikrobiocie (dysbiozie) i utrzymując efekty stymulujące wzrost mikrobioty korzeniowej. Praca ta podkreśla również znaczenie mechanizmów zakodowanych

zarówno u gospodarza, jak i u mikroorganizmów w utrzymywaniu zdrowej relacji gospodarz-mikroorganizmy w korzeniach, gdzie współistnieją symbionty zarówno bakteryjne jak i grzybowe. Ponadto, badanie pokazuje, że zarówno komensale bakteryjne jak i metabolizm tryptofanu gospodarza są niezbędne do kontrolowania kolonizacji grzybami oraz do promowania wzrostu i przeżycia roślin.

Zagadnienia związane z wpływem roślinnego metabolizmu tryptofanu na mikrobiom endofityczny zostały kontynuowane w pracy (Basak, Piasecka i in. *New Phytol.* 2023; 241(1): 329-342). Publikacja ta omawia wpływ struktur siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz metabolitów pochodnych tryptofanu na mikrobiotę korzeni *Arabidopsis thaliana*. Ciała ER to struktury w korzeniach roślin zawierające myrozynazę PYK10, enzym hydrolizujący indolowe glukozynolany (IG), które są kluczowe dla interakcji korzeń-mikrobiom. W badaniu wykorzystano różne mutanty *A. thaliana*, z defektem produkcji ER lub, myrozynaz, biosyntezie IG oraz metabolizmie Trp. Mutanty wykazały zmieniony skład bakterii i grzybów w ryzoplane (powierzchni korzenia) i endosferze (wewnętrznych tkankach korzenia). Wyniki sugerują, że ciała ER i obecne w nich myrozynazy modulują profil metabolitów wydzielanych przez korzenie, wpływając na interakcje korzeń-mikrobiota. Mutanty ER i metabolizmu Trp wykazały częściowo podobny wpływ na strukturę mikrobioty związanej z korzeniem. Ogólnie rzecz biorąc, dane wskazują, że myrozynazy rezydujące w ciałach ER i metabolizm Trp są ważnymi czynnikami przyczyniającymi się do tworzenia mikrobiologicznej społeczności korzeni, wpływając na odrębne, ale częściowo pokrywające się zestawy mikrobów. Nasze wyniki podkreślają znaczenie interakcji roślina-mikroorganizmy w utrzymaniu zdrowia roślin i sugerują potencjalne strategie poprawy wzrostu i odporności roślin poprzez manipulowanie składem mikroorganizmów symbiotycznych.

Rozpoczęłam współpracę z prof. Moniką Rakoczy-Trojanowską ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w ramach grantu NCN nr 2018/31/B/NZ9/00439 "Identyfikacja, charakterystyka i mapowanie genów żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.) związanych z odpornością na rdzę brunatną powodowaną przez *Puccinia recondita* f. sp. *Secalis*". Dwa szczepy *P. recondita* wywołujące kompatybiln i niekompatybiln typem odpowiedzi immunologicznej badano na trzech liniach wsobnych żyta (Krępski et al. 2024, BMC Plant Biology, 24 (1):107). Przeprowadzono analizę RNA-seq i skorelowano ją z danymi metabolomicznymi. Zidentyfikowano w sumie 877 unikalnych genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG), z których większość uległa zwiększonej regulacji. Wśród nich zidentyfikowano m.in. cytochrom P450, kinazy receptoropodobne, metyloesterazy, białko-1

związane z patogenezą, endotransglukozydazy/hydrolazy ksyloglukanu i peroksydazy. Odpowiedź metabolomiczna była wysoce konserwatywna między genotypami. Porównując profil metabolomiczny po infekcji kompatybilnymi i niekompatybilnymi izolatami, doszliśmy do wniosku, że wtórny metabolom żyta ulega silniejszemu przeprogramowaniu w wyniku rozpoznania patogenu niż udanej infekcji. Analiza funkcjonalna łącząca geny i metabolity odzwierciedlała zaangażowanie biosyntezy fenylopropanoidów i diterpenoidów, a także metabolizmu tiaminy w odpowiedź immunologiczną żyta. Najbardziej zróżnicowanymi metabolitami obu typów odpowiedzi immunologicznej były pochodne kwasu benzoesowego i flawonoidy (takie jak chryzyna) oraz peptydy (takie jak izoleucyloglutamina, izoleucywalina i S-adenozylhomocysteina). Zidentyfikowano liczne geny i metabolity związane z odpowiedzią immunologiczną, wyjaśniając mechanizmy leżące u podstaw odpowiedzi żyta na *P. recondita* we wczesnych stadiach rozwoju rdzy brunatnej. Korelacja DAM i DEG wyjaśniła interakcję między szlakami związanymi głównie z modulacją poziomów reaktywnych form tlenu (ROS). W odpowiedzi na infekcję aktywowane były określone szlaki metaboliczne, w tym "Biosynteza flawonów i flawonoli", "Metabolizm askorbinianu i aldaranu" oraz "Metabolizm glutationu". Zaobserwowano zaburzenia w "Metabolizmie skrobi i sacharozy", prawdopodobnie z powodu zakłóceń homeostazy cukrów spowodowanych przez patogena. Badanie potwierdza wcześniejsze ustalenia, że patogeny biotroficzne znacząco zakłócają metabolizm węglowodanów i cukrów nukleotydowych gospodarza.

5.2.5. Ewolucja biosyntezy metabolitów u roślin

W pracy przeglądowej, (Piasecka i in. *New Phytol* 2015; 206 (3): 948-964) podsumowaliśmy obecną wiedzę na temat roli metabolitów specjalistycznych w immunologii roślin w kontekście ewolucyjnym. Wszystkie gatunki roślin są zdolne do produkcji naturalnych związków chemicznych o właściwościach obronnych, co wskazuje, że ta zdolność została zachowana przez całą ewolucję. Fitoantycypiny, w tym związki takie jak alkaloidy, flawonoidy i glukozynolany, są produkowane konstytutywnie w różnych tkankach roślinnych i mogą mieć wiele funkcji, w tym aktywność przeciwbakteryjną. Natomiast produkcja fitoaleksyn jest indukowana przez atak patogenów i obejmuje szeroki zakres związków o zróżnicowanej strukturze, takich jak terpenoidy, stilbeny i fenole. Związki te są często wytwarzane w odpowiedzi na określone patogeny lub ich szczepy, a ich biosynteza jest zwykle ściśle regulowana na poziomie transkrypcyjnym. Niektóre metabolity wtórne roślin są obecne tylko

w określonych grupach roślin, takich jak rodzina lub rodzaj, co wskazuje, że ewolucja tych szlaków zachodziła szybko i jest unikalna dla specyficznych linii rozwojowych.

Badania opisane w (Czerniawski i in. *Plant Cell Physiol.* 2023, 16;64(1):80-93) miały na celu poszerzenie naszej wiedzy na temat ewolucji biosyntezy glukozynolanów u gatunków z plemienia *Camelineae*, w tym rodzajów *Capsella* i *Camelina*, które mają ograniczoną zdolność do produkcji i metabolizowania glukozynolanów indolowych (IG). Metabolomika porównawcza w połączeniu z analizami genetycznymi, pokazała osłabienie zachowania czynników transkrypcyjnych MYB związanych z biosyntezą glukozynolanów, w tym utratę funkcjonalnego białka MYB34 u tych gatunków. Wprowadzenie funkcjonalnego MYB34 z *A. thaliana* częściowo przywróciło biosyntezę IG w *Capsella rubella*, co wskazuje, że utrata tego czynnika transkrypcyjnego przyczynia się do regresji szlaku metabolicznego IG. Ponadto w publikacji opisano unikalną funkcję MYB34 w regulacji sprzężenia zwrotnego biosyntezy IG, prowadzącej do nadprodukcji auksyn, zaburzeń metabolicznych i opóźnienia wzrostu spowodowanego mutacjami w genach biosyntetycznych IG. Wyniki te dostarczają wglądu w ewolucję metabolitów w rzędzie *Brassicales*.

6. Prezentacja osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych oraz osiągnięć w popularyzacji nauki

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

1. Czerwiec 2024: prowadziłam wykłady dla Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Rzeszowskiego, przedmiot „Warsztaty z Ekspertem”
2. Lipiec 2023 i lipiec 2021 prowadziłam warsztaty i szkolenia z przetwarzania danych metabolomicznych podczas Letniej Szkoły Bioinformatyki zorganizowanej przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Polska;
3. Od 2020 roku do chwili obecnej prowadzę warsztaty i szkolenia z przetwarzania danych metabolomicznych organizowane przez firmę bioinformatyczną Xenstats sp. z o.o.: „Analiza danych metabolomicznych – chromatografia – spektrometria mas (2-dniowe warsztaty online): oraz „Zaawansowana analiza danych metabolomicznych – chromatografia – spektrometria mas (2-dniowe warsztaty online)”;
4. 2013-2021: prowadziłam wykłady dotyczące analizy spektrometrycznej dla Studium Podyplomowego Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

6.2. Opiekun naukowy w pracach dyplomowych i stażach studenckich:

1. Lipiec-wrzesień/2016: bezpośredni opiekun naukowy i opiekun stażu w Instytucie Genetyki Roślin PAN: Wojciecha Witka, studenta Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu;
2. 2016-2021: opiekun naukowy i promotor pomocniczy pracy doktorskiej doktoranta Pawła Czerniawskiego, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN;
Praca doktorska pt.: „Unikalne zmiany w biosyntezie glukozynolanów wśród gatunków plemienia *Camelineae* rodziny *Brassicaceae*”. Promotor prof. Paweł Bednarek
Opublikowane artykuły:
Czerniawski et al. 2021, *Phytochemistry*; 181: 112571;
Czerniawski et al. 2023, *Plant Cell Physiol.*, 16; 64 (1): 80-93;
3. 2022 rok- (w trakcie) bezpośredni opiekun naukowy i promotor pomocniczy pracy doktorskiej doktorantki Marty Kańczurzewskiej z Instytutu Matematyki, Politechniki Poznańskiej, promotor dr hab. Aneta Sawikowska prof. UP
Opublikowane artykuły:
Piasecka et al. 2022, *Cells* 2022; 11 (20): 3213,
Krępski et al. 2024, *BMC Plant Biology*, 24:107
2023- (w trakcie) bezpośredni opiekun naukowy i promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej doktoranta Mikołaja Małeckiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.
Promotor prof. Paweł Bednarek

6.3. Popularyzacja nauki

Jestem szczególnie zaangażowana w organizowanie i prowadzenie naukowych warsztatów dla dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym. Organizuję warsztaty obejmujące proste i bezpieczne eksperymenty z dziedziny biologii i chemii. Prowadziłam warsztaty na życzenie pedagogów szkół lub w ramach wydarzeń edukacyjnych. Poniżej przedstawiam listę udokumentowanych wydarzeń:

04/2023 warsztaty dla klasy szóstej Szkoły Podstawowej nr 19- w Poznaniu;
12/2016 i 11/2021 warsztaty dla grupy przedszkolnej w publicznym przedszkolu w Biedrusku;
10/2022 i 02/2023 warsztaty dla dwóch klas pierwszych szkoły podstawowej w Biedrusku;
06/2022 warsztaty dla klasy piątej szkoły podstawowej w Biedrusku;
04/2022 i 05/2015 warsztaty dla klasy trzeciej szkoły podstawowej w Niechcicach w ramach projektu "To(dział)My!" finansowanego przez Fundację Santander;

01/2019 organizacja i prowadzenie warsztatów w ramach "Nocy Biologów" w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN;

06/2018 warsztaty dla Klubu Dzieci i Młodzieży "Ciao" w Biedrusku;

05/2014 organizacja i prowadzenie warsztatów w ramach "Niesamowitego Świata Roślin" w Instytucie Genetyki Roślin PAN;

04/2014 warsztaty dla grupy przedszkolnej w niepublicznym przedszkolu „Leonardo” w Poznaniu;

01/2014 organizacja i prowadzenie warsztatów w ramach "Nocy Biologów" w Instytucie Genetyki Roślin PAN.

6.4.. Zarządzanie projektem badawczym

- **03/2016-03/2020:** Projekt badawczy SONATA Narodowego Centrum Nauki, Nr 2015/17/D/NZ9/03347. Projekt pt: „Metabolomiczne i proteomiczne aspekty konserwatywnych elementów odpowiedzi na fuzariozę kłosów w rodzinie *Poaceae*”

Publikacje: **H4, H5, H6**

- **04/2023-03/2027:** Projekt badawczy OPUS Narodowego Centrum Nauki, Nr 2022/45/B/NZ9/03572. Projekt pt: „Opis kluczowych mechanizmów koordynacji i priorytyzacji odpowiedzi jęczmienia na jednoczesne stresy biotyczne i abiotyczne - podejście multiomiczne”

6.5. Członkostwo w komitetach organizacyjnych międzynarodowych konferencji

Metabolomics Society, członek w latach 2010 - 2015.

Polskie Towarzystwo Spektrometrii mas w latach 2013 - 2018

6.6. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Szczegółowe informacje dotyczące mojej aktywności naukowej, w tym:

- pełna lista artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych (26), oraz prezentacji na konferencjach (16 jako autor prezentacji);
- informacje o udziale w projektach badawczych jako członek badawczego (10);
- lista szkoleń i warsztatów prowadzonych w Polsce i za granicą (4);
- prezentacje wygłoszone na zaproszenie (5);
- informacje o recenzjach prac naukowych (16);
- lista złożonych wniosków patentowych (2);

- informacje o udziale w programach europejskich (2);
- nagrody i wyróżnienia (1);
- lista złożonych wniosków patentowych (2) znajduje się w Załączniku 4. „Wykaz osiągnięć naukowych”

7. Literatura

Bollina, V., Kumaraswamy, G. K., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y., Rioux, S., Faubert, D., Hamzehzarghani, H., 2010. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Mol Plant Pathol* 11, 769-782.

Borrell, A. K., Mullet, J. E., George-Jaeggli, B., van Oosterom, E. J., Hammer, G. L., Klein, P. E., Jordan, D. R., 2014. Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. *Journal of Experimental Botany* 65, 6251-6263.

Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., Wolf, A., 2018. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. In: Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., Wolf, A. (Eds.), *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co: Plant-derived Drugs and their Interaction with Human Receptors*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3-17.

Degenkolbe, T., Do, P. T., Kopka, J., Zuther, E., Hinch, D. K., Köhl, K. I., 2013. Identification of Drought Tolerance Markers in a Diverse Population of Rice Cultivars by Expression and Metabolite Profiling. *PLOS ONE* 8, e63637.

Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., Routledge, A. P. M., 2001. *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology* 127, 1539-1555.

Ferreira, M. L. F., Serra, P., Casati, P., 2021. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiol Plant* 173, 736-749.

Field, B., Fiston-Lavier, A.-S., Kemen, A., Geisler, K., Quesneville, H., Osbourn, A. E., 2011. Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16116-16121.

Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., Somers, D. J., 2012. Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 7, e40695.

Hong, Y., Zhang, H., Huang, L., Li, D., Song, F., 2016. Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice. *Frontiers in Plant Science* 7.

Huang, Y., Haas, M., Heinen, S., Steffenson, B. J., Smith, K. P., Muehlbauer, G. J., 2018. QTL Mapping of *Fusarium* Head Blight and Correlated Agromorphological Traits in an Elite Barley Cultivar Rasmuson. *Frontiers in Plant Science* 9.

Hura, T., Hura, K., Grzesiak, S., 2008. Contents of Total Phenolics and Ferulic Acid, and PAL Activity during Water Potential Changes in Leaves of Maize Single-Cross Hybrids of Different Drought Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194, 104-112.

Liu, X., Liu, C., 2016. Effects of Drought-Stress on *Fusarium* Crown Rot Development in Barley. *PLOS ONE* 11, e0167304.

- Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., 2021. NMR-Based Metabolomics. *Adv Exp Med Biol* 1280, 19-37.
- Obata, T., Witt, S., Lisec, J., Palacios-Rojas, N., Florez-Sarasa, I., Yousfi, S., Araus, J. L., Cairns, J. E., Fernie, A. R., 2015. Metabolite Profiles of Maize Leaves in Drought, Heat, and Combined Stress Field Trials Reveal the Relationship between Metabolism and Grain Yield. *Plant Physiology* 169, 2665-2683.
- Onda, Y., Inoue, K., Sawada, Y., Shimizu, M., Takahagi, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Hirai, M. Y., Garvin, D. F., Mochida, K., 2019. Genetic Variation for Seed Metabolite Levels in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2348.
- Pasquet, J. C., Changenet, V., Macadré, C., Boex-Fontvieille, E., Soulhat, C., Bouchabké-Coussa, O., Dalmais, M., Atanasova-Pénichon, V., Bendahmane, A., Saindrenan, P., Dufresne, M., 2016. A *Brachypodium* UDP-Glycosyltransferase Confers Root Tolerance to Deoxynivalenol and Resistance to *Fusarium* Infection. *Plant Physiol* 172, 559-574.
- Peraldi, A., Griffe, L. L., Burt, C., McGrann, G. R. D., Nicholson, P., 2014. *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathology* 63, 554-562.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., Bednarek, P., 2015a. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* 206, 948-964.
- Piasecka, A., Kachlicki, P., Stobiecki, M., 2019. Analytical Methods for Detection of Plant Metabolomes Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 379.
- Piasecka, A., Sawikowska, A., Krajewski, P., Kachlicki, P., 2015b. Combined mass spectrometric and chromatographic methods for in-depth analysis of phenolic secondary metabolites in barley leaves. *J Mass Spectrom* 50, 513-532.
- Piasecka, A., Sawikowska, A., Kuczyńska, A., Ogrodowicz, P., Mikołajczak, K., Krystkowiak, K., Gudyś, K., Guzy-Wróbelska, J., Krajewski, P., Kachlicki, P., 2017. Drought-related secondary metabolites of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and their metabolomic quantitative trait loci. *Plant J* 89, 898-913.
- Sakurai, N., 2022. Recent applications of metabolomics in plant breeding. *Breed Sci* 72, 56-65.
- Schmitz-Hoerner, R., Weissenböck, G., 2003. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 64, 243-255.
- Silva, C. S. C. d., Botelho, F. B. S., Rodrigues, C. S., Mendes, M. P., Moura, A. M. d., Neto, A. R., 2017. Genetic and Phenotypic Parameters in the Selection of Upland Rice Genotypes. *American Journal of Plant Sciences* 08, 3450-3459.
- SIRANIDOU, E., KANG, Z., BUCHENAUER, H., 2002. Studies on Symptom Development, Phenolic Compounds and Morphological Defence Responses in Wheat Cultivars Differing in Resistance to *Fusarium* Head Blight. *Journal of Phytopathology* 150, 200-208.
- Steiner, B., Kurz, H., Lemmens, M., Buerstmayr, H., 2009. Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor Appl Genet* 118, 753-764.
- Stochmal, A., Oleszek, W., 2007. Effect of Acylation of Flavones with Hydroxycinnamic Acids on their Spectral Characteristics. *Natural Product Communications* 2, 1934578X0700200511.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., Reily, M. D., Thaden, J. J., Viant, M. R., 2007. Proposed

minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211-221.

Szepesi, Á., 2020. Chapter 30 - Role of metabolites in abiotic stress tolerance. In: Tripathi, D. K., Pratap Singh, V., Chauhan, D. K., Sharma, S., Prasad, S. M., Dubey, N. K., Ramawat, N. (Eds.), *Plant Life Under Changing Environment*. Academic Press, pp. 755-774.

Venkatesh, T. V., Chassy, A. W., Fiehn, O., Flint-Garcia, S., Zeng, Q., Skogerson, K., Harrigan, G. G., 2016. Metabolomic Assessment of Key Maize Resources: GC-MS and NMR Profiling of Grain from B73 Hybrids of the Nested Association Mapping (NAM) Founders and of Geographically Diverse Landraces. *J Agric Food Chem* 64, 2162-2172.

Veselá, B., Holub, P., Urban, O., Surá, K., Hodaňová, P., Oravec, M., Divinová, R., Jansen, M. A. K., Klem, K., 2022. UV radiation and drought interact differently in grass and forb species of a mountain grassland. *Plant Science* 325, 111488.

Wang, S., Alseekh, S., Fernie, A. R., Luo, J., 2019. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular Plant* 12, 899-919.

Wojtasik, W., Kulma, A., Namysł, K., Preisner, M., Szopa, J., 2015. Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science* 6.

Wolinska, K. W., Vannier, N., Thiergart, T., Pickel, B., Gremmen, S., Piasecka, A., Piślewska-Bednarek, M., Nakano, R. T., Belkhadir, Y., Bednarek, P., Hacquard, S., 2021. Tryptophan metabolism and bacterial commensals prevent fungal dysbiosis in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2111521118.