

**Załącznik nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania
stopnia doktora habilitowanego dr Agacie Tyczewskiej**

AUTOREFERAT

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Agata Tyczewska

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

- 2008 uzyskanie stopnia doktora nauk chemicznych w dziedzinie biochemii w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Praca doktorska wykonana w Laboratorium Biochemii tRNA, Zespole Biosyntezy Białka, W Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.
Temat rozprawy doktorskiej: **“Selekcja aptamerów RNA i ich zastosowanie w badaniu funkcji biologicznych HIV-1 RT i Dicer – białek specyficznie degradujących RNA”**,
Promotor – prof. dr hab. Marek Figlerowicz
Recenzenci: prof. dr ab. Mirosława Naskręt-Barciszewska oraz prof. dr hab. Artur Jarmołowski
- 2002 uzyskanie tytułu magistra biotechnologii. Praca magisterska wykonana na Wydziale Biologii w Zakładzie Genetyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
Temat pracy magisterskiej: **“Badanie polimorfizmu chloroplastowego i mitochondrialnego DNA u *Pinus sylvestris* i *Pinus mugo* i określanie haplotypów pokolenia F1 u *Pinus uliginosa* pod kątem zjawiska hybrydyzacji”**,
Promotor – prof. dr hab. Wiesław Prus-Głowacki

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 01.09.2017 – do chwili obecnej – kierownik Pracowni Modelowych Organizmów Zwierzęcych w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
- 15.05.2017 – 15.08.2017 – staż podoktorski w Instytucie Badań Biomedycznych im. Friedricha Mieschera, Bazylea, Szwajcaria, zespół prof. Ciosk, (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research (FMI), Ciosk Lab)
- 11.01.2011 – do chwili obecnej – adiunkt w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
- 01.02.2009 – 31.10.2010 – staż podoktorski w Instytucie Biologii Molekularnej Roślin im. Grzegorza Mendla, Austriacka Akademia Nauk, zespół prof. Matzke (Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology (GMI), Matzke Lab)

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Tytuł osiągnięcia naukowego – jednotematycznego cyklu publikacji pod wspólnym tytułem:

Molekularne odpowiedzi roślin uprawnych na warunki stresu środowiskowego w klimacie umiarkowanym na przykładzie kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*) i stresu herbicydowego oraz soi (*Glycine max* L.) i stresu zimna

Wykaz publikacji (P) wschodzących w skład osiągnięcia naukowego:

P1. Tyczewska A, Woźniak E, Gracz J, Kuczyński J, Twardowski T* (2018) Towards Food Security: Current State and Future Prospects of Agrobiotechnology. Trends in Biotechnology, 36(12):1219-1229, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.008>

Punktacja wg MNiSW (2018): **45**

IF (2018): **13,747**

IF (5-letni): **15,219**

P2. Tyczewska A*, Bąkowska-Żywicka B, Gracz J, Twardowski T (2016) Stress Responsive Non-protein Coding RNAs. Rozdział 7: 153-181, w: Abiotic and biotic stress - Recent Advances and Future Perspectives, InTech, doi: 10.5772/60477, ISBN 978-953-51-4590-5.

P3. Mahmoud M, Gracz-Bernaciak J, Żywicki M, Karłowski W, Twardowski T, **Tyczewska A*** (2020) Identification of Structural Variants in Two Novel Genomes of Maize Inbred Lines Possibly Related to Glyphosate Tolerance. *Plants (Basel)* 9(4):523. doi: 10.3390/plants9040523

Punktacja wg MNiSW (2020): **70** IF (2020): **3,935** IF (5-letni): **4,827** (2021)

P4. Tyczewska A*, Gracz-Bernaciak, Szymkowiak J, Twardowski T (2021) Herbicide stress induced DNA methylation changes in two *Zea mays* inbred lines differing in Roundup® resistance. *Journal of Applied Genetics* 62(2):235-248. doi: 10.1007/s13353-021-00609-4

Punktacja wg MNiSW (2021): **140** IF (2021): **2,653** IF (5-letni): **2,952**

P5. Żywicki M, Gracz J, Karłowski W, Twardowski T, **Tyczewska A*** (2015) Expression of miRNAs involved in phosphate homeostasis and senescence is altered in glyphosate treated maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:265. doi: 10.1007/s11738-015-2022-5

Punktacja wg MNiSW (2015): **25** IF (2015): **1,563** IF (5-letni): **1,692**

P6. Tyczewska A*, Gracz J, Kuczyński J, Twardowski T (2016) Deciphering the soybean molecular stress response via high-throughput approaches. *Acta Biochimica Polonica* (63)4/2016, 631-643. doi: 10.18388/abp.2016_1340

Punktacja wg MNiSW (2016): **15** IF (2016): **1,159** IF (5-letni): **1,491**

P7. Kuczyński J, Twardowski T, Nawracała J, Gracz-Bernaciak J, **Tyczewska A*** (2020) Chilling stress tolerance of two soya bean cultivars: phenotypic and molecular responses. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(6): 759-772, DOI: 10.1111/JAC.12431

Punktacja wg MNiSW (2020): **140** IF (2020): **3,473** IF (5-letni): **3,332**

P8. Kuczyński J, Gracz-Bernaciak J, Twardowski T, Karłowski W, **Tyczewska A*** (2021) Cold stress induced miRNA and degradome changes in four soybean varieties differing in chilling resistance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, doi: 10.1111/jac.12557

Punktacja wg MNiSW (2021): **140** IF (2020): **4,153** IF (5-letni): **4,859**

Gwiazdka – * - oznacza autora korespondencyjnego

Suma punktów MNiSW *publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego* obliczony dla publikacji zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji: **575**.

Suma punktów IF *publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego* został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji: **30,701**, (5-letni: **34,37**).

Liczba cytowań artykułów wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego: **55** (bez autocytowań: **44**)

Niezależnie od powyższego zestawienia, wykaz i kopie monotematycznego cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie tych publikacji zamieszczono w załącznikach nr 6 i nr 9.

Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego, które zostało opisane w ww. pracach.

4.A. Agrobiotechnologia – stan obecny i perspektywy rozwoju w erze nowoczesnej biotechnologii

W wyniku tysięcy lat istnienia rolnictwa człowiek uzyskał wiele odmian roślin uprawnych, które stały się podstawą codziennej diety. Do najważniejszych roślin żywieniowych (alimentacyjnych) świata zalicza się zboża. Spośród nich największą wysokość produkcji osiągają: pszenica (podstawowe zboże chlebowe), kukurydza (głównie zboże paszowe i przemysłowe) oraz ryż. Do najważniejszych roślin uprawnych zalicza się również soję, na którą zapotrzebowanie nieustannie rośnie.

W pracy **P1** omówiono szerokie tło i kontekst badań włączonych do niniejszej rozprawy habilitacyjnej. Przedstawiono w niej konieczność intensyfikacji produkcji rolnej w kontekście bezpieczeństwa żywnościowego (ang. *food security*), na przykładzie 4 głównych roślin uprawnych (pszenicy, kukurydzy, ryżu i soi). Bezpieczeństwo żywnościowe to sytuacja, w której wszyscy ludzie przez cały czas mają fizyczny, społeczny i ekonomiczny dostęp do wystarczającej, bezpiecznej i pełnowartościowej żywności, zaspokajającej ich potrzeby i umożliwiającej prowadzenie aktywnego i zdrowego życia [1]. Szacuje się, że w celu zaspokojenia potrzeb rosnącej populacji ludzkiej, światowa produkcja żywności musi zostać podwojona (wzrost o 2,4% rocznie w ciągu następnych 30 lat), jest to trudne do osiągnięcia, ponieważ obecnie tempo wzrostu produkcji dla 4 wyżej wymienionych zbóż wynosi jedynie od 0,9% do 1,6% [2]. W pierwszym rozdziale pracy **P1** przedstawiono wyzwania jakie stoją przed ludzkością w kontekście zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego. Zaliczono do nich brak dodatkowych terenów, które można przeznaczyć na produkcję rolną, degradację ziemi/erozę, stresy biotyczne i abiotyczne. W kolejnej części przedstawiono znaczenie roślin genetycznie zmodyfikowanych (GM, ang. *genetically modified*) w produkcji rolniczej, przedstawiając po krótkce historię roślin GM, a także przykłady modyfikacji genetycznych soi, kukurydzy, pszenicy i ryżu. Zwrócono również uwagę na kierunki rozwoju biotechnologii roślin na przykładzie prób wprowadzania fotosyntetycznego systemu C4 do roślin o systemie C3 (soi, pszenicy czy ziemniaków), a także wykorzystania roślin do produkcji farmaceutyków i związków o wysokim potencjale wykorzystania w przemyśle (np.: leki, plastiki, enzymy, kosmetyki czy epoksydy). W pracy **P1** rozważono również czy rośliny GM mogą stanowić rozwiązanie dla zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, omówiono korzyści wynikające ze stosowania roślin GM w uprawie – brak niepożądanych skutków ubocznych spożywania żywności GM, mniejszy stopień zainfekowania roślin GM grzybami, zmniejszenie ilości używanych herbicydów i pestycydów, oraz wysokie zyski osiągane przez rolników wynikające z upraw roślin GM. Podkreślono również rolę akceptacji społecznej nowych technik biotechnologii i ich wykorzystania w produkcji rolniczej. Wraz z pojawieniem się NBT (ang. *New Breeding Techniques*) niezwykle ważne jest zaangażowanie społeczności naukowej w dyskurs na temat biotechnologii i zapobieganie rozpowszechnianiu informacji niedokładnych lub fałszywych. Społeczeństwo błędnie postrzega, że większość korzyści płynących z upraw GM uzyskują międzynarodowe korporacje (twórcy technologii/nowych odmian) i rolnicy, odrzucając naukowe dowody na bezpieczeństwo żywności GM, zwiększone plonowanie (bez zwiększania powierzchni upraw), zmniejszone stosowanie herbicydów, pestycydów i nawozów, zmniejszoną emisję gazów cieplarnianych oraz umożliwienie stosowania zrównoważonych praktyk rolniczych. W dużej mierze dzieje się tak z powodu braku uczciwych i rzetelnych informacji o uprawach GM, oraz rozpowszechnianiu fałszywych informacji przez przeciwników GMO.

Potrzeba wykarmienia rosnącej światowej populacji i odpowiedniego reagowania na skutki zmian klimatycznych stała się obecnie koniecznością. Aby jednak móc modyfikować uprawy, musimy najpierw zrozumieć podstawy odporności, badając odmiany lepiej przystosowane do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Postępy osiągnięte w ostatnich latach w dziedzinach biotechnologii i biologii

molekularnej radykalnie zmieniły nasze rozumienie regulacji procesów ekspresji genów i reakcji roślin na stres abiotyczny, uzbroiły nas w nowe narzędzia, które pomagają zwalczać różne warunki stresowe oraz poprawić wzrost i plony roślin uprawnych, a także gatunków o znaczeniu przemysłowym. Nasza podróż w świecie małych RNA rozpoczęła się w ubiegłym stuleciu, w latach 90., wraz z odkryciem szlaku interferencji RNA, a następnie siRNA i ich roli w procesie metylacji DNA i modyfikacjach chromatyny. W kolejnych latach odkrywano dalsze grupy małych RNA (małe RNA pochodzące z tRNA, małe RNA pochodzące ze snoRNA, małe RNA pochodzące z mRNA) i zaczęto poznawać ich role w komórkach oraz w adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Wraz z pojawieniem się nowych technik o wysokiej przepustowości gromadzenie ogromnej ilości różnych typów danych molekularnych stało się łatwiejsze i znacznie szybsze. Analiza tak dużej ilości danych i zrozumienie wzajemnych korelacji między genami, ich rolami i małymi RNA jest obecnie wyzwaniem, z którym muszą się zmierzyć naukowcy. W pracy **P2** opisano wyniki analizy danych literaturowych na temat roli niekodujących RNA w odpowiedzi na stresy abiotyczne organizmów o znaczeniu przemysłowym, takich jak rośliny uprawne i drożdże. Aby zapewnić precyzyjną kontrolę ekspresji genów w warunkach normalnych i stresowych, organizmy opracowały ściśle zdefiniowane molekularne mechanizmy regulacyjne na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. W pracy uwagę skupiono na tzw. kanonicznych małych RNA (miRNA i siRNA), a także tych niekanonicznych (takich jak RNA pochodzące z mRNA, małe RNA pochodzące z tRNA, małe RNA pochodzące z snoRNA (sdRNA), małe RNA pochodzące z mRNA i długie niekodujące RNA (lncRNA)). Chociaż istnieją dowody na udział tych różnych klas niekodujących RNA w odpowiedzi roślin na warunki stresowe, w większości przypadków nadal brakuje podstawowych informacji na temat ich roli i wzajemnego oddziaływania między różnymi szlakami regulacyjnymi.

4.B. Hipoteza badawcza i cel badań

Produkcja rolna to najważniejszy element agrobiotechnologii, reprezentujący znaczący sektor światowej gospodarki i wykraczający daleko poza produkcję żywności. W ciągu ostatniego stulecia ludzkość była świadkiem kilku przełomowych wydarzeń, które znacząco zwiększyły wydajność rolnictwa. Początkowo ulepszanie roślin uprawnych opierało się na ocenie i osądzie rolników, którzy do celów uprawowych i hodowlanych wybierali rośliny dobrej jakości o wysokich plonach. Wprowadzenie nawozów chemicznych (już w XIX w.) oraz pestycydów i herbicydów (po II wojnie światowej) spowodowało kolejny, skokowy wzrost plonów. „Zielona rewolucja”, zapoczątkowana w latach 40. w Meksyku przez dr. Borlauga, doprowadziła do kolejnego znacznego zwiększenia plonów. Nowe odmiany uzyskane z tradycyjnej hodowli były nie tylko odporne na choroby, ale także lepiej adaptowały się do różnych warunków wzrostu, posiadając zwiększony potencjał plonowania. Zwielokrotnienie plonowania przypisuje się stosowaniu nawozów syntetycznych, ochronie roślin za pomocą pestycydów i herbicydów oraz rozwojowi i powszechnemu stosowaniu ulepszonych odmian roślin uprawnych oraz maszyn rolniczych. Kolejny kamień milowy w produkcji rolnej był możliwy dzięki zastosowaniu szerokiej gamy narzędzi biotechnologicznych. Manipulowanie informacją genetyczną i tworzenie roślin genetycznie modyfikowanych stało się rzeczywistością pod koniec XX wieku, kiedy na rynek wprowadzono pierwsze GMO. Mimo wielkich osiągnięć minionych wieków pilną kwestią pozostaje konieczność doskonalenia istniejących odmian i zwiększania produkcji rolnej, podyktowana ciągłym wzrostem populacji ludzkiej i globalnymi zmianami klimatycznymi, którym towarzyszy narażenie organizmów na większe stresy biotyczne i abiotyczne.

Zawiłe, lecz ściśle zdefiniowane, mechanizmy molekularne aktywowane w roślinach w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne, pomimo intensywnej pracy naukowców na całym świecie, nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Czynniki stresowe mogą aktywować mechanizmy, których skutkiem będzie adaptacja do

zaistniałych warunków i utrzymanie normalnego funkcjonowania komórki i organizmu. Tego typu mechanizmy adaptacyjne mogą być przekazane organizmom potomnym i doprowadzić do wykształcenia genotypów odpornych na dany czynnik stresowy. Badania przedstawione w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej charakteryzuje wielopoziomowe, kompleksowe podejście, zastosowane po to, aby zdefiniować molekularne podstawy odpowiedzi roślin na stres środowiskowy. Zainspirowana wnioskami płynącymi z analiz danych literaturowych, opisanych w pracach P1 i P2, postanowiłam moje badania poświęcić analizie odpowiedzi molekularnych na warunki stresów abiotycznych ważnych rolniczo roślin uprawnych. Celem badań była zatem analiza odpowiedzi rodzimych odmian roślin uprawnych na warunki stresu środowiskowego w klimacie umiarkowanym. Do badań wybrałam dwie ważne przemysłowo rośliny uprawne: kukurydzę zwyczajną (*Zea mays*) oraz soję (*Glycine max* L.). Kukurydzę poddano stresowi herbicydowemu, a soję stresowi zimna.

Cele szczegółowe:

Kukurydza:

Stres herbicydowy nie był do tej pory badany na szeroką skalę pomimo tego, iż u kukurydzy zaobserwowano zróżnicowaną fenotypową odpowiedź na stosowanie herbicydów. Celem moich badań było poznanie i zrozumienie mechanizmów molekularnych zwiększonej odporności na stres herbicydowy wywołany herbicydem RoundUp®, które zaobserwowane zostały w naturalnych populacjach kukurydzy. W celu uzyskania odpowiedzi na wyżej postawione pytania naukowe zastosowano metody bioinformatyczne, dzięki którym poznano szczegóły budowy genomów dwóch linii kukurydzy różniących się wrażliwością na herbicydy, jak i metody molekularne, dzięki którym przeanalizowano zmiany w poziomach ekspresji genów, miRNA, czy metylacji DNA. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano różnice w genomach kukurydzy, a także zmiany w poziomie ekspresji genów między dwiema liniami kukurydzy mniej lub bardziej tolerancyjnymi na herbicyd. Wyniki przeprowadzonych badań (**publikacje P3, P4 i P5**) stanowią źródło nowych danych, które pomogą odpowiedzieć na pytania o uniwersalność odpowiedzi roślin na stres herbicydowy.

Soja:

Soja jest rośliną dnia krótkiego, o dużych wymaganiach termicznych, a żadna z dotychczas wyprowadzonych odmian nie jest całkowicie odporna na niskie temperatury i przymrozki. W klimacie umiarkowanym to właśnie chłód jest jednym z najistotniejszych czynników negatywnie wpływającym na wzrost i plonowanie soi. Soja wymaga stosunkowo wysokich temperatur w zakresie 15–22°C w momencie wschodu, 20–25°C podczas kwitnienia i 15–22°C w okresie dojrzałości. W umiarkowanych warunkach klimatycznych soja może być narażona na stres zimna głównie w dwóch okresach. Pierwszy okres to wschody i wczesne etapy wegetatywne rozwoju roślin (V1-V3), czyli od ostatnich dziesięciu dni kwietnia do połowy maja. Drugim najbardziej wrażliwym na chłód okresem jest faza kwitnienia, ponieważ tworzenie się strąków jest procesem krytycznym dla produktywności roślin strączkowych.

Celem moich badań było poznanie i zrozumienie różnic powstałych w wyniku działania stresu zimna w puli małych niekodujących cząsteczek RNA (sRNA, ang. *small RNA*) oraz degradomu trzech odmian soi uprawnej (Fiskeby V, Augusta i Toyomusume) i jednej odmiany dzikiego przodka soi - *Glycine soja* (PI 538411A). Oprócz oceny zmian w puli małych RNA i degradomu, zbadano także zmiany w fenotypie wybranych odmian oraz zmiany poziomów ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź roślin na niską temperaturę. Dzięki porównaniu fenotypowych symptomów stresu i molekularnych odpowiedzi na stres u różnych odmian wytypowano geny i krótkie regulatorowe RNA odpowiedzialne za adaptację do warunków stresowych. Tak kompleksowe podejście

pozwoili na poznanie mechanizmów odpowiedzi waŹnej gospodarczo roŹliny uprawnej na warunki stresu niskich temperatur (**publikacje P7 i P8**). Na terenach Polski zarejestrowano kilka odmian soi, które względnie dobrze rosną w naszej strefie klimatycznej, niemniej poznanie i zrozumienie mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź soi na stres zimna pozwoli udoskonalić uprawę tej roŹliny w strefie klimatu umiarkowanego.

4.C. Materiał roŹlinny wykorzystany w badaniach

Kukurydza:

Dwie linie wsobne kukurydzy, wybrane do szczególowej analizy molekularnej wykazywały największą (linia S245, TL) i najmniejszą (linia S79757, SL) wraŹliwość na oprysk herbicydem RoundUp® w warunkach polowych (dane nieopublikowane, prof. Kazimierz Adamczewski). Linie te uzyskano w wyniku programu krzyŹowania w ramach grantu badawczego nr. PBZ-MNiSW-2/3/2006. Dwie wybrane do badań linie kukurydzy pochodzą z testu przesiewowego tolerancji na herbicydy przeprowadzonego na 25 liniach wsobnych wybranych na podstawie podłóŹa genetycznego, rodzaju bielma i znaczenia w hodowli. Przy najwyŹszym stęŹeniu herbicydu (RoundUp® 360 SL) (300 g, 1,0 l/ha) poziom uszkodzenia bardziej tolerancyjnej odmiany kukurydzy wyniósł 40%, natomiast w bardziej wraŹliwej linii osiągnął 85% (prof. K. Adamczewski, dane nieopublikowane).

Materiał do badań został dostarczony przez prof. K. Adamczewskiego z Instytutu Ochrony RoŹlin, a materiał siewny pochodził od producenta i hodowcy kukurydzy prof. J. Adamczyka z Hodowli RoŹlin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR. Sadzonki hodowano w szklarni w kontrolowanej temperaturze (22°C), wilgotności i oŹwietleniu (16 godz./8 godz. – Źwiatło/ciemność). Wyselekcjonowano jednakowe sadzonki i dzielono je na dwie grupy: jedną opryskano herbicydem Roundup® (1,0 l/ha, 300 g glifosatu) z adiuwantem AS 500 SL (4,0 l/ha) 2 tygodnie po wŹjściu roŹlin (w stadium 4–5 liŹci), a drugą (kontrolną) grupę hodowano bez zabiegu herbicydowego. Aby poznać zarówno wczesną, jak i póŹną reakcję na warunki stresowe, dla kaŹdej testowanej odmiany, liŹcie zbierano z 6 roŹlin w okreŹlonych punktach czasowych (6 godz. i 7 dni po zastosowaniu Roundup®); liŹcie zbierano w tym samym czasie dla obu badanych grup roŹlin. Po zebraniu materiału roŹlinnego próbki natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze – 80 °C.

Soja:

We współpracy z prof. Zbigniewem Brodą i dr hab. Jerzym Nawracałą z Katedry Genetyki i Hodowli RoŹlin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu do badań wybraliśmy 3 odmiany soi: Augusta, Fiskeby V, Toyomusume oraz dziki gatunek *Glycyne soja*. Jedna z nich roŹnie w Szwecji, jest to odmiana **Fiskeby V**, niewraŹliwa na fotoperiod ani na niskie temperatury. Odmiana Fiskeby V została wyhodowana przez dr Svena A. Holmberga w Szwecji, niedaleko miasta Norrköping (58 ° 30'N). Przypuszcza się, Źe tolerancja na chłód szwedzkiej odmiany Fiskeby V pochodzi od rasy Sachalin Namikawa. Odmiana **Augusta** została z kolei wyhodowana w Katedrze Genetyki i Hodowli RoŹlin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i zarejestrowana w 2002 roku w Polsce. Została uzyskana z dwóch krzyŹówek: w pierwszym etapie wykonano krzyŹówkę pomiędy Fiskeby V i linią PI 194643 i uzyskano linię 104; w drugim kroku linię 104 skrzyŹowano z linią 11 (dziki gatunek *G. soja*). Linia 11 *G. soja* roŹnie w naturalnym Źrodowisku dalekowschodniej Rosji na szerokoŹciach geograficznych zbliŹonych do Polski i ma genotyp tolerancji na długi dzień. Dlatego Augusta ma dwa Źródła Źwiatłoczułości, a jej tolerancja na chłód pochodzi od Fiskeby V. Nasiona odmian Augusta i Fiskeby V zostały dostarczone przez dr hab. J. Nawracałę z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Kolejnym obiektem badań została ***Glycyne soja***, jednoroczny gatunek dzikiej soi, pochodząca z terenów Chin, częściowo Korei, Japonii i Rosji. Jest to dziki przodek

uprawianych obecnie odmian *Glycine max*. Genotyp ten należy do „000” grupy wczesności, czyli jest niewrażliwy na chłód. *Glycine soja* (nr dostępu PI 538411A) została zebrana nad rzeką Amur (Daleki Wschód Rosji) na szerokości geograficznej: 52 ° 58'39 " N i długości geograficznej: 127 ° 21'44 " E. W celach kontrolnych postanowiliśmy również przeanalizować odmianę należącą do I grupy wczesności, wrażliwą na niskie temperatury. Jest to odmiana **Toyomusume**, która jest uprawiana na japońskiej wyspie Hokkaido, głównie do produkcji tofu i nie jest przystosowana do warunków klimatycznych panujących w Polsce.

Przed siewem nasiona soi zainokulowano *Bradyrhizobium japonicum* (HiStick® Soy, BASF) w celu wywołania tworzenia nodul. Odmiany soi Augusta, Fiskeby V, Toyomusume i *G. soja* posadzono w doniczkach wypełnionych mieszanką uniwersalnej ziemi doniczkowej i piasku w stosunku 3:1. Rośliny hodowano w kontrolowanych warunkach środowiskowych w fitotronie w 20°C przy wilgotności względnej 60% i fotoperiodzie 16:8 godzin (światło:ciemność) przed eksperymentami. Rośliny podzielono na trzy grupy, przy czym każdą grupę poddano stresowi zimna w innym stadium rozwojowym. Pierwsza partia roślin została poddana stresowi na etapie VE (siewki) przez utrzymywanie ich w temperaturze 4°C przez 48 godzin w komorach Percival. Następna partia roślin została wystawiona na działanie temperatury 8°C przez 120 h (5 dni) w fazie wzrostu V1 (pierwszy trójlistek). Ostatnia grupa roślin była stresowana w temperaturze 14°C w dzień i 7°C w nocy przez 168 godzin (7 dni) w fazie wzrostu R1 (początek kwitnienia). W grupie kontrolnej i stresowanej hodowano od 20 do 30 roślin soi.

Tabela 1. Schemat eksperymentów stresowania soi niskimi temperaturami.

Faza wzrostu soi	Optymalne temperatury wzrostu soi	Stres temperaturowy (dzień/noc)	Czas trwania stresu zimna
VE – siewki	20°C	4°C/4°C	48 h
V1 – wzrost wegetatywny	20°C	8°C/8°C	120 h (5 dni)
R1 – wzrost reprodukcyjny	20°C	14°C/7°C	168 h (7 dni)

4.D. Wyniki prowadzonych badań

W sekcjach 4.D.1.-4.D.2. przedstawiono szczegółowe cele oraz wyniki dla poszczególnych zagadnień/obiektów badawczych.

4.D.1.

Analiza wpływ stresu herbicydowego na rodzime odmiany kukurydzy różniące się wrażliwością na Roundup®.

Kukurydza:

Obecnie kukurydza zajmuje trzecie miejsce w światowej strukturze zasiewów (światowa produkcja wynosi szacunkowo 1100-1200 mln ton, [3]), a areal jej upraw ciągle wzrasta, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Kukurydzę wykorzystuje się w przemyśle spożywczym do produkcji kaszy, mąki, olejów, ale także do bezpośredniego spożycia lub jako półprodukty. Zwiększa się zainteresowanie kukurydzą jako typową rośliną przemysłową, którą stosuje się w procesie fermentacji alkoholowej do pozyskania etanolu (zarówno spożywczego jak i paliwowego), otrzymuje się z niej wysokiej jakości skrobię, wykorzystuje się ją do celów energetycznych poprzez spalanie (słoma, rdzenie kolbowe) lub produkcję biogazu (biomasa). Słoma kukurydziana jest poza tym surowcem do produkcji papieru i materiałów izolacyjnych. Dominującym celem uprawy pozostaje jednak przemysł

paszowy, gdzie kukurydza jest wykorzystywana jako materiał na kiszonki z całych roślin lub pasze z ziarna i kolb. Ze względu na swoje znaczenie oraz liczne zastosowania była także wykorzystywana jako organizm modelowy do poznania wielu procesów komórkowych, np. mejozy, mitozy, działania transpozonów, rekombinacji czy imprintingu genetycznego.

Nowoczesne rolnictwo w konsekwencji wykonywania rutynowych zabiegów agrotechnicznych, takich jak nawożenie czy opryski insektycydami/herbicydami, wprowadza do uprawy roślin wiele substancji egzogennych, które lokalnie mogą osiągać wysokie stężenia i które są dla wzrastających roślin abiotycznymi czynnikami stresogennymi. Połowa obecnie stosowanych pestycydów to herbicydy. Najbardziej znanym czynnikiem aktywnym wielu herbicydów jest glifosat – związek selektywny, ogólnoustrojowy, który hamuje syntazę 5-enolopirogronianoszikimowo-3-fosforanowej (EPSPS) zakłócając syntezę aminokwasów aromatycznych i ich pochodnych [4]. Glifosat został po raz pierwszy użyty do zapobiegania kiełkowania nasion chwastów. Aby jednak uzyskać lepszą ochronę plonów, konieczne było zastosowanie go jako herbicydu powszodowego. Kukurydza zwyczajna (*Zea mays*) jako roślina uprawiana w szerokim rozstawie międzyrzędzi jest szczególnie narażona na zachwaszczenie, dlatego często w początkowych stadiach wzrostu siewek stosuje się opryski herbicydami, aby zmniejszyć konkurencję o światło, wodę i składniki mineralne. Stres herbicydowy nie był do tej pory badany na szeroką skalę pomimo faktu, iż u kukurydzy zaobserwowano zróżnicowaną fenotypową odpowiedź roślin na stosowanie herbicydów.

Genom (publikacja P3)

Genom kukurydzy, który ulegał kilkakrotnym duplikacjom, zbudowany jest z 10 chromosomów złożonych z $2,3 \cdot 10^9$ nukleotydów. W genomie kukurydzy kodowanych jest ok. 40 tys. genów dających produkty białkowe, jednak jego ogromna większość, bo aż 85%, stanowią sekwencje różnego typu elementów transpozonowych [5, 6]. Badania porównawcze potwierdziły olbrzymią zmienność genetyczną nawet blisko ze sobą spokrewnionych linii kukurydzy, która znacznie przewyższa różnorodność spotykaną u innych organizmów eukariotycznych. Wykazano, że między dwiema dowolnie wybranymi liniami kukurydzy polimorfizm pojedynczych nukleotydów występuje średnio co 100 nt. Genom kukurydzy cechuje występowanie nie tylko polimorfizmów typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) czy typu delecja/insercja (indel), ale także różnice w strukturze chromosomów, czy zmieniona lokalizacja genów i elementów powtórzonych [7, 8].

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było zbadanie różnic genetycznych między liniami tolerancyjną i wrażliwą. Aby przezwyciężyć złożoność genomu kukurydzy zastosowano dwie technologie sekwencjonowania: Illumina (biblioteki o długościach 400 pz i 500 pz, generujące bardzo dokładne odczyty sekwencjonowania) i SMRT PacBio (dwie biblioteki „mate-pair” o długości wstawki 8 kb i 11 kb, generujące mniej precyzyjne odczyty). Długie odczyty PacBio, które są w stanie pokryć znaczące regiony chromosomalne i umożliwiają identyfikację dużych delecji, insercji, duplikacji lub inwersji [9], pozwoliły na wykrycie różnic strukturalnych między genomami wybranych linii wsobnych kukurydzy. Zidentyfikowano łącznie 11 172 wariantów strukturalnych reprezentujących 6062 insercje i 5110 delecje (zbadano tylko warianty z 5 lub więcej odczytami). Większość wariantów znajdowała się w regionach niekodujących, takich jak regiony przed (ang. *upstream*) i za genami (ang. *downstream*) oraz regiony intronowe i międzygenowe.

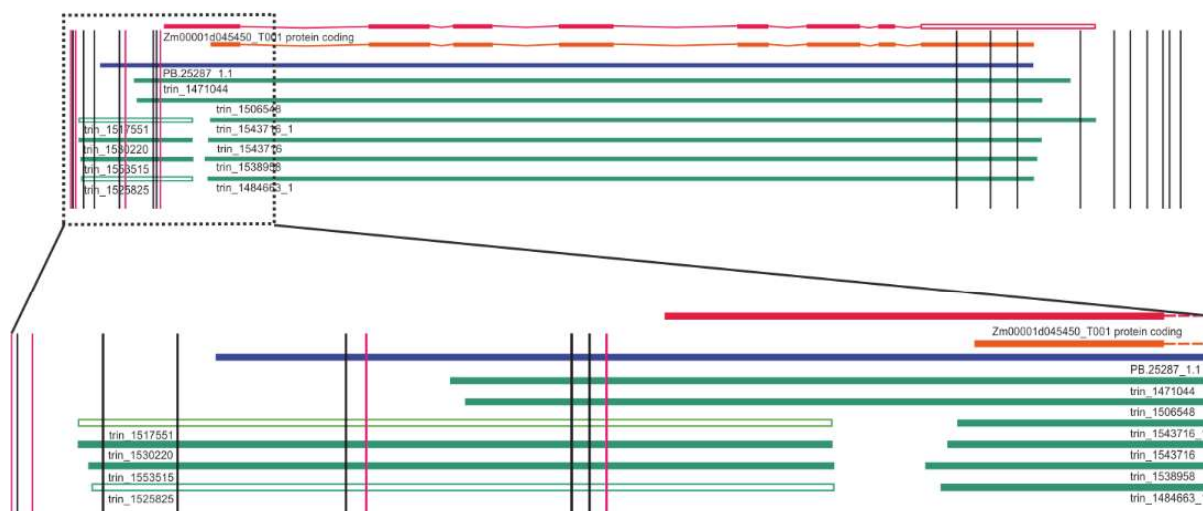
Do identyfikacji mniejszych zmian strukturalnych, takich jak SNP i polimorfizmy typu insercja/delecja, w genomach tolerancyjnym i wrażliwym linii kukurydzy wykorzystano odczyty Illumina. Po dopasowaniu każdego odczytanego zestawu danych do referencyjnego genomu linii kukurydzy B73, odnotowano zmiany SNP i indeli, które występują tylko w linii tolerancyjnej. W rezultacie otrzymano obszerną listę zmian genetycznych

obserwowanych wyłącznie w linii tolerującej RoundUp® (TL). Podejście to zaowocowało identyfikacją 4 068 829 SNP i 729 866 indeli, wśród których 113 775 SNP i 15 277 indeli znajdowało się w regionach kodujących białka. Zdecydowana większość wariantów występowała w regionach międzygenowych (25,13%), regionach przed i za genami (odpowiednio 24,9% i 25,18%) i intronowych (17,56%). Dane z sekwencjonowania zostały zdeponowane w bazie ENA (European Nucleotide Archive) pod numerem PRJEB31400 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB31400>).

Analiza ontologii genów (GO, ang. *gene ontology*) wykazała, że spośród genów z delecjami najliczniejszymi terminami GO w kategorii ‘funkcje molekularne’ były wiązanie jonów żelaza, aktywność metylotransferazy, aktywność transferazy i wiązanie RNA, podczas gdy w kategorii ‘procesy biologiczne’ najliczniejszymi terminami były biosynteza glikogenu, deubikwitynacja sprzężona z białkiem K48, metabolizm węglowodanów i transport jonów metali. Warto zauważyć, że niektóre z tych genów były również zidentyfikowane jako część reakcji odpowiedzi na ciepło, stres biotyczny (niczenie) i stres oksydacyjny [10-12]. Z drugiej strony, wśród genów, na które wpływają insercje, najbardziej rozpowszechnionymi terminami GO w kategorii ‘funkcja molekularna’ były wiązanie RNA, aktywność transferazy SUMO i aktywność hydrolazy. W kategorii ‘procesy biologiczne’ najczęściej używanymi terminami GO były sumoilacja białek, wzrost komórek, hydroliza ATP i odpowiedź komórkowa na bodziec zewnątrzkomórkowy. W ostatniej kategorii zidentyfikowano dwa czynniki transkrypcyjne MYB.

Aby poznać zmiany w genomie, które mogą być odpowiedzialne za fenotyp tolerancji na stres herbicydowy, zbadano geny i ścieżki zaangażowane w metabolizm glifosatu, takie jak szlak kwasu szikimowego. Najpierw przeanalizowano warianty genu syntazy 5-enolopirogronianiano-szikimiano-3-fosforanowej (EPSPS) jako najbardziej znanego przykładu enzymu hamowanego przez glifosat [13-14]. Do tej pory opisano kilka sposobów przezwyciężenia podatności na glifosat; na przykład substytucja aminokwasów w miejscu aktywnym enzymu i zmienność liczby kopii genu oraz jego nadekspresja. W przypadku badanej tolerancyjnej linii kukurydzy nie zidentyfikowano dużych wariantów strukturalnych, zidentyfikowano jedynie kilka SNP i indeli w obrębie lub w pobliżu genu EPSPS (Rys. 1). Co ważne, wszystkie zidentyfikowane zmiany miały według VEP (predyktor efektu wariantowego, ang. *variant effect predictor*) umiarkowany wpływ na ekspresję genów i żadna z nich nie była zlokalizowana w regionie kodującym.

5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
(Zm00001d045450)



Rysunek 1. Lokalizacja zidentyfikowanych SNP (czarny) i zmian typu indel (różowy) w genie *EPSPS*. Na czerwono zaznaczono strukturę genu *EPSPS* zgodnie z adnotacją do wersji 4 genomu kukurydzy, a na pomarańczowo - adnotację do wersji 3. Niebieska linia reprezentuje publicznie dostępną izoformę transkryptu *EPSPS* pełnej długości, zidentyfikowaną za pomocą metody iso-seq; zielone linie reprezentują publicznie dostępne transkrypty Trinity złożone z danych RNA-seq.

W przypadku chloroplastowej dehydrogenazy szikimowej (ang. *chorismate synthase chloroplastic*) i chloroplastycznej syntazy choryzmianowej (ang. *bifunctional 3-dehydroquininate dehydratase/shikimate dehydrogenase chloroplastic*) wpływ na ekspresję genów był wysoki, zmiany wpływały na miejsca splicingu i przesunięcie ramki odczytu. Inne zidentyfikowane zmiany strukturalne, które mogą skutkować zwiększoną tolerancją na glifosat, były zlokalizowane w genach kodujących transportery fosforanów. Wcześniej sugerowano, że transportery fosforanów 1 i 2 mogą uczestniczyć w aktywnym transporcie glifosatu do komórek roślinnych [15-18]. Inne zidentyfikowane transportery, ze zmianami typu SNP i indel, uczestniczą w dystrybucji nieorganicznego fosforanu, 3-fosfoglicerynianu, fosforanów triozy i, w mniejszym stopniu, fosfoenolopirogronianu (PEP), który jest substratem dla szlaku szikimowego. Kolejną grupą genów, w której zidentyfikowano warianty strukturalne o potencjalnie dużym wpływie na ekspresję, które zwróciły naszą uwagę w kontekście odpowiedzi na stres herbicydowy, były geny kodujące białka zaangażowane w ekstruzję związków wielolekowych i toksycznych (MATE, ang. *multidrug and toxic compound intrusion*). Ta rodzina białek jest jedną z najbardziej konserwatywnych i największych rodzin transporterów w roślinach i działa jako błonowe nośniki leków i związków syntetycznych, a także kwasów organicznych, hormonów roślinnych i metabolitów wtórnych [19].

Przedstawione wyniki analizy sekwencjonowania dwóch linii wsobnych kukurydzy pozwoliły poznać szlaki molekularne, które mogą warunkować cechę tolerancji na glifosat. Zidentyfikowane w sekwencjach kodujących warianty i zmiany stanowią dobry punkt wyjścia do przeprowadzenia dalszych analiz biochemicznych i genetycznych, zwłaszcza tych dotyczących genów kodujących enzymy szlaku szikimowego (dwufunkcyjna dehydrataza 3-dehydrochinianu/dehydrogenaza szikimowa i syntaza choryzmianowa). Opisane zmiany zidentyfikowane w sekwencjach kodujących mogą prowadzić do wzrostu wydajności szlaku szikimowego, a tym samym kompensować zmniejszoną aktywność *EPSPS* wywołaną przez glifosat. Ponadto, w genach kodujących karboksylazę fosfoenolopirogronianową i jej regulator, kinazę karboksylazy fosfoenolopirogronianowej zidentyfikowano warianty o dużym wpływie na ekspresję genów. Potencjalny spadek aktywności karboksylazy fosfoenolopirogronianowej może prowadzić do zwiększonej dostępności PEP, zapewniając kolejny poziom kompensacji hamowania *EPSPS*. Inne mechanizmy odpowiedzialne za cechy tolerancji mogą być związane ze zmienionym transportem glifosatu przez transportery fosforanów lub wielolekowe i toksyczne białka ekstrazyjne. Wszystkie wyżej wymienione mechanizmy mogą prowadzić do zmian w efektywnym wewnątrzkomórkowym stężeniu glifosatu i pozwolić roślinom adaptować się do warunków stresu herbicydowego.

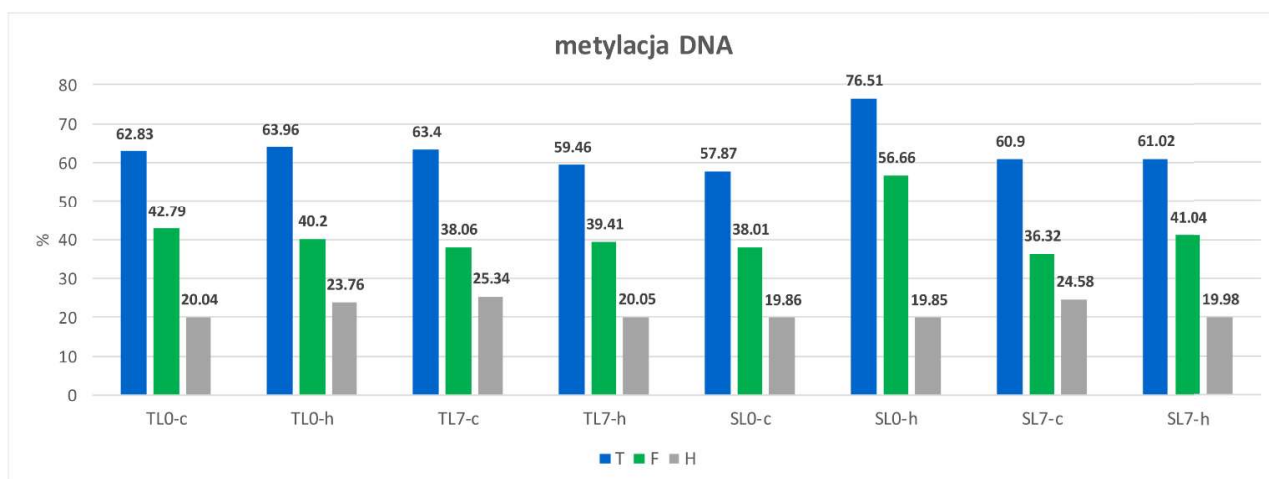
Metylom (publikacja P4)

Metylacja cytozyny w pozycji C5 w DNA odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, aktywności elementów transpozonowych, obronie przed obcym DNA i dziedziczeniu określonych wzorców ekspresji genów. Związek między narażeniem na stres, biotyczny jak i abiotyczny, a specyficznymi dla danej sekwencji zmianami we wzorach i poziomach metylacji DNA były hipotetyczne dopóki nie wykazano, że stres może takie zmiany indukować i w konsekwencji prowadzić do zmian we wzorze i poziomach ekspresji genów [20-21]. Transkrypcyjne wyciszanie genów związane jest z hipermetylacją sekwencji promotorowych genów, podczas gdy wyciszanie potranskrypcyjne genów wiąże się z hipermetylacją sekwencji transkrybowanych lub kodujących [22]. W

genomach roślin metylowane reszty cytozyny (m5C) znajdują się w trzech kontekstach sekwencyjnych: symetrycznych CG i CNG oraz asymetrycznym CNN (gdzie N to A, T lub C).

Celem pracy była identyfikacja zmian w poziomach i wzorach metylacji DNA, które mogą leżeć u podstaw odporności *Z. mays* na herbicydowe warunki stresowe (grant SONATA, NCN, UMO-2011/01/D/NZ9/03631, kierownik – dr Agata Tyczewska). Aby przeanalizować zmiany we wzorach i poziomach metylacji DNA, zastosowano technikę MSAP (ang. *Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism*) i 24 pary starterów. Produkty amplifikacji DNA, dla każdej pary starterów osobno, były rozdzielane przez 18 h na 6% żelach poliakryloamidowych o wymiarach 50x33 cm i wizualizowane za pomocą Sybr Gold (Thermo Fisher Scientific).

Łącznie uzyskano 888 i 826 wyraźnych prążków odpowiednio dla odmiany TL (S245) i SL (S79757). Na podstawie uzyskanych obrazów elektroforetycznych możliwa była analiza zmian całkowitego poziomu metylacji DNA u kukurydzy pod wpływem stosowanego herbicydu (Rys. 2). W warunkach kontrolnych całkowity poziom metylacji sekwencji 5'-CCGG-3' wynosił 63,11% dla TL i 59,38% dla SL. Całkowity poziom metylacji DNA wahał się od 62,38% (6 h po zabiegu) do 63,40% (7 dni po zabiegu) dla TL i od 57,87% (6 h po zabiegu) do 60,90% (7 dni po zabiegu) dla SL. Stres herbicydowy spowodował zwiększenie ilości w pełni metylowanych sekwencji w obu testowanych liniach, 6h po oprysku. Zmiana była bardzo nieznaczna dla TL (1,13%) w porównaniu do SL (18,64%) (rys. 2). Siedem dni po oprysku herbicydem spadek poziomu metylacji zaobserwowano dla linii TL (3,94%) i prawie nie odnotowano różnicy dla linii SL (0,12%). Co ważne, całkowicie zmetylowanych loci było zawsze więcej niż hemi-metylowanych.



Rysunek 2. Zmiany poziomów metylacji DNA w liniach TL i SL *Z. mays* w warunkach kontrolnych i pod wpływem stresu herbicydowego.

T - całkowity poziom metylacji; F - miejsca w pełni metylowane; H - miejsca hemimetylowane. TL6h-C, linia TL 6 godz. po oprysku, kontrola; TL6h-H, linia TL 6 godz. po oprysku, herbicyd; TL7d-C, linia TL 7 dni po oprysku, kontrola; TL7d-H, linia TL 7 dni po oprysku, herbicyd; SL6h-C, linia SL 6 godz. po oprysku, kontrola; SL6h-H, linia SL 6 godz. po oprysku, herbicyd; SL7d-C, linia SL 7 dni po oprysku, kontrola; SL7d-H, linia TL 7 dni po oprysku, herbicyd. Największe zmiany w poziomie metylacji DNA w dwóch badanych liniach *Z. mays* w warunkach stresu herbicydowego zaobserwowano w linii SL 6 h po zastosowaniu herbicydu. Zmiany te przypisuje się dużemu wzrostowi (o 18,65%) liczby miejsc w pełni zmetylowanych.

Aby zanalizować zmiany we wzorach metylacji cytozyny pod wpływem stresu herbicydowego w liniach TL i SL, przeanalizowano i policzono wszystkie możliwe wzory prążków (brak zmian, demetylacja i metylacja, Tab. 2).

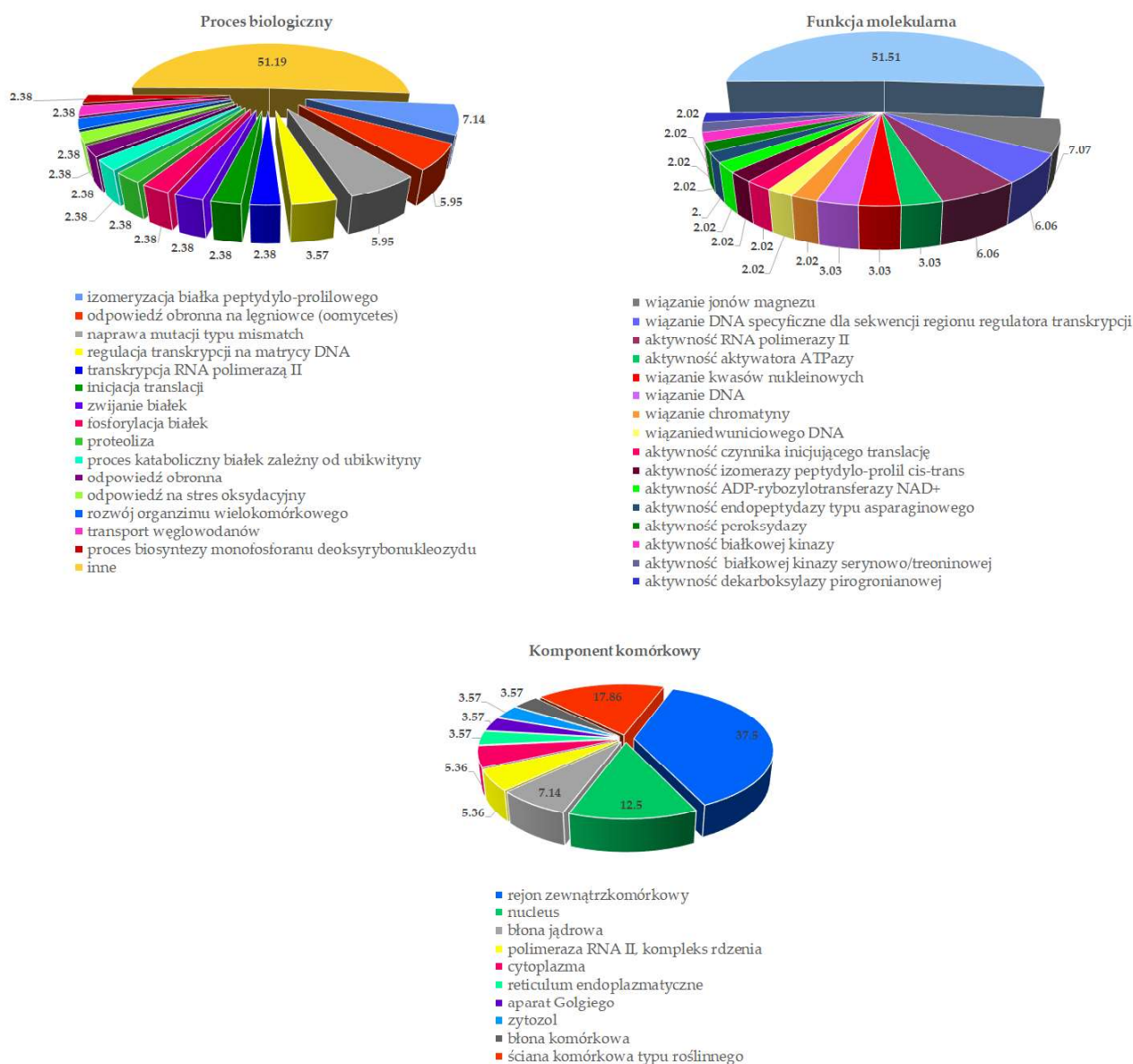
Tabela 2. Analiza zmian w poziomach i wzorach metylacji DNA w badanych odmianach kukurydzy pod wpływem herbicydu Roundup®. Liczbę prążków i procenty występowania podano dla badanych linii *Z. mays* i dla wszystkich testowanych warunków.

<i>Klasa</i>	<i>Z. mays</i>			
	<i>TL6h-</i>	<i>TL7d-</i>	<i>SL6h-</i>	<i>SL7d-</i>
	<i>C/TL6h-H</i>	<i>C/TL7d-H</i>	<i>C/SL6h-H</i>	<i>C/SL7d-H</i>
	<i>Wartość procentowa (liczba prążków)</i>			
<i>Brak zmian</i>	72,63% (645)	64,41% (572)	46,00% (380)	72,76% (601)
<i>Demetylacja</i>	13,40% (119)	19,25% (171)	17,32% (143)	10,52% (87)
<i>Metylacja</i>	13,96% (124)	16,32% (145)	36,68% (303)	16,70% (138)

TL6h-C - linia TL 6 h po oprysku, kontrola; TL6h-H - linia TL 6 godzin po oprysku, herbicyd; TL7d-C - linia TL 7 dni po oprysku, kontrola; TL7d-H - linia TL 7 dni po oprysku, herbicyd; SL6h-C — linia SL 6 h po oprysku, kontrola; SL6h-H — linia SL 6 h po oprysku, herbicyd; SL7d-C — linia SL 7 dni po oprysku, kontrola; SL7d-H — linia SL 7 dni po oprysku, herbicyd.

W przypadku TL, metylacja 72,63% i 64,41% miejsc 5'-CCGG-3' nie zmieniła się pod wpływem oprysku herbicydem, odpowiednio 6 h i 7 dni po oprysku. Zauważono różnicę w zdarzeniach demetylacji w dwóch różnych punktach czasowych w TL - 13,40% w porównaniu z 19,25% - i różnicach w zdarzeniach metylacji -13,96% i 16,32%, odpowiednio po 6 godzinach i 7 dniach po zabiegu. Dla SL z 826 prążków, 46,00% i 72,76% 5'-CCGG-3' pozostało niezmiennych pod wpływem stresu, odpowiednio 6 h i 7 dni po oprysku. Nastąpił spadek zdarzeń demetylacji po 7 dniach w porównaniu z tym po 6 h od oprysku (17,32% do 10,52%). Największą różnicę zaobserwowano dla zdarzeń metylacji (19,98%), spadek z 36,68% do 16,70% tydzień po oprysku.

Wybrane fragmenty DNA wyizolowano z żeli poliakryloamidowych i zsekwencjonowano (metodą Sanger) w firmie zewnętrznej (Genomed, Polska). Łącznie uzyskano sekwencje 197 fragmentów DNA, które poddano analizie bioinformatycznej z wykorzystaniem baz danych NCBI i MaizeGDB. Spośród 197 fragmentów aż 151 fragmentów zidentyfikowano (z dokładnością większą niż 90%) w co najmniej jednej z przeszukiwanych baz danych. Wśród zidentyfikowanych sekwencji były geny kodujące transferazy, białka transporterowe, metylotransferazy, hydrolazy, transpozony, białka rybosomalne, cytochromy i białka uczestniczące w procesach transkrypcji i biorące udział w reakcji na stres (Rysunek 3).



Rysunek 3. Wykres przedstawiający wyniki analizy wzbogacenia GO wybranych fragmentów DNA różniących się wzorem metylacji DNA w kategoriach: proces biologiczny, funkcja molekularna, komponent komórkowy. Wartości podano w procentach (%).

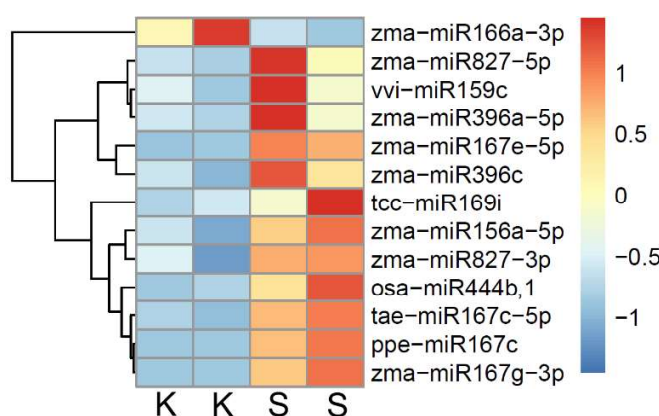
Selektywny nacisk wywierany przez ciągłe stosowanie herbicydów może wymuszać reakcje adaptacyjne nie tylko u chwastów (zjawisko obserwowane od wielu lat), ale także w roślinach uprawnych. Niniejsza analiza wykazała, że stres herbicydowy, w zależności od naturalnej podatności odmian *Z. mays* na herbicyd, wywołał różne zmiany w poziomach i wzorach metylacji DNA w dwóch badanych odmianach kukurydzy. Takie zmiany mogą z kolei znaleźć odzwierciedlenie we wzorach i poziomach ekspresji poszczególnych fragmentów genomu, co może skutkować zróżnicowaną odpowiedzią organizmów na warunki stresowe. Ogromne zmiany w poziomie i wzorze metylacji DNA zaobserwowane dla linii SL 6h po oprysku herbicydem (18,64%) mogą doprowadzić do deregulacji ekspresji genów, która w rezultacie może doprowadzić do śmierci rośliny. Natomiast zmiana poziomu metylacji

DNA w linii TL w następstwie aplikacji herbicydów była bardzo niewielka (1,13%). Wydaje się, że naturalna odporność upraw na herbicydy jest znacznie bardziej skomplikowana niż zmiana pojedynczej cechy i opiera się na wielu mechanizmach i różnych poziomach regulacji ekspresji informacji genetycznej (epigenetyka, małe niekodujące RNA, zmiany w ekspresji i składzie produktów genowych), które razem składają się na wzrost podatności poszczególnych odmian na warunki stresu.

miRNA (publikacja P5)

Do tej pory niewiele wiadomo na temat udziału miRNA w odpowiedzi roślin na oprysk herbicydami. W pracy **P5** opisano rolę miRNA w późnej odpowiedzi kukurydzy na jeden z najczęściej stosowanych na świecie herbicydów - RoundUp®. Profilowanie ekspresji miRNA przeprowadzono w liściach kukurydzy 7 dni po oprysku. Celem pracy była identyfikacja różnic w profilu i poziomach ekspresji znanych, jak również nowych miRNA w linii kukurydzy S79757 (SL) w warunkach kontrolnych i po oprysku herbicydem. Biblioteki cDNA przygotowano do sekwencjonowania za pomocą zestawu TruSeq small RNA Preparation Kit (Illumina). Genome Analyzer IIX (Illumina) został użyty do sekwencjonowania pojedynczych odczytów o długości 72 nt. Krótkie odczyty sekwencjonowania dopasowano do pełnego zestawu znanych miRNA z *Magnoliophyta* (6547 prekursorów i 7956 dojrzałych sekwencji miRNA) (miRBase, wydanie 21). Odczyty sekwencji, które nie ujawniły podobieństwa do znanych miRNA kukurydzy, ale zamiast tego zostały zmapowane do regionów prekursorowych pokrywających się z pozycjami znanych miRNA z innych organizmów, rozważono jako nowe konserwatywne miRNA kukurydzy. W ten sposób zidentyfikowano 13 miRNA, obecnych w innych roślinach, ale nie przypisanych kukurydzy. Liczba odczytów sekwencji identyfikujących nowe miRNA różniła się od 12. dla stu-miR479 do 129. dla ptc-miR6478; jednak we wszystkich przypadkach dojrzałe miRNA obserwowano w co najmniej trzech z czterech sekwencjonowanych bibliotek cDNA (dwóch kontrolnych i dwóch badanych replikach), co potwierdza wiarygodność obserwacji.

Zaobserwowano ekspresję 51 reprezentatywnych miRNA, w tej grupie zidentyfikowano 13 miRNA, które wykazały statystycznie istotne zmiany poziomu ekspresji (wartość $p < 0,05$, wartość $FDR < 0,01$) w roślinach opryskanych herbicydem (Rysunek 4). Wykazano, że poziom ekspresji 12. miRNA, należących do rodzin miR167, miR396, miR159, miR156, miR169, miR444 i miR827, były znacząco podwyższone (od 1,6 do 3,6), a jeden,



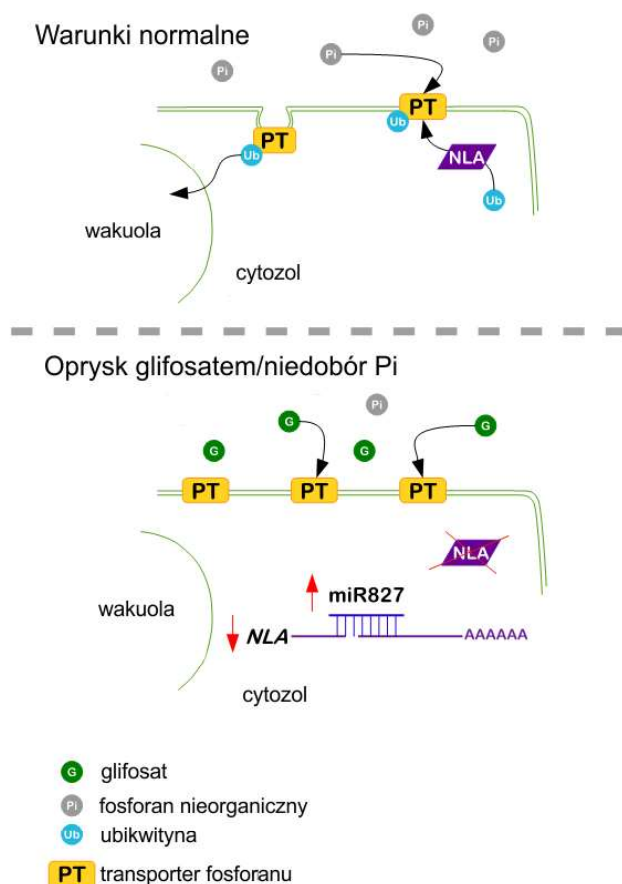
miR166, obniżony po oprysku herbicydem w linii wrażliwej na działanie RoundUp®.

Rysunek 4. miRNA ze znaczną różnicową ekspresją po oprysku herbicydem.

Mapa cieplna przedstawia profile ekspresji miRNA. Skala kolorów: wartość dodatnia i kolor czerwony oznaczają poziom ekspresji wyższy od średniej, wartość ujemna, a kolor niebieski reprezentuje poziom ekspresji niższy od średniej, 0 i kolor żółty jest równy średniej; K - kontrola, S - stres.

Wszystkie zidentyfikowane u kukurydzy SL (linii S79757) miRNA o zmienionym poziomie ekspresji pod wpływem stresu herbicydowego są opisane w literaturze, a ich docelowe mRNA są dobrze udokumentowane. Jednak aby sprawdzić czy nowe cząsteczki miRNA, ulegające zróżnicowanej ekspresji po oprysku herbicydu różnią się potencjałem funkcjonalnym od znanych miRNA kukurydzy, przewidzieliśmy ich cząsteczki docelowe. Dla

wszystkich miRNA o zróżnicowanej ekspresji zidentyfikowaliśmy 264 transkrypty, odpowiadające 122 genom, z których 48 koduje niescharakteryzowane białka. Analiza wzbogacenia ontologii genów (GO) wykazała, że większość białek o znanej funkcji była zlokalizowana w jądrze i była zaangażowana w regulację procesu transkrypcji. Jedyną wzbogaconą kategorią GO niepowiązaną z regulacją ekspresji genów była regulacja lub udział w aktywności hydrolazy, z 17. przedstawicielami. Tę funkcję przypisywano głównie białkom wiążącym ATP. Co ważne, wszystkie przewidywane docelowe dla miRNA mRNA, w tym te zidentyfikowane dla nowych członków znanych rodzin miRNA kukurydzy, były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [23-25]. W pracy P6 zaproponowano rolę miR827-3p w utrzymaniu homeostazy Pi (fosforu nieorganicznego) i odpowiedzi na stres wywołany herbicydem RoundUp® (Rys. 5). W warunkach optymalnego poziomu Pi gen NLA (ang. *Nitrogen Limitation Adaptation*) zwykle ulega ekspresji. Białko NLA pośredniczy w ubikwitinacji i degradacji błonowych transporterów fosforanowych. Zależny od herbicydów podwyższony poziom ekspresji miRNA-827 (związanych z utrzymaniem homeostazy fosforanów) najprawdopodobniej powoduje wzrost poziomu akumulacji transporterów fosforanowych w błonach komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonego wychwytu glifosatu zamiast zwiększonego wchłaniania Pi i w efekcie prowadzi do zaburzenia homeostazy Pi w organizmie.



Rysunek 5. Rola miR827 w homeostazie Pi i w odpowiedzi roślin na stres herbicydowy.

W warunkach optymalnego poziomu Pi (fosforu nieorganicznego) gen NLA ulega ciągłej ekspresji. Białko NLA pośredniczy w ubikwitinacji i degradacji membranowych transporterów fosforanów. W stanach niedoboru Pi, jak również po oprysku glifosatem, dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji miR827 (który reguluje ekspresję NLA), co, w konsekwencji, prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji tego białka. W rezultacie w błonach komórkowych dochodzi do zwiększenia akumulacji transporterów fosforanów, co prowadzi do zwiększonego pobierania Pi lub glifosatu (w zależności od warunków).

4.D.2 soja

Soja należy do rodziny roślin bobowatych, pochodzi z południowo-wschodnich rejonów Azji, a została udomowiona przez chińskich rolników ok. 4500 lat temu. Wzrost areалу upraw soi na świecie jest bardzo dynamiczny. W ciągu ostatnich 30 lat światowa produkcja soi potroiliła się i w sezonie 2021 przekroczyła 350 mln ton. Główne rejony uprawy to: Ameryka Północna, Azja oraz Ameryka Południowa. Nasiona soi są bardzo ważnym

surowcem do produkcji pasz i stanowią też cenny pokarm dla człowieka. Na bazie nasion soi wytwarza się takie produkty, jak: olej sojowy, mączka sojowa, kasza sojowa, mleko sojowe, tofu, tempeh czy lecytynę. Preparaty z soi dodawane są także do różnych przetworów, m.in. konserw mięsnych, wędlin, aby zwiększyć ich wartości odżywcze. Produkty spożywcze wytwarzane z soi są szczególnie chętnie włączane do diety przez vegetarian, jako alternatywa dla mięsa. Nasiona soi zawierają bardzo dużo, bo aż 30-45% białka, które ma optymalny dla człowieka skład aminokwasów, szczególnie w porównaniu do innych białek roślinnych. Ponadto, nasiona soi zawierają dużo tłuszczu (~20%) oraz witamin z grupy B. Większość soi i przetworów sojowych wykorzystywanych w Europie jest importowana. Wśród krajów europejskich Polska stanowi stosunkowo duży rynek zbytu dla soi i jej przetworów, jednak rynek krajowy ogranicza się w zdecydowanej większości jedynie do konsumpcji importowanych dóbr. Szacuje się, że import śrutki sojowej wynosi obecnie około 2,2 mln ton rocznie, przy bardzo ograniczonym areale upraw soi. W rezultacie Polska jest w około 80% uzależniona od importu pasz wysokobiałkowych [26-28].

U podstaw wszystkich roślinnych mechanizmów adaptacji do stresu leży informacja genetyczna i zakodowane w niej różnorodne mechanizmy regulujące jej ekspresję, zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i potranskrypcyjnym. W pracy przeglądowej **P6** opisano wyniki analizy literaturowej wpływu stresów biotycznych (*F. oxysporum*, ciemna nicienica, wirus mozaiki soi) i abiotycznych (susza, stres wodny, stres zimny, zasolenie, niedobór fosforu) na wzrost i plonowanie różnych odmian soi i innych ważnych gospodarczo organizmów. W niniejszym artykule skupiono się na dostępnych na dużą skalę, wysokowydajnych analizach transkryptomów (RNA kodujące białka, a także RNA niekodujące białka - szczególnie miRNA) i proteomów w warunkach stresu. Analizy rozpoczęto od krótkich niekodujących RNA – miRNA i siRNA. Opisano role tych cząsteczek w adaptacji do warunków stresu suszy i zasolenia, a także zimna, utrzymaniu homeostazy w organizmie, metabolizmie siarki, miedzi i w odpowiedzi na podwyższone stężenia metali ciężkich. Opisano również nieliczne doniesienia o roli siRNA w odpowiedzi roślin na warunki stresowe. Przedstawiono także funkcje niekanonicznych niekodujących RNA. Pierwszy podrozdział poświęcono cząsteczkom regulatorowym wywodzącym się z tRNA. Zostały one odkryte stosunkowo niedawno, zauważono, że ich ilości w organizmach poddawanych stresowi różnią się i to zarówno w porównaniu z kontrolą niestresowaną, jak i w tych stresowanych odmiennymi warunkami. Krótkie regulatorowe cząsteczki RNA mogą także pochodzić z snoRNA lub mRNA, tym zagadnieniom poświęcono kolejne dwa podrozdziały. Ostatni rozdział publikacji **P6** poświęcono długim niekodującym RNA.

Świat naukowy wciąż poszukuje nowych odmian roślin uprawnych charakteryzujących się większą tolerancją na niekorzystne warunki środowiskowe, zarówno biotyczne jak i abiotyczne, a także posiadających lepszą jakość i wyższą wydajność produkcji. W obliczu globalnych zmian klimatycznych i stale rosnącej populacji ludzkiej presja na znalezienie nowych, lepiej przystosowanych odmian jest jeszcze większa niż dotychczas, dlatego nieustannie wpływamy na genomy roślin konwencjonalnymi technikami hodowlanymi lub metodami odkrytymi wraz z rozwojem biologii molekularnej. Plastyczność genomu soi pozwoliła na rozszerzenie jej uprawy daleko poza miejsce jej pochodzenia, a dzięki swoim unikalnym właściwościom stała się bazą dla dzisiejszego rolnictwa. Postępy dokonane w biotechnologii i biologii molekularnej w ostatnich dziesięcioleciach radykalnie zmieniły nasze rozumienie procesów regulacji ekspresji genów i reakcji roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Opisane poniżej przykłady eksperymentów i badań pokazują, jak bardzo skomplikowane są wzajemne relacje między roślinami a środowiskiem.

Analizy fenotypowe dwóch odmian soi odpornych na warunki stresu zimna (publikacja P7)

Do analiz fenotypowych odpowiedzi soi na stres zimny wybrano dwie odmiany mniej wrażliwe na chłód: Fiskeby V i Augusta. Ocenę wpływu stresu chłodu na fenotyp soi przeprowadzono poprzez pomiar kilku ważnych

parametrów. Wzrost wegetatywny określano mierząc wysokość roślin na etapach V1 i R1 oraz obliczając liczbę dni między etapami wzrostu. Tempo wzrostu obliczono następnie jako różnicę wysokości między roślinami R1 i V1 podzieloną przez liczbę dni, w których rośliny rosły z fazy V1 do fazy R1. Podczas kwitnienia mierzono kilka parametrów, w tym liczbę kwiatów na każdej roślinie, liczbę strąków na każdej roślinie oraz liczbę nasion w każdym strąku. Na koniec, po zbiorze, zważono i policzono nasiona z grup stresowych i kontrolnych. Na podstawie tych danych obliczono efektywność kwitnienia, porównując liczbę strąków na roślinie z liczbą kwiatów na każdej roślinie. Średnią liczbę nasion w strąku określono ilościowo, dzieląc liczbę nasion na roślinę przez liczbę strąków na roślinie. Na koniec obliczono wskaźnik tolerancji na chłód jako średnią masę nasion roślin poddanych stresowi podzieloną przez średnią masę nasion roślin kontrolnych.

Silny wpływ zimna na rozwój wegetatywny (tempo wzrostu) zaobserwowano dla odmiany Augusta zestresowanej w fazie V1 (wzrost wolniejszy o 45% w porównaniu do kontroli). Ponadto analiza wariancji (ANOVA) potwierdziła istotną statystycznie interakcję między odmianą a stresem. Zaobserwowano spadek efektywności kwitnienia roślin stresowanych w fazie R1 dla obu odmian (skuteczność formowania strąków spadła odpowiednio o 34% i 17% u Augusta i Fiskeby V). Dodatkowo stres chłodu zaaplikowany na etapie siewek wpłynął na obniżenie efektywności kwitnienia o 31% w odmianie Augusta. Negatywny wpływ na liczbę strąków zanotowano jedynie u odmiany Augusta (redukcja o 31%), gdy rośliny były poddane stresowi w fazie R1. Co ciekawe, dalsze obserwacje wykazały, że liczba nasion na roślinie obu odmian uległa zmianie po przyłożeniu stresu w fazie R1 i wykazała spadek o 20% i 29% odpowiednio dla odmian Augusta i Fiskeby V. W przypadku Fiskeby V niższa średnia liczba nasion w strąku wynikała ze zmniejszenia liczby nasion na roślinie przy jednoczesnym wzroście liczby strąków na roślinie. Odwrotnie, w odmianie Augusta liczba nasion w strąku nie zmieniła się istotnie w wyniku stresu, ponieważ liczba strąków i nasion na roślinie uległa jednoczesnemu zmniejszeniu. Ostatnim parametrem służącym do określenia ogólnego potencjału plonowania badanych roślin był wskaźnik tolerancji na chłód. Co godne uwagi, rośliny Augusta i Fiskeby V poddane stresowi na etapie siewu i wegetatywnego wzrostu wykazały wzrost wskaźników o ~ 10% w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Obniżony plon nasion zaobserwowano jedynie u odmiany Fiskeby V poddanej stresowi w fazie R1 (redukcja o 7,4%) oraz u roślin Augusta chłodzonych w fazie VE (redukcja o 7,13%).

W celu porównania potencjału produkcyjnego dwóch odmian soi (Augusta i Fiskeby V), oprócz obserwacji zmian fenotypu w warunkach kontrolowanych, w Rolniczej Stacji Badawczej Dłoni Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (51 ° 41'37 " N, 17 ° 04'06 " E), w sezonach wegetacyjnych 2016 i 2017 przeprowadzono doświadczenie polowe. Na etapie dojrzałości fizjologicznej z każdego poletka zebrano ręcznie po 10 roślin odmiany Augusta i Fiskeby V. Zmierzono cechy morfologiczne i składowe plonu, w tym wysokość rośliny, liczbę gałęzi, liczbę strąków i nasion, liczbę nasion w każdym strąku, masę 1000 nasion oraz masę nasion na roślinie. Opady i temperaturę powietrza mierzono za pomocą Vantage VUE 6357EU (Davis Instruments), który znajdował się ~ 400 m od pola doświadczalnego.

Przeprowadzenie doświadczeń w dwóch kolejnych sezonach wegetacyjnych pozwoliło na porównanie reakcji soi na naturalne umiarkowane warunki środowiskowe panujące w regionie zainteresowania (Polska). Rośliny obu odmian uprawiane w sezonie 2017 wykazywały zmniejszony wzrost wegetatywny w porównaniu z uprawami w sezonie 2016, na co wskazują pomiary wysokości roślin. Ponadto parametry wzrostu reprodukcyjnego, takie jak masa nasion na roślinie i masa 1 000 nasion, wskazują na gorsze wyniki wzrostu roślin obu odmian w 2017 roku. Jak wykazały wyniki analizy wariancji (ANOVA), na liczbę nasion w strąku wpłynęła interakcja między odmianą a zmianami sezonowymi. Polska odmiana wykazała znacznie gorsze plony w sezonie 2017, w którym produkcja nasion na roślinie spadła do 13 g z 16,2 g w 2016 r., a masa 1000 nasion zmniejszyła się z 18,2 g do 13,2

g. Dla roślin odmiany Fiskeby V odnotowano spadek masy nasion na roślinę, z 13 g w sezonie 2016 do 9,5 g w 2017 r., a masa 1000 nasion zmniejszyła się z 26,4 do 23,7 g. Niestety, częściowo różnice we wzroście nasion soi w latach 2016 i 2017 wynikały z anomalii meteorologicznych, takich jak grad i powódzie, które wystąpiły w 2017 roku.

W roślinach badanych odmian soi (Augusta i Fiskeby V) poddanych stresowi zimna zbadano metodą ddPCR profile ekspresji pięciu miRNA, wyselekcjonowanych do badań na podstawie wyników analizy literaturowej (publikacja **P6**). W roślinach niepoddanych stresowi (kontrola) ekspresję czterech miRNA (miR169, miR319, miR397 i miR398) potwierdzono w trójlistkach, jednolistkach, liścieniach i korzeniach obu odmian hodowanych w warunkach kontrolnych, podczas gdy nie wykryto miR159. Zarówno miR397, jak i miR398 w odmianie Fiskeby V (w stadiach V1 i R1) wykazywały podobne tendencje, ponieważ były ~154- i 129-krotnie liczniejsze w liściach (jedno- i trójlistkowych). W odmianie Augusta poziomy ekspresji były ~94-krotnie i 57-krotnie wyższe odpowiednio dla miR397 i miR398. Podobnie, poziom ekspresji miR169 był 5,5-krotnie wyższy we wszystkich naziemnych tkankach Fiskeby V w porównaniu z tym w korzeniach i był 3,4-krotnie wyższy w odmianie Augusta. Wykryto zwiększone ilości miR319 (13,4-krotnie wyższe w odmianie Augusta; 4,9-krotnie wyższe u Fiskeby V) w siewkach w porównaniu do ilości w jednolistkach i trójlistkach ze stadiów V1 i R1. Względne poziomy ekspresji analizowanych miRNA w roślinach poddanych stresowi różniły się między badanymi odmianami. W roślinach stresowanych podczas kwitnienia (R1), odmiany Augusta i Fiskeby V wykazywały kontrastujące wzorce ekspresji miR169, miR319, miR397 i miR398, z największą różnicą dla miR397, który wykazał 80% spadek poziomu ekspresji w Augustie i 250 % wzrost w Fiskeby V. Podobne tendencje zaobserwowano w roślinach poddanych stresowi podczas wzrostu wegetatywnego (V1), z wyjątkiem miR169, którego względny poziom ekspresji w siewkach był na podobnym poziomie w obu odmianach. Co ważne, stres chłodu spowodował znaczne zmiany w poziomach ekspresji miR169, miR319, miR397 i miR398 w korzeniach w porównaniu z częściami naziemnymi roślin, w których synteza miRNA była stabilna.

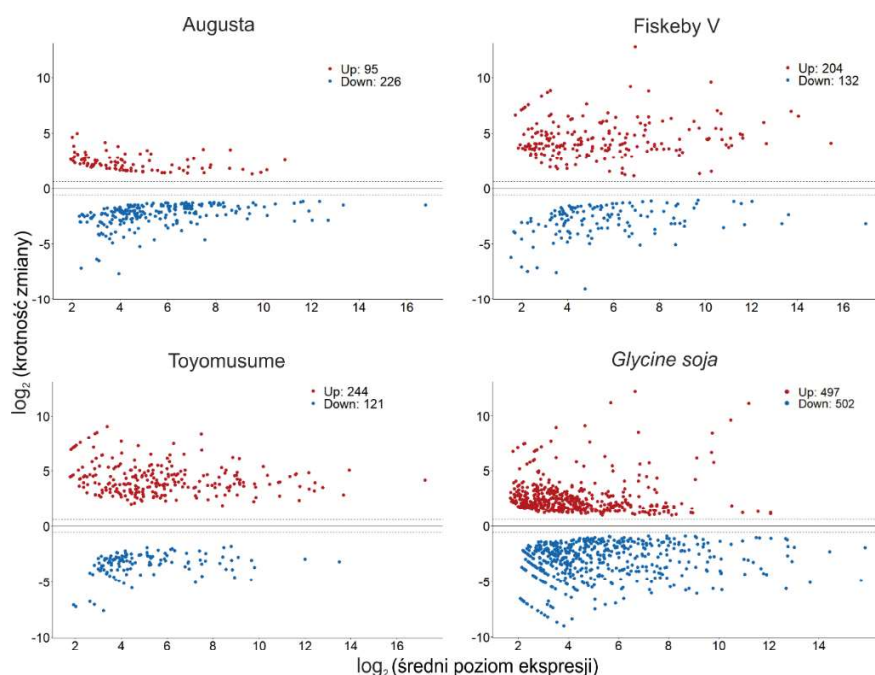
Aby zrozumieć rolę wybranych miRNA w odpowiedzi wybranych odmian soi na stres chłodu, zbadano profile ekspresji ich genów docelowych, które zostały wybrane na podstawie analizy GO. Cztery miRNA i ich 85 genów docelowych zostały przyporządkowane do 48. funkcji molekularnych, 89. procesów biologicznych i 21. elementów komórkowych. Najbardziej reprezentowanymi kategoriami komponentów komórkowych były jądro i kompleks czynników transkrypcyjnych. Wśród procesów biologicznych najczęściej reprezentowane były wiązanie DNA i regulacja transkrypcji. Najliczniej reprezentowanymi funkcjami molekularnymi reprezentowanymi przez wszystkie przewidywane geny docelowe były wiązanie DNA i wiązanie białek. Ekspresję badanych genów docelowych zaobserwowano w roślinach odmiany Fiskeby V, podczas gdy ekspresja genu docelowego miR397 była niewykrywalna u odmiany Augusta. Co ciekawe, ujemną korelację między poziomem ekspresji miRNA a ich przewidywanymi celami zauważono głównie w korzeniach siewek. Przede wszystkim nadekspresja miR169 (0,46-krotna i 0,88-krotna) odpowiadała obniżonej o -2,64-krotność i -1,11-krotność ekspresji jego genu docelowego kodującego podjednostki A czynnika jądrowego Y, NF-YA, odpowiednio w odmianach Augusta i Fiskeby V. W przypadku miR319 (Fiskeby V) zaobserwowano 0,7-krotny wzrost ilości miR319 i -1-krotny spadek ilości jego genu docelowego kodującego czynnik transkrypcyjny GAMYB. Ekspresja genu lakkazy (Fiskeby V) była znacznie podwyższona (~2,65-krotnie) w trójlistkach i jednolistkach w stadiach V1 i R1; nie znaleziono negatywnej korelacji między ekspresją miR397 a jego genem docelowym kodującym lakkazę. Inną zależność stwierdzono między miR398 a jego docelowym genem (ang. *copper chaperone for superoxide dismutase*, CCS) w korzeniach siewek odmiany Augusta, gdzie ekspresja miRNA zmniejszyła się -1,73 razy, a genu wzrosła 0,33-krotnie.

miRNA i degradom (publikacja P8)

W pracy **P8** opisano odpowiedzi czterech odmian soi (Augusta, Fiskeby V, Toyomusume i *G. soja*) na stres zimna na poziomie molekularnym (miRNA i degradom). Obserwacje prowadzone w trzech tkankach roślinnych (korzenie siewek, liścienie i trójlistki) umożliwiły zbadanie reakcji stresowej we wczesnych stadiach wzrostu soi. Aby zidentyfikować miRNA zaangażowane w reakcję na stres zimna, skonstruowano 72 biblioteki sRNA (dla próbek poddanych stresowi i odpowiadającym im kontroli), które zsekwencjonowano za pomocą technologii Illumina. Ponadto sekwencjonowanie degradomu (24 biblioteki) umożliwiło zidentyfikowanie potencjalnych genów docelowych miRNA, o różnych poziomach ekspresji.

Odczyty z 72 bibliotek sRNA porównano z kolekcją dojrzałych (i prekursorowych) miRNA soi z bazy miRBase (wydanie 22.1). W sumie zidentyfikowano 321 znanych rodzin miRNA soi we wszystkich czterech odmianach. W liścieniach soi na etapie VE najliczniejszą rodziną miRNA była miR159, z wyjątkiem Fiskeby V, w którym miR165 był tym o najwyższym poziomie ekspresji. W korzeniach wszystkich roślin zebranych na etapie siewek (VE), najsilniej ekspresjonowaną rodziną miRNA była rodzina miR319, natomiast w trójlistkach soi zebranych na etapie V1 - rodzina miR398. Dodatkowo wśród rodzin miRNA o wysokim poziomie ekspresji we wszystkich badanych próbkach dominowały konserwatywne miRNA, miR159, miR165, miR166, miR167, miR319, miR396, miR398, miR408 i miR482 oraz miRNA specyficzne dla roślin strączkowych, takie jak miR4414, miR1510, i miR3522. Z drugiej strony, wśród rodzin miRNA o najniższych poziomach ekspresji, stosunek konserwatywnych miRNA do miRNA specyficznych dla roślin strączkowych był znacznie niższy niż we frakcji o wysokim poziomie ekspresji. Większość konserwatywnych miRNA, wśród najmniej licznie występujących rodzin miRNA, to warianty transkrypcyjne ich odpowiedników o wysokim poziomie ekspresji. Ponadto w czterech badanych odmianach znaleziono 348 nowych miRNA (213 miRNA w Augusta, 220 w Fiskeby V, 224 w Toyomusume i 218 w *G. soja*), wśród których 129 miRNA było wspólnych dla wszystkich czterech odmian.

Łącznie w próbkach stresowanych i kontrolnych czterech odmian soi zidentyfikowano 162 miRNA o zróżnicowanej ekspresji, należących do 137 rodzin. Wśród miRNA o zmienionym poziomie ekspresji we wszystkich testowanych odmianach, 93 ulegały obniżonej ekspresji w przynajmniej jednej odmianie, z których 28 co najmniej 5-krotnie. Przeciwnie, 137 miRNA ulegało podwyższonej ekspresji w próbkach roślin stresowanych w przynajmniej jednej odmianie, z których 41 co najmniej 5-krotnie (Rys. 6).

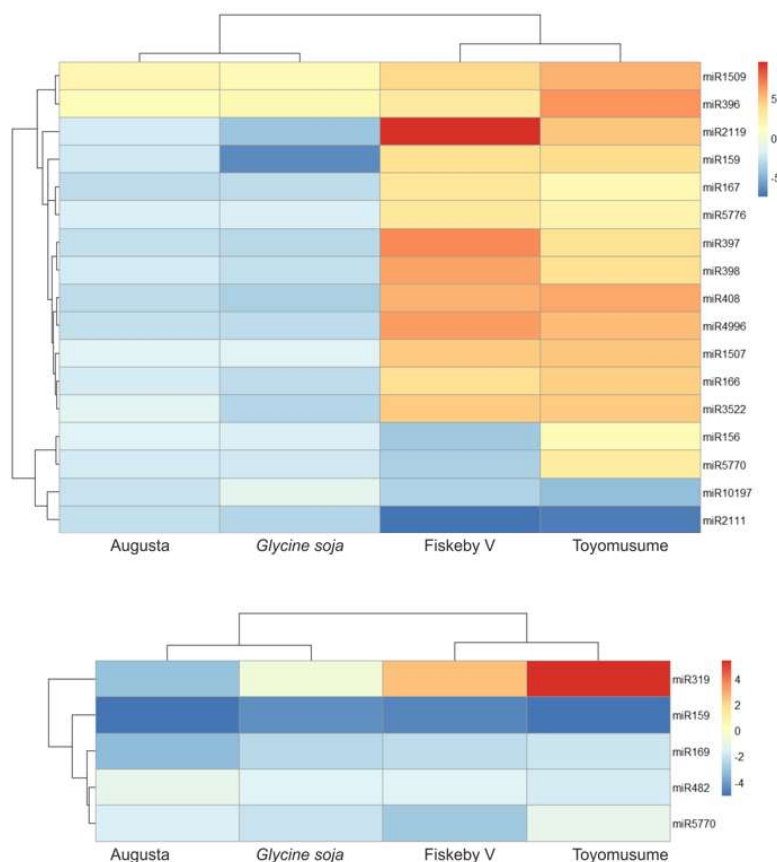


Rysunek 6. Wykresy MA dla miRNA o zmienionych poziomach ekspresji w czterech badanych odmianach; czerwone kropki – podwyższenie poziomu ekspresji, niebieskie kropki – obniżenie poziomu ekspresji.

Najbardziej znaczące obniżenie poziomu ekspresji podczas stresu zimna stwierdzono dla miR169, miR166, miR159 i miR5037 w liściach (stadium VE); dla miR159, miR160 i miR171 w korzeniach siewek (stadium VE); i dla miR167, miR2111, miR5371, miR5037, miR398, miR4416 i miR160 w trójlistkach (stadium V1). Najbardziej znaczący wzrost poziomów ekspresji zaobserwowano dla miR6300, miR5368, miR6173 i miR1509 w liściach (stadium VE); dla miR319, miR9750, miR408 i miR2109 w korzeniach sadzonek (stadium VE); i dla miR166, miR398, miR2119, miR399, miR4996, miR171, miR6300, miR5368 i miR169 w trójlistkach (stadium V1), we wszystkich czterech odmianach. Kilka rodzin miRNA, w tym miR159, miR319 i miR482, wykazywało zróżnicowaną uniwersalną ekspresję w korzeniach siewek, przy czym poziomy ekspresji miR159 i miR482 były obniżone we wszystkich czterech odmianach, podczas gdy miR319 był obniżony w odmianie Augusta i *G. soja*, a podwyższony w Fiskeby V i Toyomusume. Podobnie, w trójlistkach roślin poddanych stresowi na etapie V1 występowały miRNA o różnych poziomach ekspresji we wszystkich badanych odmianach soi, w tym miR10197, miR1507, miR1509, miR159, miR166, miR2111, miR3522, miR396, miR398, miR408, i miR2111 miały obniżony, a miR1509 i miR396 podwyższony poziom ekspresji. miR1507, miR159, miR166, miR3522, miR398, miR408 i miR4996 ulegały obniżonej ekspresji w odmianie Augusta i *G. soja*, a podwyższonej w Fiskeby V i Toyomusume (Rys. 7).

Co ważne, kilka miRNA wykazało odmienne wzory ekspresji w odmianie Toyomusume i odmianach Augusta, Fiskeby V i *G. soja*. Stwierdzono, że w korzeniach siewek Augusta, Fiskeby V i *G. soja* poziomy ekspresji miR169 i miR5770 były obniżone odpowiednio 2,3-, 3,3- i 2,4-krotnie oraz 2,9-, 1,7- i 2,1- krotnie, podczas gdy ich ekspresja nie zmieniła się znacząco w Toyomusume, co sugeruje ich udział w odpowiedzi na stres zimna (Rysunek 9). Podobne wzorce ekspresji stwierdzono w trójlistkach (stadium V1) dla miR156 i miR5770, gdzie poziomy ekspresji były obniżone 1,7-, 3,9- i 1,9-krotnie oraz o 2,1-, 3,6- i 2,3-krotnie w odmianach Augusta, Fiskeby V i *G. soja*, podczas gdy ich poziomy ekspresji nie uległy znaczącej zmianie w odmianie Toyomusume. Co ciekawe, 7 miRNA (miR1507, miR159, miR166, miR3522, miR398, miR408 i miR4996) ulegało podwyższonej ekspresji w odmianach Toyomusume i Fiskeby V, podczas gdy u Augusty i *G. soja* obniżonej.

Ponadto 18 nowych miRNA ulegało zróżnicowanej ekspresji w próbkach poddanych stresowi. Wśród nich 4 miRNA znaleziono w więcej niż jednej odmianie, dwa z nich były wspólne dla liści i trójlistków *G. soja*, jeden wspólny dla trójlistków *G. soja* i Augusta, a jeden dla trójlistków *G. soja* i Fiskeby V.

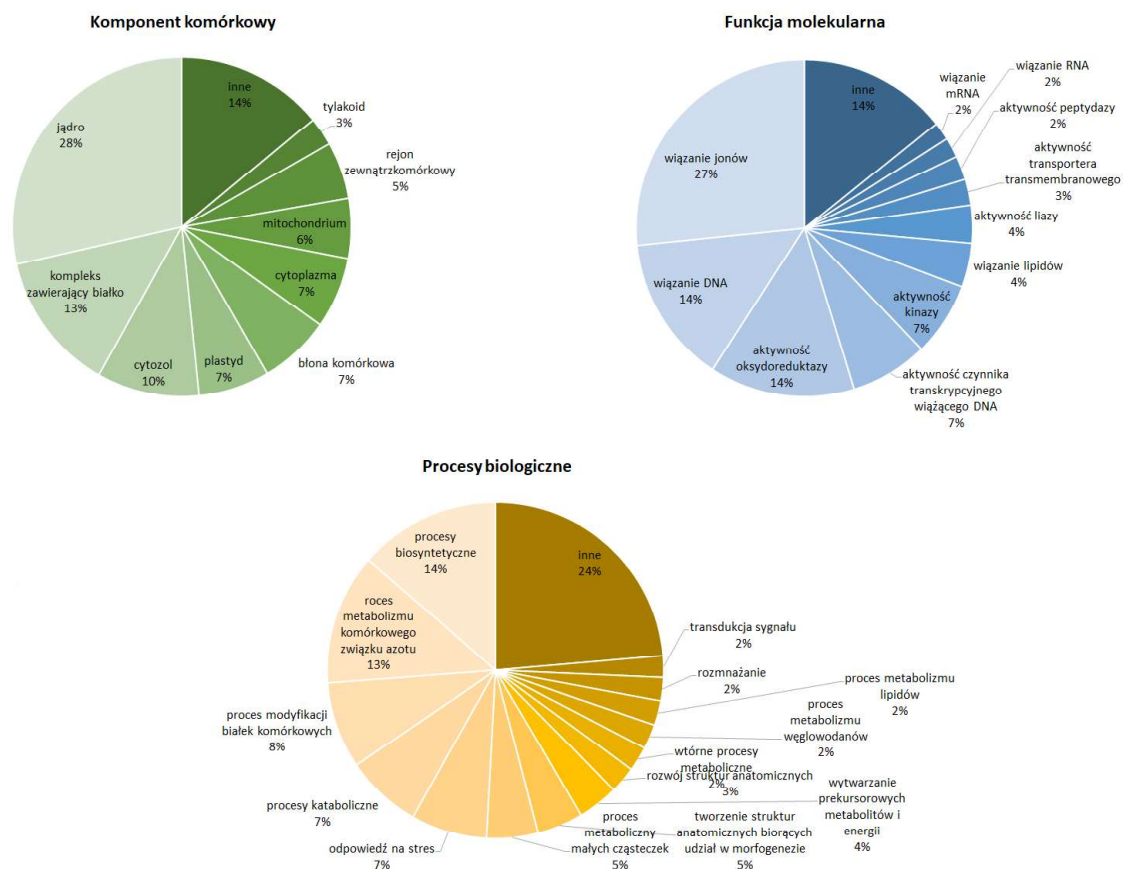


Rysunek 7. Mapy ciepłne miRNA o zmienionych poziomach ekspresji w trójlistkach czterech badanych odmian soi.

Aby zweryfikować wiarygodność wyników sekwencjonowania, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji czterech miRNA (miR169, miR408, miR2109 i miR5770) za pomocą metody ddPCR (Rysunek 8). Wyniki analiz wykazały, że wzorce ekspresji 4 wybranych miRNA były w większości zgodne z wynikami sekwencjonowania (z wyjątkiem miR169 w Augusta i Fiskeby V oraz miR408 w Toyomusume). Rozbieżności w krotności zmiany poszczególnych próbek można przypisać różnicom w czułości i swoistości obu technik. Ponadto w ddPCR trudno jest rozróżnić poszczególne miRNA należące do

jednej rodziny miRNA, co może dodatkowo wyjaśniać pewne różnice obserwowane między sekwencjonowaniem a wynikami ddPCR.

Na podstawie wyników sekwencjonowania degradomu i późniejszej analizy wykonanej za pomocą oprogramowania CleaveLand zidentyfikowaliśmy potencjalne sekwencje docelowe miRNA soi, które biorą udział w odpowiedzi na stres zimna. W sumie 2005 docelowych mRNA zidentyfikowano we wszystkich 24 bibliotekach degradomu, z których 1183 należało do kategorii 0, 222 do kategorii 1, 293 do kategorii 2, 164 do kategorii 3 i 143 do kategorii 4, gdzie kategoria 0 reprezentowała najlepsze dopasowanie między miRNA i genami docelowymi. Dalsze badania ujawniły potencjalne cele miRNA o zmienionych poziomach ekspresji takie jak białko wiążące GAMYB *Glycine max* (LOC732608), czynnik transkrypcyjny NAC *Glycine max* (LOC100814504) czy dysmutaza ponadtlenkowa [Cu-Zn] *Glycine max* (SOD1). Terminy GO przypisano 378 genom docelowym kontrolowanym przez 16 miRNA o zmienionych poziomach ekspresji (Rysunek 8). Geny docelowe zostały opisane przez 53 terminy w kategorii procesy biologiczne, 31 terminów w kategorii funkcje molekularne i 25 terminów w kategorii przedział komórkowy. Do szeroko reprezentowanych terminów należały „proces biosyntezy”, „proces metaboliczny komórkowych związków azotu” oraz „proces modyfikacji białek komórkowych” w kategorii procesy biologiczne; „wiązanie jonów”, „wiązanie DNA” i „aktywność oksydoreduktazy” w kategorii funkcje molekularne; oraz „jądro komórkowe”, „kompleks zawierający białko” i „błona” w kategorii przedział komórkowy. Ponadto, wyniki analizy KEGG wskazały, że 378 genów docelowych zostało znacznie wzbogaconych w 67 szlakach, w tym w metabolizmie puryn i tyrozyny, biosyntezie alkaloidów izochinoliny, glikolizie i glukoneogenezie oraz metabolizmie pirogronianu i tiaminy.



Rysunek 8. Analiza ontologii genów (GO) genów docelowych miRNA o różnej ekspresji.

Do analizy zmian poziomu ekspresji genów w korzeniach i liściach czterech badanych odmian soi wybrano trzy geny: *Glycine max* putative phytyocyanin (Phyt, NM_001251440.2), czynnik transkrypcyjny *Glycine max* (NAC-19, NM_001255827.1) i dehydrogenazę jabłczanową *Glycine max* [NADP] (GmMDH, NM_001369219.1). W korzeniach, po ekspozycji na stres, ekspresja genu *Phyt* była podwyższona w odmianach Augusta i Fiskeby V, w przeciwieństwie do Toyomusume i *G. soja*, gdzie zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu ekspresji tego genu. Poziom ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny NAC-19 był znacząco podwyższony w korzeniach we wszystkich testowanych odmianach, a kodującego GmMDH był podwyższony w korzeniach w odmianach Augusta, Fiskeby V i Toyomusume, obniżenie poziomu ekspresji o 50% odnotowano dla *G. soja*. W liściach ekspresja genu *Phyt* była obniżona (o co najmniej 50%) we wszystkich odmianach z wyjątkiem *G. soja*, gdzie była podwyższona o 40%. Poziom ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny NAC-19 był podwyższony w liściach wszystkich testowanych odmian, a kodującego GmMDH był podwyższony w Augusta i Toyomusume, a obniżony w Fiskeby V i *G. soja*.

Co ważne, poziom ekspresji genu *nac-19* był znacząco podwyższony w korzeniach i liściach wszystkich testowanych odmian. Wynik ten dobrze korelował z obserwowanym obniżeniem poziomu ekspresji miR408 w liściach. W korzeniach odmian Augusta i Toyomusume poziom ekspresji genu *GmMDH* były podwyższone lub utrzymywane na tym samym poziomie (w Fiskeby V). Tylko u jednej odmiany (*G. soja*) zaobserwowano spadek poziomu ekspresji genu *GmMDH*. Jedynie w liściach odmiany Augusta zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji genu *GmMDH*; wzrost zaobserwowano również u *G. soja*. Co ważne, zaobserwowano również wzrost

poziomu ekspresji genów *Phyt* w korzeniach Augusta i Fiskeby V – dwóch odpornych na zimno odmian soi. Przeciwnie, w liściach poziom jego ekspresji uległ obniżeniu w odmianach Augusta, Fiskeby V i Toyomusume. Zmienione profile ekspresji cechowały białka zaangażowane w proces homeostazy redoks i transporty elektronów, które mogą być w pewnym stopniu odpowiedzialne za zwiększoną/zmniejszoną podatność na stresy abiotyczne.

We wcześniejszych pracach wykazano, że kluczową rolę w aklimatyzacji roślin do zimna odgrywa przeprogramowanie centralnego metabolizmu węglowodanów [29-31]. Odkrycia te zostały potwierdzone w powyższym badaniu, gdzie wykazano, że metabolizm cukrów był jednym ze szlaków, na które wpływa 16 miRNA o zróżnicowanych poziomach ekspresji zidentyfikowanych podczas analizy. Ponadto, cukry stabilizują błony biologiczne, liposomy, działają jako osmoprotektanty, a nawet stabilizują proces fotosyntezy podczas stresu, ponieważ jak wykazano, zmniejszeniu zdolności fotosyntetycznej roślin często towarzyszy zwiększona akumulacja cukru [29, 32]. Stres zimna negatywnie wpływał również na fotosyntezę i wiązanie CO₂ [32-34], co zostało dodatkowo potwierdzone w powyższych badaniach, jako że enzymy zaangażowane w wiązanie węgla, fotosyntezę oraz metabolizm nikotynianu i nikotynamidu były jednymi z celów miRNA o zmienionym poziomie ekspresji w warunkach stresu zimna. Glutation, organiczny magazyn siarki, w postaci zredukowanej (GSH) jest metabolitem niezbędnym w różnych szlakach biosyntezy, takich jak detoksykacja i homeostaza redoks [35]. Do chwili obecnej kilka publikacji wskazuje na zaangażowanie glutationu w odpowiedzi na stresy abiotyczne [36-39]. W niskich temperaturach u kilku gatunków roślin wykryto wysoką zawartość GSH i aktywność reduktazy glutationowej, co wskazuje na ich potencjalny wkład w tolerancję na chłód i aklimatyzację na zimno [40]. Metabolizm glutationu był jednym ze szlaków wskazanych w analizie KEGG, w której trzy enzymy: reduktaza, 5-oksoprolinaza (hydroliza ATP) i dehydrogenaza (NADP⁺) zostały przewidziane jako cele miRNA o zmienionych poziomach ekspresji podczas stresu zimna.

4E. Najważniejsze osiągnięcia poznawcze zaprezentowanych badań

1. Zsekwencjonowanie dwóch genomów kukurydzy zwyczajnej, odmian różniących się odpornością na stres herbicydowy.
2. Identyfikacja zmian typu SNP i polimorfizmów typu insercja/delecja w genach zaangażowanych w przemiany fosforanów linii TL kukurydzy.
3. Identyfikacja zmian we wzorach metylacji DNA dwóch odmian kukurydzy pod wpływem stresu herbicydowego.
4. Identyfikacja sekwencji DNA odmiennie metylowanych pod wpływem stresu herbicydowego dwóch badanych odmian kukurydzy.
5. Identyfikacja miRNA ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu herbicydowego dwóch odmian kukurydzy.
6. Określenie roli miR827 w homeostazie Pi i w odpowiedzi roślin na stres herbicydowy.
7. Analiza fenotypowa i identyfikacja zdolności przystosowawczych dwóch odmian soi (Augusta i Fiskeby V) poddanych stresowi zimna.
8. Określenie zmian poziomów ekspresji miRNA pod wpływem stresu zimna u 4 odmian soi o zróżnicowanej podatności i odpowiedzi na w/w stres.
9. Identyfikacja 348 nowych miRNA u soi.
10. Opisanie szlaków molekularnych zaangażowanych w odpowiedź soi na warunki stresu zimna (metabolizm węglowodanów, fotosynteza i wiązanie CO₂, glutation i metabolizm glutationu).

4F. Podsumowanie

Kukurydza i soja to rośliny uprawne wywodzące się z klimatu ciepłego. Kukurydza, uprawiana jest w klimacie umiarkowanym, w tym w Polsce, od wielu lat. Wykazano ponadto, że różne rodzime odmiany kukurydzy charakteryzuje odmienna odporność na stosowane herbicydy. Postanowiłam zatem przeprowadzić analizy molekularne podstaw tej różnorodności. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że występujące w badanych odmianach kukurydzy zmiany są wielopoziomowe i wieloczynnikowe. Zidentyfikowano zmiany na każdym etapie regulacji ekspresji informacji genetycznej, tj. w genomach, w transkryptomach, pulach miRNA i degradomu. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano tysiące wariantów strukturalnych, także w regionach kodujących białka, w dwóch odmianach kukurydzy różniących się podatnością na RoundUp®. Zbadano geny i ścieżki zaangażowane w metabolizm glifosatu i zidentyfikowano w nich szereg zmian mogących wpływać na poziom ekspresji genów. Wykazano ponadto, że stres herbicydowy spowodował zwiększenie ilości w pełni metylowanych sekwencji w genomach w linii wrażliwej o 18,64%. Wśród zidentyfikowanych sekwencji metylowanych odmiennie pod wpływem herbicydu były geny kodujące transferazy, białka transporterowe, metylotransferazy, hydrolazy, transpozony, białka rybosomalne, cytochromy i białka uczestniczące w procesach transkrypcji i biorące udział w reakcji na stres. W toku badań, zidentyfikowano także miRNA ulegające zmienionej ekspresji pod wpływem stresu herbicydowego w linii tolerancyjnej i zaproponowano mechanizm odporności uczestniczący w odpowiedzi na stres, oparty o miR827-3p oraz transportery fosforanowe w błonach komórkowych. Wykazano zatem, że naturalna odporność upraw kukurydzy na herbicydy jest znacznie bardziej skomplikowana niż tylko zmiana pojedynczej cechy (obserwowana w uprawach modyfikowanych genetycznie) i opiera się na wielu mechanizmach i poziomach regulacji ekspresji informacji genetycznej (epigenetyka, małe niekodujące RNA, zmiany w ekspresji i składzie produktów genowych), które razem składają się na wzrost odporności poszczególnych odmian na warunki stresu.

Soja, w warunkach klimatu umiarkowanego najbardziej narażona jest na stres zimna. Do analiz odpowiedzi soi na warunki stresu zimna wybrano 3 odmiany soi (dwie odporne – Augusta i Fiskeby V; jedna wrażliwa – Toyumusume) oraz *G. soja*. Zmiany w poziomach ekspresji puli krótkich regulatorowych RNA i degradomu badano w 3 tkankach roślin stresowanych na różnych etapach wzrostu. Zidentyfikowano łącznie 321 znanych miRNA i przewidziano 348 nowych miRNA. Aż 162 cząsteczki miRNA, w tym konserwatywne miRNA specyficzne dla roślin strączkowych i soi oraz 18 nowych miRNA, miało zmienione profile ekspresji. Co ciekawe, kilka miRNA, takich jak miR156, miR169 i miR5770, miało podobne wzorce ekspresji w Augusta, Fiskeby V i *G. soja*, co wyraźnie kontrastowało z wrażliwą na zimno odmianą Toyumusume. Analizy degradomu, GO i KEGG pozwoliły nam przypisać potencjalne geny docelowe do miRNA o zróżnicowanych pod wpływem stresu zimna poziomach ekspresji. Stwierdzono, że wiele z tych genów jest powiązanych z mechanizmami reakcji roślin na stres abiotyczny, takimi jak neutralizacja reaktywnych form tlenu, biosynteza flawonoidów i regulacja potencjału osmotycznego. Wykonano również analizy fenotypowe dwóch „odpornych” na zimno odmian soi w warunkach kontrolowanego stresu (fitotron) oraz w warunkach polowych. Co godne uwagi, rośliny Augusta i Fiskeby V poddane stresowi na etapie siewek i wzrostu wegetatywnego wykazały wzrost wskaźników o ~10% w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Obniżony plon zaobserwowano jedynie u odmiany Fiskeby V poddanej stresowi w fazie R1 (redukcja o 7,4%) oraz u roślin Augusta stresowanych w fazie VE. W warunkach polowych wykazano, że odmiana Augusta charakteryzuje się wyższym plonowaniem (g nasion) niezależnie od występującego stresu, odmiana ta okazała się być zatem lepiej przystosowana do polskich warunków uprawy.

Cytowana literatura

1. FAO, https://www.fao.org/fileadmin/templates/faoitaly/documents/pdf/pdf_Food_Security_Coept_Note.pdf
2. Ray, D.K. et al. (2013) Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. PLoS One 8, e66428

3. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
4. Duke, S.O.; Powles, S.B.. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci.* 2008;64: 319–25. doi:10.1002/ps.1518
5. Meyers, B.C.; Tingey, S.V.; Morgante, M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genom. Res.* 2001, 11, 1660–1676.
6. Schnable, P.S.; Ware, D.; Fulton, R.S.; Stein, J.C.; Wei, F.; Pasternak, S.; Liang, C.; Zhang, J.; Fulton, L.; Graves, T.A.; et al. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 2009, 326, 1112–1115.
7. Jiao, Y.; Peluso, P.; Shi, J.; Liang, T.; Stitzer, M.C.; Wang, B.; Campbell, M.S.; Stein, J.C.; Wei, X.; Chin, C.; et al. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature* 2017, 546, 524–527.
8. McClintock, B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 1984, 226, 792–801.
9. Rhoads, A.; Au, K.F. PacBio sequencing and its applications. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2015, 13, 278–289.
10. Alexandrov, N.N.; Brover, V.V.; Freidin, S.; Troukhan, M.E.; Tatarinova, T.V.; Zhang, H.; Swaller, T.; Lu, Y.; Bouck, J.; Flavell, R.B.; et al. Insights into corn genes derived from large-Scale cDNA sequencing. *Plant Mol. Biol.* 2009, 69, 179–194.
11. Soderlund, C.; Descour, A.; Kudrna, D.; Bomhoff, M.; Boyd, L.; Currie, J.; Angelova, A.; Collura, K.; Wissotski, M.; Ashley, E.; et al. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000740.
12. Vega-Arreguin, J.C.; Ibarra-Laclette, E.; Jimenez-Moraila, B.; Martinez, O.; Vielle-Calzada, J.P.; Herrera-Estrella, L.; Herrera-Estrella, A. Deep sampling of the Palomero maize transcriptome by a high throughput strategy of pyrosequencing. *BMC Genom.* 2009, 10, 299.
13. Funke, T.; Han, H.; Healy-Fried, M.L.; Fischer, M.; Schönbrunn, E. Molecular basis for the herbicide resistance of roundup ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 13010–13015.
14. Schönbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W.A.; Schloss, J.V.; Amrhein, N.; Evans, J.N.; Kabsch, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 1376–1380.
15. Żywicki, M.; Gracz, J.; Karłowski, W.; Twardowski, T.; Tyczewska, A. Expression of miRNAs involved in phosphate homeostasis and senescence is altered in glyphosate-Treated maize. *Acta Physiol. Plant.* 2015, 37, 265
16. Denis, M.-H.; Delrot, S. Carrier-Mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiol. Plant.* 1993, 87, 569–575.
17. Gomes, M.P.; Le Manac'h, S.G.; Moingt, M.; Smedbol, E.; Paquet, S.; Labrecque, M.; Lucotte, M.; Juneau, P. Impact of phosphate on glyphosate uptake and toxicity in willow. *J. Hazard. Mater.* 2016, 304, 269–279.
18. Shaner, D.L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci.* 2009, 57, 118–123.
19. Takanashi, K.; Shitan, N.; Yazaki, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnol.* 2014, 31, 417–430.
20. Alonso, C.; Ramos-Cruz, D.; Becker, C. The role of plant epigenetics in biotic interactions. *New Phytol* 2019, 221(2):731–737. <https://doi.org/10.1111/nph.15408>
21. Agarwal, G.; Kudapa, H.; Ramalingam, A.; Choudhary, D.; Sinha, P.; Garg, V.; Singh, V.K.; Patil, G.B.; Pandey, M.K.; Nguyen, H.T.; Guo, B.; Sunkar, R.; Niederhuth, C.E.; Varshney, R.K. Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. *Funct Integr Genomics* 2020, 20(6):739–761. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00756-7>
22. Chinnusamy, V.; Zhu, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2009, 12(2):133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>
23. Lin, W.-Y.; Huang, T.-K.; Chiou, T.-J. Nitrogen limitation adaptation, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013, 25:4061–4074. doi:10.1105/tpc.113.116012
24. Liu, T.-Y.; Lin, W.-Y.; Huang, T.-K.; Chiou, T.-J. MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *Trends Plant Sci* 2014, 19:647–655. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.004

25. Yao, Z-F., Liang, C-Y., Zhang, Q. et al. SPX1 is an important component in the phosphorus signalling network of common bean regulating root growth and phosphorus homeostasis. *J Exp Bot* 2014, 65:3299–3310. doi:10.1093/jxb/eru183
26. https://www.polskasoja.pl/asp/pl_start.asp?typ=14&menu=3&strona=1
27. Tyczewska, A., Gracz, J., Twardowski, T., Małyska, A. Time for soybean? (in Polish). *Nauka* 2014, 4, 121-139
28. Tyczewska, A., Gracz, J., Kuczyński, J., Twardowski, T. Deciphering the soybean molecular stress response via high-throughput approaches. *Acta Biochimica Polonica* 2016, (63)4, 631-643. doi: 10.18388/abp.2016_1340
29. Fürtauer, L., Weiszmann, J., Weckwerth, W., Nägele, T. Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 5411. <https://doi.org/10.3390/ijms20215411>
30. Hoermiller, I. I., Naegele, T., Augustin, H., Stutz, S., Weckwerth, W., Heyer, A. G. Subcellular reprogramming of metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 2017, 40, 602–610. <https://doi.org/10.1111/pce.12836>
31. Ritonga, F. N., Chen, S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants* 2020, 9, 560. <https://doi.org/10.3390/plants9050560>
32. Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J., Djalovic, I., Siddique, K. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in Plant Science* 2018, 9, 1430. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01430>
33. Banerjee, A., Roychoudhury, A. Cold stress and photosynthesis. In P. Ahmad, M. A. Ahanger, M. N. Alyemeni, P. Alam (Eds.), *Photosynthesis, productivity and environmental stress* (2019), pp. 27–37. John Wiley & Sons Ltd
34. Calzadilla, P. I., Vilas, J. M., Escaray, F. J., Unrein, F., Carrasco, P., Ruiz, O. A. The increase of photosynthetic carbon assimilation as a mechanism of adaptation to low temperature in *Lotus japonicus*. *Scientific Reports* 2019, 9(1), 863. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37165-7>
35. Rao, A. S. V. C., Reddy, A. R. Glutathione reductase: A putative redox regulatory system in plant cells. In N. A. Khan, S. Singh, & S. Umar (Eds.), *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants* (2008), pp. 111–147. Springer
36. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., Fujita, M. Glutathione in plants: Biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 2017, 23(2), 249–268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
37. Kocsy, G., Szalai, G., Vágújfalvi, A., Stéhli, L., Orosz, G., Galiba, G. Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 2000, 210, 295–301. <https://doi.org/10.1007/PL00008137>
38. Kocsy, G., Von Ballmoos, P., Suter, M., Rüegsegger, A., Galli, U., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 2000, 211, 528–536. <https://doi.org/10.1007/s004250000308>
39. Spanò, C., Bottega, S., Ruffini Castiglione, M., Pedranzani, H. E. Antioxidant response to cold stress in two oil plants of the genus *Jatropha*. *Plant, Soil and Environment* 2017, 63, 271–276. <https://doi.org/10.17221/182/2017-PSE>
40. Kader, D. Z. A., Saleh, A. A. H., Elmeleigy, S. A., Dosoky, N. S. Chilling-induced oxidative stress and polyamines regulatory role in two wheat varieties. *Journal of Taibah University for Science* 2011, 5(1), 14–24. [https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60034-X](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60034-X)

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

A. Lista publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie (Journal Citation Reports (JCR))

1. Tomkowiak A, Bobrowska R, Kwiatek M, Spychala J, Kuczyński J, Tyczewska A, Kowalczewski PL, Weigt D, Kosiada T (2023) Analysis of miRNA expression associated with gene Lr34 responsible for resistance mechanisms to wheat leaf rust. *Pak. J. Bot.*, 55(1): doi: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1\(6\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1(6))

Punktacja wg MNiSW (2019): **40**

IF (2020): **1,101**

IF (5-letni): **1,066**

2. Woźniak E, **Tyczewska A**, Twardowski T (2021) A shift towards biotechnology: Social opinion in the EU. Trends in Biotechnology, 39(3):214-218, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.08.001

Punktacja wg MNiSW (2021): **200**

IF (2021): **21,942**

IF (5-letni): **20,864**

3. Woźniak E, **Tyczewska A**, Twardowski T (2021) Bioeconomy development factors in the European Union and Poland. New Biotechnology, 60:2-8, doi: 10.1016/j.nbt.2020.07.004

Punktacja wg MNiSW (2019): **100**

IF (2021): **6,49**

IF (5-letni): **6,077**

4. Tomkowiak A, Jędrzejewski T, Spychała J, Kuczyński J, Kwiatek MT, **Tyczewska A**, Skowrońska R, Twardowski T (2020) Analysis of miRNA expression associated with the Lr46 gene responsible for APR resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Applied Genetics, 61(4):503-511. doi: 10.1007/s13353-020-00573-5

Punktacja wg MNiSW (2019): **140**

IF (2020): **3,240**

IF (5-letni): **2,756**

5. Zimny T, Sowa S, **Tyczewska A**, Twardowski T (2019) Certain new plant breeding techniques and their marketability in the context of EU GMO legislation – recent developments. New Biotechnology 51, 49-56, DOI: 10.1016/j.nbt.2019.02.003

Punktacja wg MNiSW (2019): **100**

IF (2019): **4,674**

IF (5-letni): **4,436**

6. Kurzyńska-Kokorniak A, Koralewska N, **Tyczewska A**, Twardowski T, Figlerowicz M (2013) “A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer”. PLoS ONE 8(10): e77703

Punktacja wg MNiSW (2013): **40**

IF (2019): **3,534**

IF (5-letni): **3,054**

7. You W, **Tyczewska A**, Spencer M, Daxinger L, Schmid M, Grossniklaus U, Simon SA, Meyers BC, Matzke AJ, Matzke M (2012) “Atypical DNA methylation of genes encoding cysteine-rich peptides in *Arabidopsis thaliana*”. BMC Plant Biology 12(1):51

Punktacja wg MNiSW (2019): **40**

IF (2019): **4,354**

IF (5-letni): **4,127**

8. **Tyczewska A**, Kurzyńska-Kokorniak A, Koralewska N, Szopa A, Kietrys AM, Wrzeński J, Twardowski T, Figlerowicz M (2011) “Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro”. Nucleic Acid Therapeutics vol 21, no 5, 333-346[#]

Punktacja wg MNiSW (2019): **25**

IF (2019): **2,797**

IF (5-letni): **2,754**

[#]artykuł opublikowany oryginalnie w Oligonucleotides (ISSN 1545-4526), 01 Oct 2011, czasopismo potem zmieniło nazwę na Nucleic Acids Therapeutics (<https://www.liebertpub.com/action/doSearch?ContribAuthorRaw=Tyczewska%2C+Agata>)

Sumaryczny IF publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **48,132** (5-letni IF: **45,134**)*

*Sumaryczny Impact Factor (IF) został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji

Liczba punktów MNiSW: **685***

*Liczba punktów MNiSW została obliczona na podstawie punktacji MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji

Publikacje w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie JCR:

1. Woźniak E, **Tyczewska A**, Twardowski T (2022) Public opinion on biotechnology and genetic engineering in the European Union: Polish consumer study. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 103(2),
Punktacja wg MNiSW (2015): **70**
2. Woźniak E, **Tyczewska A** (2021) Bioeconomy during the COVID-19 and perspectives for the post-pandemic world: example from EU. *EFB Bioeconomy Journal*, vol. 1, 100013, DOI: 10.1016/j.bioeco.2021.100013
3. Gracz J*, **Tyczewska A**, Twardowski T (2015) Perspectives and challenges of plants breeding in the post-genomic era (in Polish). *Nauka* 2, 109-126.
Punktacja wg MNiSW (2015): **10**
4. **Tyczewska A***, Gracz J, Twardowski T, Małyska A (2014) Time for soybean? (in Polish). *Nauka* 4, 121-139.
Punktacja wg MNiSW (2015): **6**
5. **Tyczewska A** (2014) Patents – an important added value for economy and science. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 95(4), 243-250, DOI: <https://doi.org/10.5114/bta.2014.56592>
Punktacja wg MNiSW: **6**
6. **Tyczewska A** (2014) Human ribonuclease Dicer inhibition using RNA aptamers. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 95(4), 259-263
Punktacja wg MNiSW: **7**
7. Kurzyńska-Kokorniak A, Koralewska N, **Tyczewska A**, Twardowski T, Figlerowicz M (2014) RNA oligomers as microRNA production process regulators. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 95(4), 272-275
Punktacja wg MNiSW: **7**
8. **Tyczewska A**, Bąkowska-Żywicka K (2010) miR-122 silencing - a novel therapy for HCV infections? (in Polish). *Biotechnologia*, 3(90), 29-35
Punktacja wg MNiSW: **6**
9. **Tyczewska A**, Figlerowicz M (2009) New face of the “RNA world” (in Polish). *Nauka* 2, 93-111
Punktacja wg MNiSW: **9**

10. Bąkowska-Żywicka K, **Tyczewska A** (2009) The structure of the ribosome – short history. *Biotechnologia* 1(84), 14-24
Punktacja wg MNiSW: **6**
11. **Tyczewska A**, Bąkowska-Żywicka K (2009) Recycling of eucaryotic ribosomes. *Biotechnologia* 1(84), 81-86
Punktacja wg MNiSW: **6**
12. Bąkowska-Żywicka K, **Tyczewska A** (2009) Ribophagy – the novel degradation system of the ribosome. *Biotechnologia*, 1(84), 99-103
Punktacja wg MNiSW: **6**
13. Bąkowska-Żywicka K, **Tyczewska A**, Twardowski T (2008) Genetically modified organisms – economy and safety (in Polish). *Nauka* 3, 59-65
Punktacja wg MNiSW: **9**
14. **Tyczewska A**, Bąkowska-Żywicka K (2008) Animals as bioreactors – the future of pharmaceutical industry? (in Polish). *Biotechnologia* 3(82), 64-71
Punktacja wg MNiSW: **6**
15. **Tyczewska A**, Twardowski T (2008) Genetically modified organisms, pro and con (in Polish). *Bromatologia i chemia toksykologiczna* 3, 197-201
Punktacja wg MNiSW: **6**
16. Bąkowska-Żywicka K, **Tyczewska A**, Twardowski T (2008) Civilization diseases – therapeutic application of antisense strategy (in Polish). *Nauka* 1, 45-62
Punktacja wg MNiSW: **9**
13. **Tyczewska A**, Bąkowska-Żywicka K, Twardowski T (2006) Therapeutic applications of aptamers, in: *Na pograniczu chemii i biologii*, vol. XIV, 175-203.
14. Figlerowicz M, **Tyczewska A**, Figlerowicz M (2006) The influence of small regulatory RNAs on the viral infection - new strategies in HCV therapy (in Polish). *Przegląd Epidemiologiczny*, 60 (4), 693-700
Punktacja wg MNiSW: **4**
15. Bąkowska-Żywicka K, **Tyczewska A**, Twardowski T (2006) Mechanism of the peptide bond synthesis – controversions (in Polish). *Postępy Biochemii*, 52(2), 166-172
Punktacja wg MNiSW: **5**
16. **Tyczewska A**, Sikora M (2005) Philadelphian list (in Polish). *Biotechnologia*, 4(71), 232-235
Punktacja wg MNiSW: **6**

17. **Tyczewska A**, Figlerowicz M, Twardowski T (2003) RNA aptamers as potential antiviral drugs (in Polish). *Biotechnologia*, 2(61), 15-164.

Liczba punktów MNiSW*: **184**

*Liczba punktów MNiSW została obliczona na podstawie punktacji MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji

Abstrakty konferencyjne w czasopismach z listy WoS:

1. Kuczynski J, **Tyczewska A**, Gracz J, Twardowski T (2019) Small RNA-Seq highlights importance of microRNAs in soybean chilling stress, *FEBS Open Bio*, 9(1), 311-312
Punktacja wg MNiSW (2019): **70** IF (2019): **2,231** IF (5-letni): **2,231**
2. **Tyczewska A**, Mahmoud M, Zywicki M, Karłowski W, Gracz-Bernaciak J, Twardowski T (2019) (Roundup (R) resistance trait traced in genomes of maize inbred lines, *FEBS Open Bio*, 9(1), 311-311
Punktacja wg MNiSW (2019): **70** IF (2019): **2,231** IF (5-letni): **2,231**
3. Gracz J, **Tyczewska A** (2016) Changes in DNA methylation in maize under herbicide stress conditions, *New Biotechnology* 33(S), S167-S167, Meeting Abstract: P19-4
Punktacja wg MNiSW (2016): **30** IF (2016): **3,813** IF (5-letni): **3,755**
4. Kuczynski J, Gracz J, **Tyczewska A** (2016) Analysis of cold-regulated microRNAs in soybean, *New Biotechnology* 33(S), S163-S163, Meeting Abstract: P18-32
Punktacja wg MNiSW (2016): **30** IF (2016): **3,813** IF (5-letni): **3,755**
5. **Tyczewska A**, Zywicki M, Gracz J, Karłowski W (2016) Changes in expression of miRNAs involved in stress responses and senescence in glyphosate-treated maize, *New Biotechnology* 33(S), S160-S161, Meeting Abstract: P18-24
Punktacja wg MNiSW (2016): **30** IF (2016): **3,813** IF (5-letni): **3,755**

Sumaryczny IF publikacji konferencyjnych: **15,901***

*Sumaryczny Impact Factor (IF) został obliczony na podstawie danych z Web of Science (WoS), zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji

Liczba punktów MNiSW: **230***

*Liczba punktów MNiSW została obliczona na podstawie punktacji MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania danej pozycji.

Patenty:

1. Patent Europejski w trybie PCT nr 2 255 002 "Method to inhibit ribonuclease Dicer, ribonuclease Dicer inhibitor, and use of RNA aptamers as ribonuclease Dicer inhibitors", **02.04.2014**, Figlerowicz M, **Tyczewska A**, Twardowski T, Szopa A, Kietrys AM

2. Patent nr 212696 „Inhibitor rybonukleazy Dicer (Ribonuclease Dicer inhibitor)”, **27.11.2012**, Figlerowicz M, **Tyczewska A**, Twardowski T, Szopa A, Kietrys AM

Publikacje naukowe w recenzji:

1. Public perception of plant gene technologies worldwide (2022) Woźniak E, Tyczewska A, Perisic M, Beniermann Anna, Eriksson D, Vangheluwe N, Gheysen G, Cetiner S, Abiri N and Twardowski T – w: GM Crops & Food

Inne projekty naukowe:

1. **Biogospodarka i zróżnicowany rozwój. Odbiór społeczny biotechnologii, GMO i biogospodarki** – współpraca z dr Ewą Woźniak-Gientka i prof. dr hab. Tomaszem Twardowskim (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu)
2. **Analiza odpowiedzi pszenicy na stres abiotyczny** - współpraca z dr hab. Agnieszką Tomkowiak (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)

Działalność dodatkowa:

- 2022** – współedytor zeszytu specjalnego (*Special Issue*) czasopisma EFB Biotechnology Journal pt.:” Circular and sustainable bioeconomy: legal and social aspects”, <https://www.journals.elsevier.com/efb-bioeconomy-journal/call-for-papers/circular-and-sustainable-bioeconomy-legal-and-social-aspects>
- 2018** - do chwili obecnej - Redaktor czasopisma “Postępy biochemii”, <https://postepybiochemii.ptbioch.edu.pl/index.php/PB/about/editorialTeam>
- 2016** - do chwili obecnej – Zastępca Redaktora Naczelnego kwartalnika “BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology”, <http://www.biotechnologia-journal.org/Journal/BioTechnologia-85>
- 2015** - do chwili obecnej – Inspektor ds. GMM/GMO nadzorujący zakłady inżynierii genetycznej i prace z genetycznie modyfikowanymi organizmami i mikroorganizmami w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- 2010** - współedytor zeszytu 3/2010 kwartalnika ‘Biotechnologia’ na temat niekodujących RNA
- 2009** - współedytor zeszytu 1/2009 kwartalnika ‘Biotechnologia’ na temat biosyntezy białka

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

Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego:

1. **Promotor pomocniczy od czerwca 2012 r. do kwietnia 2015 r.**, opieka merytoryczna od stycznia 2011 r. Opieka nad pracą doktorską Pani mgr Joanna Gracz- Bernaciak. Temat pracy: „Alternatywny splicing jako mechanizm odpowiedzi na stres herbicydowy u kukurydzy zwyczajnej”. Obrona 2015.
2. **Promotor pomocniczy od 2018 r.**, opieka merytoryczna od października 2015 r. do chwili obecnej. Opieka nad pracą doktorską Pana mgr inż. Jakuba Kuczyńskiego. Tematyka pracy: Zmiany w ekspresji miRNA i degradacji pod wpływem stresu zimna u 4 odmian soi charakteryzujących się zróżnicowaną wrażliwością na chłód. Planowana obrona 2022.

Opieka naukowa nad studentami:

Promotor pracy magisterskiej:

1. *Aleksandra Klimek*, 2019 r., UAM: „Różnicowa analiza krótkich regulatorowych RNA w wybranych liniach kukurydzy zwyczajnej w warunkach stresu herbicydowego”

Opiekun naukowy magistrantek:

1. Anna M. Kietrys (2006-2008), Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
2. Aleksandra Szopa (2006-2008), Politechnika Łódzka

Promotor prac inżynierskich:

1. *Jakub Szymkowiak*, 2014 r., UAM „Analiza zmian poziomu metylacji DNA dwóch wybranych linii *Zea mays* pod wpływem stresu herbicydowego”
2. *Maciej Pszczoła*, 2016 r., UAM „Profilowanie ekspresji wybranych miRNA w stresie zimna u soi”

Opieka naukowa nad praktykantkami:

1. *Dobrosława Michalska*, 2014 r., UP, sześciomiesięczne praktyki, tematyka: analiza wpływu stresu herbicydowego na dwie linie wsobne kukurydzy różniące się wrażliwością na herbicyd RoundUp
2. *Aleksandra Mazur*, 2014 r., UP, sześciomiesięczne praktyki, tematyka: analiza wpływu stresu herbicydowego na dwie linie wsobne kukurydzy różniące się wrażliwością na herbicyd RoundUp
3. *Monika Gazecka*, 2018 r., UAM, tematyka praktyk: Analiza zmian w poziomach RNA u roślin uprawnych pod wpływem stresów abiotycznych
4. *Martyna Dolata*, 2021 r., Technikum TEB Edukacja, miesięczne praktyki, tematyka: organizacja pracy w laboratorium, poznanie i stosowanie przepisów BHP, ochrony środowiska i sanitarno-epidemiologicznych, praca z materiałem biologicznym w warunkach sterylnych
5. *Wiktoria Zielnik*, 2021 r., Technikum TEB Edukacja, miesięczne praktyki, tematyka: organizacja pracy w laboratorium, poznanie i stosowanie przepisów BHP, ochrony środowiska i sanitarno-epidemiologicznych, praca z materiałem biologicznym w warunkach sterylnych
6. *Wiktoria Springer*, 2021 r., Technikum TEB Edukacja, miesięczne praktyki, tematyka: organizacja pracy w laboratorium, poznanie i stosowanie przepisów BHP, ochrony środowiska i sanitarno-epidemiologicznych, praca z materiałem biologicznym w warunkach sterylnych

Recenzowanie prac dyplomowych:

1. *Natalia Maria Dąbrowska*, 2015, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu. Zależna od RNA transkrypcyjna modulacja ekspresji genów w *Bacillus subtilis* na przykładzie ryboprzełącznika lizynowego

Odbyte staże w zagranicznych ośrodkach naukowych:

1. Austria, Wiedeń, Instytut Biologii Molekularnej Roślin im. Grzegorza Mendla, Austriacka Akademia Nauk, zespół Matzke, staż podoktorski (02.2009-10.2010)
2. Szwajcaria, Bazylea, Instytut Badań Biomedycznych im Friedricha Mieschera, zespół Ciosk (15.05.2017-15.08.2017)

Realizowane granty/projekty badawcze:

1. COST Action CA18111 pt. "Genome editing in plants - a technology with transformative potential". Podmiotem realizującym jest Swedish University of Agricultural Sciences (kierownik: dr. D. Eriksson), rola – **wykonawca w grupie WG4**, czas realizacji: kwiecień 2019 – kwiecień 2023
2. MNiSW, działalność upowszechniająca naukę, rodzaj wniosku - działalność wydawnicza, na rok 2017, wnioskodawca: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN. Grant dotyczył współfinansowania kwartalnika „BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology”, czas realizacji: styczeń 2017 - grudzień 2018
3. Projekt NCN, konkurs 15, podtyp OPUS, grudzień 2014. Identyfikacja mechanizmów molekularnych zaangażowanych w odpowiedź soi na stres niskich temperatur w warunkach klimatu umiarkowanego, kierownik projektu: prof. dr hab. Tomasz Twardowski, rola – **główny wykonawca**, czas realizacji: lipiec 2015 – styczeń 2020
4. Projekt NCN, konkurs 6, podtyp MAESTRO, wrzesień 2012. Kompleksowe podejście w celu zdefiniowania molekularnych podstaw odpowiedzi kukurydzy na stres herbicydowy, kierownik projektu: prof. dr hab. Tomasz Twardowski, rola – **główny wykonawca**, czas realizacji: maj 2013 – listopad 2019
5. Projekt NCN, konkurs 1, podtyp SONATA, czerwiec 2011. Analiza epigenomu i proteomu kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), linii odpornej i wrażliwej na herbicyd, **kierownik i główny wykonawca – dr Agata Tyczewska**, czas realizacji: grudzień 2011 – grudzień 2015
6. Projekt NCN, podtyp OPUS, marzec 2011. Małe niekodujące RNA i zmiany w degradacji roślinnym jako mechanizm odpowiedzi na warunki stresu herbicydowego, kierownik: prof. dr hab. T. Twardowski, rola – **wykonawca**, czas realizacji: marzec 2011-marzec 2014
7. Projekt NCN, podtyp OPUS, październik 2010. Alternatywny splicing u kukurydzy zwyczajnej indukowany w warunkach stresu herbicydowego, kierownik: prof. dr hab. T. Twardowski, rola - **wykonawca**, czas realizacji: październik 2010-październik 2013
8. Projekt MNiI, czerwiec 2009. Krótkie cząsteczki RNA jako regulatory aktywności enzymatycznej ludzkiej rybonukleazy Dicer, kierownik: dr A. Kurzyńska-Kokorniak, rola – **wykonawca**, czas realizacji: czerwiec 2009 – czerwiec 2012
9. RNA-zależna metylacja DNA (staż podoktorski, Austria), okres realizacji: luty 2009 – październik 2010
10. Poszukiwanie inhibitorów RNA rybonukleazy Dicer i HIV-1 RT (praca doktorska), okres realizacji: wrzesień 2002 – czerwiec 2008

Popularyzacja nauki:

- 2014 Seminarium Koła Naukowego Studentów Biotechnologii "OPERON", Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 24 kwiecień 2014, Poznań, wykład „Jak rośliny radzą sobie ze stresem? na przykładzie kukurydzy i stresu herbicydowego”
- 2017 Eurobiotech, 6th Central European Congress of Life Sciences, 11-14 September 2017, Kraków, Poland – warsztat “To publish or not to publish?”, wykładowca, temat wykładu: “How to increase the chance that your paper will be published?”
- 2019 Eurobiotech, 7th Central European Congress of Life Sciences, 23-25 September 2019, Kraków, Poland – warsztat “To publish or not to publish?”, organizator warsztatu i wykładowca, temat wykładu: “How to increase the chance that your paper will be published?”
- 2019 Udział w wydarzeniu Noc Biologów, 11 styczeń 2019
- 2019 Udział w wydarzeniu Noc Naukowców 27 wrzesień 2019
- 2020 Udział w wydarzeniu Noc Naukowców, 27 listopad 2020
- 2021 Partner kampanii społecznej „We love R&D”, której idea skupia się na rozwiązywaniu realnych problemów polskiej nauki i działalności B&R, związanych z budowaniem pozytywnego i interesującego wizerunku naukowca i innowatora, komercjalizacją opracowanych rozwiązań poprzez komunikację i popularyzacją nauki w społeczeństwie.

Działalność w organach instytutu i jego komisjach:

Członek Zespołu ds. zakupu strategicznej aparatury w ICHB PAN

Członek Zespołu ds. bioetyki i RODO w badaniach bioetycznych w ICHB PAN

Działalność w organach pozainstytutowych:

Członek Komisji Biotechnologii przy Poznańskim Oddziale PAN, kadencja 2019-2023

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1

Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

- 2011 Wyróżnienie publikacji “Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro (2011), Nucleic Acid Ther. 21(5), 333-46 (Tyczewska A, Kurzynska-Kokorniak A, et al.), przez F. Steele’a, edytora Nucleic Acid Therapeutics – jedna z najciekawszych prac eksperymentalnych opublikowanych w Nucleic Acid Therapeutics w roku 2011
- 2019 Nagroda Naukowa Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za najlepszą publikację przeglądową powstałą w Instytucie w roku 2018 za pracę:
Tyczewska A, Woźniak E, Gracz J, Kuczyński J, Twardowski T* (2018) Towards Food Security: Current State and Future Prospects of Agrobiotechnology. Trends in Biotechnology, 36(12):1219-1229, DOI <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.008>
- 2020 Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii “Naukowiec przyszłości” za realizację projektu NCN “ Analiza epigenomu i proteomu kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), linii odpornej i wrażliwej na herbicyd”

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje **37** oryginalnych prac twórczych, **2** patenty (europejski i polski), **28** komunikatów konferencyjnych, **10** referatów konferencyjnych, **2** rozdziały w monografiach. Na mój opublikowany dorobek naukowy składa się **35** prac współautorskich oraz **2** autorskie, z czego w **16** publikacjach jestem autorem wiodącym, a w **14** korespondencyjnym. Spośród **37** oryginalnych prac twórczych, **27** zostało wydane w języku angielskim, w tym **15** w czasopismach z Master Journal List.

Łączna suma uzyskanych przeze mnie punktów zgodnie z listą czasopism MNiSW z uwzględnieniem osiągnięcia naukowego wynosi **1444**.

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora na mój dorobek naukowy składały się 6 oryginalnych prac twórczych. Znaczne zwiększenie dorobku naukowo-badawczego miało miejsce po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

Summary IF moich publikacji według listy Journal Citation Reports (JCR) wynosi **78,833** (5-letni: **79,504**), summary IF publikacji konferencyjnych: **15,901**, h-index: **7**, liczba cytowań: **143**, bez autocytowań: **130**.