

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

Dr Andrzej Mirosław Pacak

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów**

Poznań 2017

1. Imię i nazwisko: Andrzej Mirosław Pacak

Dane kontaktowe:

Zakład Ekspresji Genów

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

Tel. 618295955

e-mail: apacak@amu.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister biotechnologii - 12.06.1998 - Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej "Wykorzystanie techniki RAPD w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych wątrobowców z rodzaju *Pellia*".

Promotor: Prof. Zofia Szweykowska-Kulińska, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii – biologii molekularnej – nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 20 września 2002 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Pochodzenie chloroplastów i mitochondriów w allotetraploidalnym gatunku wątrobowca *Pellia borealis*” (rozprawa nagrodzona wyróżnieniem).

Promotor: Prof. Zofia Szweykowska-Kulińska, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Recenzenci: Prof. Wiesław Prus-Głowacki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Prof. Grzegorz Węgrzyn, Uniwersytet Gdański

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2002 – do dnia dzisiejszego: adiunkt w Zakładzie Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

06.07.2007-05.07.2009 – zatrudnienie w ramach stypendium Marie Curie Intra-European Fellowship na Uniwersytecie w Arhus (Aarhus University, Kopenhaga, Dania, postdoc), urlop bezpłatny na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 roku poz. 882 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Identyfikacja i analiza funkcji genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej w jęczmieniu”.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Liczba cytowań według bazy Web of Science, stan na dzień 25.02.2017;

Punkty MNiSW (lista z dnia 9 grudnia 2016);

IF - Impact Factor podany zgodnie z rokiem opublikowania pracy;

IF₍₅₎ – aktualny pięcioletni IF;

* - autor korespondujący

Pacak, A., Strozycki, P.M., Barciszewska-Pacak, M., Alejska, M., Lacomme, C., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., and Figlerowicz, M. (2010). The brome mosaic virus-based recombination vector triggers a limited gene silencing response depending on the orientation of the inserted sequence. *Archives of Virology* 155, 169-179. doi: 10.1007/s00705-009-0556-9. **IF 2010 = 2,209; Liczba punktów MNiSW = 20.**

Pacak, A., Geisler, K., Jorgensen, B., Barciszewska-Pacak, M., Nilsson, L., Nielsen, T.H., Johansen, E., Gronlund, M., Jakobsen, I., and Albrechtsen, M. (2010). Investigations of barley stripe mosaic virus as a gene silencing vector in barley roots and in *Brachypodium distachyon* and oat. *Plant Methods* 6, 26. doi: 10.1186/1746-4811-6-26. **IF 2010 = 3,277; Liczba punktów MNiSW = 40.**

Sobkowiak, L., Bielewicz, D., Malecka, E.M., Jakobsen, I., Albrechtsen, M., Szweykowska-Kulinska, Z., and **Pacak, A***. (2012). The Role of the *PIBS* Element Containing Promoter-Driven Genes in Pi Transport and Homeostasis in Plants. *Frontiers in Plant Science* 3, 58. doi: 10.3389/fpls.2012.00058. **IF₍₅₎ = 4,461; Liczba punktów MNiSW = 40.**

Pacak, A.M*, Barciszewska-Pacak, M., Swida-Barteczka, A., Kruszka, K., Segal, P., Milanowska, K., Jakobsen, I., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2016). Heat stress affects Pi-related genes expression and inorganic phosphate deposition/accumulation in barley. *Frontiers in Plant Science* 7, 926. **IF₍₅₎ = 4,461; Liczba punktów MNiSW = 40.**

Wszystkie publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego powstały po doktoracie.

c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**Tytuł osiągnięcia naukowego: „Identyfikacja i analiza funkcji genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej w jęczmieniu”.****I. Wprowadzenie**

W latach 1993-1998 studiowałem na kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wybór tego kierunku podyktowany był chęcią ulepszania organizmów roślinnych tak, aby mogły one sprostać niekorzystnym zmianom środowiskowym. Chodziło tu zarówno o czynniki biotyczne, jak i abiotyczne. Moje zainteresowania koncentrowały się na szukaniu odpowiedzi na pytanie jak zmienia się ekspresja genów roślinnych pod wpływem różnych warunków środowiskowych. W trakcie doktoratu wykonanego w latach 1998-2002, pod kierunkiem prof. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu przy użyciu technik biologii molekularnej określiłem skąd pochodzą chloroplasty i mitochondria w allotetraploidalnym gatunku wątrobowca *Pellia borealis* (Pacak and Szweykowska-Kulinska, 2003). Czas ten był dla mnie bardzo owocny naukowo gdyż mogłem odtworzyć zdarzenia, które miały miejsce w przeszłości i doprowadziły do powstania nowego gatunku. Po skończonym doktoracie postanowiłem sam wprowadzać zmiany do organizmów żywych tak, aby między innymi poznać funkcje ich genów. Postanowiłem również zmienić obiekt swoich badań z wątrobowców (rodzaj *Pellia*) na roślinę użytkową - jęczmień (*Hordeum vulgare*). Chciałem bowiem wykorzystać swoją wiedzę naukową nie tylko po to, aby poznać funkcje genów, ale również by móc ją wykorzystać do ulepszania jęczmienia na drodze modyfikacji genetycznej. Jestem obecnie kierownikiem grantu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), który ma na celu określenie roli genu oraz białka PHO2 (PHOSPHATE2) w regulacji homeostazy fosforanowej (UMO-2013/11/B/NZ9/01761). Jednymi z celów tego projektu jest identyfikacja czynników transkrypcyjnych oddziałujących z promotorem i 5'UTR genu *PHO2* oraz identyfikacja białek oddziałujących z PHO2. Do tego realizacji projektu zatrudniłem jednego doktora nauk biologicznych oraz doktoranta.

Ia. Znaczenie jęczmienia jako rośliny uprawnej

Jęczmień jest bardzo ważną rośliną użytkową narażoną na wiele niekorzystnych warunków środowiskowych takich jak susza, niedobór składników mineralnych, atak patogenów grzybowych. Strona tytułowa ostatniego numeru *Plant Physiology* (marzec 2017) najlepiej pokazuje, na jakie niekorzystne warunki środowiskowe napotyka jęczmień w trakcie swojego rozwoju. Zdjęcie przedstawia dziki jęczmień, który wyrasta ze spękanej ziemi (widoczny niedobór wody) w Dolinie Hebronu, blisko Morza Martwego (Dakhiya et al., 2017). Jęczmień jest piątą pod względem tonażowym rośliną uprawną na świecie po kukurydzy, ryżu, pszenicy, soi (140 milionów ton metrycznych) (Ullrich, 2011). W 2015 roku w Polsce jęczmień uprawiany był na 0,8 mln hektarów co daje mu trzecie miejsce pod

względem areału uprawnego zbóż za pszenicą i pszenżytem (dane z wynikowego, szacunkowego badania GUS z 2015¹ roku). Wybór jęczmienia jako obiektu badań nastąpił w roku 2002 i niósł ze sobą wiele niebezpieczeństw związanych chociażby z brakiem informacji o budowie genomu, genów i ich ekspresji. Pierwszy pełny opis genomu (niestety obarczony licznymi błędami został opublikowany dopiero w 2012 roku (International Barley Genome Sequencing *et al.*, 2012). Aby poznać funkcjonowanie genów wykorzystuje się mutanty z uszkodzonym genem, o obniżonej lub całkowicie wyeliminowanej ekspresji bądź też organizmy, w których dany gen ulega zwiększonej ekspresji (nadekspresja). Istnieje wiele metod prowadzących do otrzymania mutantów. U roślin można stosować transformację wykorzystującą: mikrowstrzeliwanie, transformację wykorzystującą *Agrobacterium tumefaciens*, chemiczną mutagenезę (EMS, metanosulfonian etylu), mutagenезę wykorzystującą czynniki fizyczne (np. promieniowanie Rentgenowskie lub promieniowanie γ), technikę TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) czy ostatnio technikę CRISPR-Cas9 (Holme *et al.*, 2006; Sobkowiak and Szweykowska-Kulinska, 2007; Bortesi and Fischer, 2015; Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017). W przypadku jęczmienia wiele z tych technik jest bardzo żmudnych i trudnych w porównaniu chociażby do *Arabidopsis thaliana*. Stąd dużo mojego wysiłku skoncentrowane było na poznaniu jęczmiennych genów, jak i technik związanych z możliwością badania regulacji ich ekspresji.

Zalety jęczmienia zostały przedstawione w monografii pod redakcją Prof. Henryka Gąsiorowskiego zatytułowanej „Jęczmień chemia i technologia” (Gąsiorowski, 1997). Jęczmień wykorzystywany jest głównie na paszę oraz do produkcji słodu, skrobi, alkoholu etylowego, glukozy, maltozy i β -amylozy. Obecnie zaczyna też odgrywać coraz większą rolę jako zboże konsumpcyjne. Jeszcze w XIX wieku chleb jęczmienny był popularny w Europie. Obecnie w sklepach dostępnych jest wiele produktów opartych na jęczmieniu takich jak kasze, płatki, kawa zbożowa, piwa, ciasteczka. W jęczmieniu występuje wiele ważnych dla prawidłowego funkcjonowania przewodu pokarmowego człowieka substancji, w tym β -glukany; jako jedyne zboże jęczmień zawiera też wszystkie formy witaminy E (Gąsiorowski, 1997). Uprawa jęczmienia wymaga odpowiedniego klimatu, nawodnienia oraz dobrych gleb z przynajmniej średnią zawartością przyswajalnych form fosforu, potasu i magnezu². Wynika to ze słabo rozwiniętego systemu korzeniowego i krótkiego okresu wegetacji³.

Ib. Rola fosforu i fosforanów

Na obecnie obserwowane niekorzystne zmiany klimatyczne nakładają się potrzeby roślin na składniki mineralne niezbędne do prawidłowego rozwoju. Szczególne znaczenie mają tutaj azot (N) oraz fosfor (P). Fosfor jest niezbędny do biosyntezy DNA, RNA, fosfolipidów. Hydroliza bezwodnikowych wiązań fosforanowych obecnych w cząsteczce ATP dostarcza energii chemicznej do wielu procesów życiowych. W mięśniach kręgowców ważną rolę pełni fosforan kreatyny, który wykorzystywany jest do regeneracji ATP z ADP (Berg *et al.*, 2009). Fosfor jest zaangażowany w przekazywanie sygnałów poprzez

¹. <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/uprawy-rolne-i-ogrodnicze/wynikowy-szacunek-produkcji-glownych-ziemioplodow-rolnych-i-ogrodniczych-w-2015-r-5.13.html>

². <https://nawozy.eu/wiedza/poradnik-nawozenia/jeczmienn-jary.html>

³. <https://nawozy.eu/wiedza/poradnik-nawozenia/jeczmienn-jary.html>

fosforylację białek prowadzonych przez kinazy białkowe. Fosforylacji podlega aż 30% białek eukariotycznych (Berg et al., 2009). Źródłem łatwo przyswajalnego fosforu dla roślin są fosforany. Najczęściej fosfor (P) jest pobierany w postaci jonów, głównie H_2PO_4^- i w mniejszej ilości w postaci jonów HPO_4^{2-} . W ich pozyskanie zaangażowane są różne produkty różnych genów, m.in. transportery fosforanów PHT1, czynniki transkrypcyjne PHR1 (Phosphate Starvation Response Regulator 1) i białka regulatorowe na przykład PHO2. W końcowym etapie fosfor obecny w roślinach lub w produktach mięsnych jest przyswajany przez człowieka (Johnston, 2000). Ważnym źródłem fosforu dla zwierząt (głównie dla przeżuwaczy) jest forma zapasowa fosforanów obecna w ziarnie zbóż pod postacią kwasu fitowego i jego soli (Johnston, 2000). O tym jak ważne są fosforany dla człowieka świadczy fakt, że ludzki szkielet zbudowany jest głównie z fosforanu wapnia (Johnston, 2000).

Jak już napisano powyżej, rośliny pobierają fosfor z gleby w postaci fosforanów. Niestety wiele gleb jest ubogich w fosforany, co powoduje konieczność dostarczania fosforu za pośrednictwem nawozów sztucznych. Do ich produkcji używa się skał fosforanowych, których główne rezerwy znajdują się w Maroku⁴. Przewiduje się, że tanie rezerwy wkrótce ulegną wyczerpaniu. Szacuje się, że może to nastąpić około 2050 roku (Scott, 2008). Stąd trwają obecnie prace nad sposobami ograniczenia zużycia fosforanów. Oprócz dobroczynnego wpływu na rozwój roślin fosforany stanowią również zagrożenie ze względu na zanieczyszczenia wód przez spływające z pól składniki nawozów sztucznych. Obecnie trwają intensywne prace zarówno w instytucjach badawczych jak i przedsiębiorstwach nad możliwościami ograniczenia zużycia fosforanów w produkcji zwierzęcej, zwiększenia recyklingu fosforanów. Prace te dotyczą również usprawnienia roślin pod kątem wykorzystania naturalnych procesów prowadzących do ograniczenia zapotrzebowania na fosforany. Uczeni analizują np. stare odmiany jęczmienia, które jak się okazało mogą rosnąć w warunkach mniejszego stężenia fosforanów lub mniejszej ich dostępności w glebie. Takim przykładem jest odmiana jęczmienia nazwana Uist Bere⁵. Odmiana ta charakteryzuje się większą aktywnością takich enzymów, jak fosfomonoesteraza, fosfodiesteraza, fitaza oraz większą biomasą części nadziemnej w porównaniu do odmiany Optic uprawianej obecnie, w warunkach niedoboru fosforu w glebie. Jednakże wprowadzenie starszych odmian może być problematyczne, gdyż mogą one charakteryzować się cechami niepożądanymi przez hodowców (np. słabe plonowanie). Stąd prowadzone badania z jednej strony powinny prowadzić do otrzymania zbóż o większej tolerancji na niedobór fosforanów, z drugiej strony ich cechy użytkowe nie powinny ulec pogorszeniu. Niedostateczna zawartość fosforanów w glebie prowadzi do obniżenia wagi jęczmienia i szybszego starzenia się liści (Pacak et al., 2016a).

Ic. Wyciszanie genów w jęczmieniu

Po otrzymaniu tytułu doktora nauk biologicznych zmieniłem swoją dotychczasową tematykę badawczą koncentrując się na jęczmieniu i wpływie czynników abiotycznych na jego rozwój. W szczególności moje zainteresowania koncentrowały się na odpowiedzi jęczmienia na takie stresy jak niedobór fosforanów, wysoka temperatura oraz niedobór wody.

⁴ <https://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Facts-about-phosphate.pdf?la=en>

⁵ http://www.hutton.ac.uk/webfm_send/204

Analizowałem ekspresję genów jęczmienia, w tym genów kodujących mikroRNA i zmiany ich ekspresji pod wpływem stresu chłodu, zasolenia, wysokiej temperatury, traktowania ABA (kwasem abscysynowym) oraz niedoboru fosforu. Wykonane prace, których rezultaty zostały umieszczone w osiągnięciu naukowym jak i w pozostałym dorobku naukowym, pozwoliły mi lepiej poznać mechanizmy kierujące odpowiedzią jęczmienia na czynniki abiotyczne. Aby móc prowadzić badania na jęczmieniu nauczyłem się zasad jego hodowli, izolacji jego RNA wzbogaconego w niskocząsteczkowy RNA, przygotowania bibliotek małych RNA do głębokiego sekwencjonowania, transformacji jęczmienia, wyciszania genów jęczmiennych metodą VIGS (Virus Induced Gene Silencing, indukowane przez wirusa wyciszanie genu), izolacji protoplastów jęczmienia i wielu innych technik molekularnych.

II. Uzyskane wyniki w ramach osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cztery publikacje naukowe: trzy eksperymentalne i jedna przeglądowa. W pierwszej z nich opisałem narzędzie VIGS służące do identyfikacji funkcji genów w jęczmieniu. W drugiej przedstawionej publikacji wykorzystałem to narzędzie w postaci zmodyfikowanego wirusa BSMV (Barley Stripe Mosaic Virus, Wirus Pasiastej Mozaiki Jęczmienia) do identyfikacji i analizy genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej w jęczmieniu. W trzeciej publikacji tj. pracy przeglądowej, opisałem cechy charakterystyczne dla promotorów genów związanych z gospodarką fosforanową. W ostatniej zaś opisałem, jak zmienia się ekspresja genów jęczmienia zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej pod wpływem stresu wysokiej temperatury. Większość prac badawczych wykonałem w Zakładzie Ekspresji Genów kierowanym przez Prof. Zofię Szweykowską-Kulińską. Wykorzystałem również wyniki pracy, którą wykonałem podczas stażu podoktorskiego na Uniwersytecie w Aarhus (Dania).

Aby przeanalizować funkcje genów w jęczmieniu nauczyłem się technik prowadzących do obniżenia ich ekspresji. Jedna z nich określona mianem VIGS została opisana szczegółowo w pracach wchodzących w skład dorobku naukowego (Barciszewska-Pacak et al., 2005; Barciszewska-Pacak et al., 2016). Chciałbym nadmienić, że pierwsze moje prace eksperymentalne związane z wykorzystaniem wirusów RNA do wyciszania genów miały charakter pionierski w Polsce. Dlatego warunki hodowli jęczmienia, stan rozwojowy jęczmienia, w którym należało przeprowadzić inokulację, a także, który liść powinien być inokulowany, zostały ustalone eksperymentalnie. Zespół, który brał udział w tych badaniach złożony był z prof. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej, specjalistki w zakresie procesów potranskrypcyjnego wyciszania genów oraz w zakresie roli mikroRNA, prof. Artura Jarmołowskiego - eksperta procesów związanych z dojrzewaniem RNA, prof. Marka Figlerowicza - znawcy procesu rekombinacji wirusowego RNA, dr Christophe'a Lacomme'a, który wykorzystał krótkie sekwencje tworzące spinę RNA do efektywnego wyciszania genów w tytoniu i jęczmieniu. W zespole olbrzymią rolę odegrała dr Maria Barciszewska-Pacak, która wykonała analizy wyciszania genów zarówno w Polsce, jak i w laboratorium Dr Christophe'a Lacomme'a w Scottish Crop Research Institute, Dundee, w Wielkiej Brytanii (obecnie James Hutton Institute). Zastosowana metoda VIGS polega na wykorzystaniu wirusów roślinnych najczęściej typu RNA do wywołania w roślinie procesu wyciszania genów, tzn. obniżenia ich ekspresji. Została ona też opisana w pracach wchodzących w skład

dorobku naukowego (Barciszewska-Pacak et al., 2005; Barciszewska-Pacak et al., 2016). W skrócie, do umieszczonego w plazmidzie genomowego cDNA wirusa wprowadza się fragment genu, który chcemy wyciszyć. W kolejnym kroku przeprowadza się transkrypcję *in vitro*, a otrzymanymi cząsteczkami RNA inokuluje się mechanicznie (wcieranie) liście docelowej rośliny, np. jęczmienia. Cząsteczki RNA wnikają do komórek rośliny, gdzie dochodzi do rozwoju infekcji wirusowej. Po 5-6 dniach od inokulacji na liściach zaczynają pojawiać się objawy infekcji wirusowej. Jeżeli wyciszenie genu prowadzi do zmian fenotypowych, to wkrótce po zaobserwowaniu objawów infekcji pojawiają się symptomy świadczące o wyciszeniu (zmniejszeniu) ekspresji danego genu. W publikacji umieszczonej w *Archives of Virology* opisałem metodę wyciszania genów w jęczmieniu przy użyciu wektora BSMV oraz BMV (Brome Mosaic Virus, Wirus Mozaiki Stokłosa) (Pacak et al., 2010b). W pierwszej kolejności chciałem sprawdzić, jaki rodzaj wprowadzonego fragmentu genu wywołuje największy stopień wyciszania. W tym celu wraz z innymi współautorami pracy postanowiłem wyciszyć gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*, kodujący białko zielonej fluorescencji) wprowadzony uprzednio do tytoniu. Białko GFP nadaje liściom rośliny transgenicznej kolor zielony w świetle UV. W przypadku wyłączenia genu *GFP* pojawia się czerwone zabarwienie liści pochodzące od autofluorescencji chlorofilu. Do tych badań użyliśmy wirusa BMV. Był on wcześniej używany do badań procesów rekombinacji (Alejska et al., 2005). Genom wirusa BMV jest trzyczęściowy i składa się z cząsteczek RNA1, RNA2, RNA3. Sekwencje wyciszające wprowadzaliśmy do cząsteczki RNA3 umieszczonej w plazmidzie pMat0-RNA3 pomiędzy miejscami restrykcyjnymi *SpeI* i *MluI*. Sekwencje wyciszające *GFP* zostały wprowadzone do plazmidu niosącego cDNA dla cząsteczki RNA3. Fragmenty były w orientacji sens, antysens oraz mogły tworzyć struktury typu spinka do włosów. Sekwencje wprowadzone w orientacji sens mogły tworzyć struktury drugorzędowe jak również tworzyć dwuniciowe fragmenty w trakcie replikacji wirusowego RNA. Sekwencje antysens mogły również tworzyć struktury dwuniciowe poprzez hybrydyzację z mRNA kodującym GFP. Sekwencje tworzące struktury typu spinka do włosów są dwuniciowe i tak, jak wyżej wymienione dwuniciowe fragmenty RNA, mogły być rozpoznawane przez enzymy typu Dicer-like 1 (DCL1), a następnie przez nie cięte na małe wyciszające RNA (siRNA). Przeprowadzone przez nas badania pokazały, że w przypadku wyciszania transgeny *GFP* w tytoniu najlepsze rezultaty otrzymano inokulując rośliny cząsteczkami RNA1, RNA2 i zmodyfikowanym RNA3 zawierającym fragment sekwencji *GFP* wprowadzony w orientacji antysens (GFPa-BMV). W przypadku RNA3 zawierającym fragment *GFP* w orientacji sens (GFPs-BMV) lub tworzącym spinkę do włosów (GFPsa-BMV, GFPas-BMV) efekty wyciszania były mniejsze, z czego wynikała większa intensywność zielonej fluorescencji pochodzącej od białka GFP i mniejsza intensywność czerwonej autofluorescencji pochodzącej z chlorofilu w porównaniu z roślinami inokulowanymi konstrukcjami typu antysens. Najbardziej obniżona fluorescencja GFP w pierwszym z omawianych przypadków wynikała z mniejszej akumulacji białka GFP w roślinach inokulowanych RNA GFPa-BMV w porównaniu do roślin inokulowanych pozostałymi trzema konstrukcjami. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że wirus zawierający fragment *GFP* w orientacji antysens utrzymywał się nawet w 15 dni po inokulacji w transgenicznym tytoniu i tym samym mógł dłużej być źródłem, z którego generowane były cząsteczki siRNA. Pozostałe fragmenty wyciszające zanikały w dziesięć dni po inokulacji. W

tej samej pracy porównaliśmy również jak efektywnie wyciszają endogenne geny wirusy BMV i BSMV. Wirus BSMV jest wirusem RNA z genomem złożonym również z trzech cząsteczek RNA: RNA α , RNA β i RNA γ . Do odpowiednich plazmidów niosących cDNA wirusa BMV i BSMV wprowadziliśmy fragmenty sekwencji kodującej enzym desaturazę fitoenu (*PDS*, phytoene desaturase). Enzym ten jest odpowiedzialny za przekształcenie fitoenu do fitofluenu i ζ -karotenu. W kolejnych krokach powstaje α -karoten i β -karoten. Związki te pełnią funkcję ochronną dla chlorofilu. W przypadku uszkodzenia *PDS* dochodzi do akumulacji fitoenu (substrat dla enzymu *PDS*) i obniżenia ochrony chlorofilu. Roślina narażona na działanie promieni świetlnych zaczyna wykazywać na liściach symptomy wybielenia (photo-bleaching) (Holzberg et al., 2002; Barciszewska-Pacak et al., 2016). Po przeprowadzonej inokulacji tym razem jęczmienia genomowym RNA wirusów BMV i BSMV stwierdziliśmy, że wirus BSMV wykazuje większą efektywność w wyciszaniu endogennego genu *PDS*. Obserwowaliśmy większy stopień wybielenia liści nr IV w jęczmieniu inokulowanym RNA wirusa BSMV (z fragmentem *PDS* w orientacji antysens - BSMV.PDSas₁₈₀) aniżeli w jęczmieniu inokulowanym wirusem BMV ze zmodyfikowaną cząsteczką RNA3 z fragmentem *PDS* również w orientacji antysens.

Podsumowując wykonane analizy pokazały, że wektory do wyciszania genów oparte o wirus BSMV okazały się skuteczniejsze w porównaniu do wektorów bazujących na wirusie BMV. Moja rola w publikacji polegała na udziale w przygotowaniu konstruktów opartych o wirusa BMV, inokulacji jęczmienia, analizie danych fenotypowych, analizie pozostałych danych oraz w pisaniu i przygotowaniu publikacji do druku.

Oceniam swój udział w publikacji z Archives of Virology na 40 %.

Chcąc wykorzystać nabyte umiejętności związane z wyciszaniem genów w jęczmieniu wyszukałem ośrodki naukowe, które badały funkcje genów w jęczmieniu stosując technikę VIGS. Mój wybór padł na grupę badawczą dr Merete Albrechtsen z Uniwersytetu w Aarhus. Wraz z dr Merete Albrechtsen napisałem grant Marie Curie Intra-European Fellowship. W czasie jego realizacji zaznajomiłem się z tematyką związaną z gospodarką fosforanową u roślin, w tym w szczególności w jęczmieniu. Identyfikowałem geny związane z gospodarką fosforanową, prowadziłem hodowle jęczmienia przy różnej zawartości fosforanów w podłożu, w glebie i w kulturach hydroponicznych. Przeprowadzałem analizy danych dotyczących zawartości fosforanów w jęczmieniu oraz wyciszyłem geny jęczmienne stosując technikę VIGS. Współpracowałem w tym czasie z wybitnymi znawcami zagadnień związanych z regulacją gospodarki fosforanowej pracującymi w Danii. Jeden z nich, prof. Tom Hamborg Nielsen jest uznanym specjalistą badającym czynniki transkrypcyjne zaangażowane w regulację gospodarki fosforanowej, natomiast kolejny: prof. Iver Jakobsen bada wpływ mikoryzy i grzybów mikoryzowych na funkcjonowanie roślin (Nilsson et al., 2007; Smith et al., 2011). Współpracując z prof. Jakobsenem badałem wpływ grzyba *Glomus intraradicis* na ekspresję genów związanych z pobieraniem fosforanów. Wykazaliśmy, że transporter fosforanów w jęczmieniu *PHT1;8* jest aktywowany tylko w przypadku obecności grzyba mikoryzowego. Wiedza jaką nabyłem w trakcie pobytu na stypendium Marie Curie w Danii pozwoliła mi na zaprojektowanie nowych badań i wybór tematyki badawczej

skoncentrowanej wokół genów zaangażowanych w regulację gospodarki fosforanowej w jęczmieniu.

W kolejnej publikacji stosując metodę VIGS opartą o wirusa BSMV wyciszyłem jęczmienne geny związane z utrzymaniem homeostazy fosforanowej, w tym transporter fosforanów *PHT1;1*, czynnik transkrypcyjny *PHR1* niekodujący RNA *IPS1* (*Induced by Phosphate Starvation 1*) oraz gen *PHO2* (Pacak et al., 2010a). W pierwszym kroku zidentyfikowałem jęczmienne geny *PHO2* oraz *PHR1*. Również *IPS1* został zidentyfikowany i opisany w publikacji. Zidentyfikowany przeze mnie czynnik transkrypcyjny *PHR1* oddziałuje z elementem *P1BS* znajdującym się w 5'UTR genu *PHO2*. Zostało to wykazane drożdżowym systemem jednohybrydowym (dane przygotowywane do publikacji). Szczególną uwagę zwróciłem właśnie na gen *PHO2*. Analizując podobieństwo do znanych roślinnych genów *PHO2* i białek *PHO2* wytypowałem potencjalny jęczmienny gen *PHO2*. Sklonowałem sekwencję kodującą ten gen. Wykonałem jego sekwencjonowanie i analizę sekwencji białkowej. Aby wykazać, że wytypowany gen *PHO2* rzeczywiście wpływa na gospodarkę fosforanową jęczmienia wyciszyłem ekspresję genu *PHO2* metodą VIGS. Następnie porównałem poziom jego ekspresji w korzeniu jak i w części nadziemnej do tkanek jęczmienia inokulowanego kontrolnym wektorem wirusowym zawierającym fragment sekwencji *GFP*. W kolejnym etapie przeanalizowałem zawartość fosforanów w wyciszonych roślinach i okazało się, że obniżenie poziomu genu *PHO2* skutkuje zmianami w stężeniu fosforanów. W korzeniu nastąpiło obniżenie poziomu fosforanów, zaś w części nadziemnej zaobserwowałem akumulację fosforanów. Obie te obserwacje pokazały, że istotnie wytypowany gen *PHO2* wpływa na poziom fosforanów w jęczmieniu. Jednocześnie obserwowany wzrost stężenia fosforanów w części nadziemnej był zgodny z obserwacjami mutantu genu *pho2* u *Arabidopsis*. W mutancie tym obserwowano akumulację fosforanów w części nadziemnej (Delhaize and Randall, 1995). Co ciekawe w momencie publikacji nie potrafiliśmy wyjaśnić, dlaczego w korzeniu obniżeniu ekspresji *PHO2* towarzyszy obniżenie poziomu fosforanów. Dopiero w późniejszych publikacjach wykazano, w jaki sposób białko *PHO2* wpływa na gospodarkę fosforanową. *PHO2* jest enzymem typu E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) odpowiedzialnym za przenoszenie cząsteczki ubikwityny na docelowe białko. Przenoszona ubikwityna jest następnie dołączana przez ligazę typu E3 do docelowego białka (Liu et al., 2012; Huang et al., 2013; Park et al., 2014). Białko z dołączoną cząsteczką ubikwityny jest następnie degradowane przy udziale 26S proteasomu (Smalle and Vierstra, 2004). Wśród białek, które mogą ulegać degradacji przy udziale *PHO2* są między innymi transportery fosforanów *PHT1;1*, *PHT1;4*, jak i białko *PHO1* (*PHOSPHATE1*) (Huang et al., 2013; Park et al., 2014). *PHT1;1* jest transporterem fosforanów ulokowanym w błonie komórkowej komórek skórki i w trichoblastach korzenia, który na zasadzie symportu transportuje fosforany z gleby do wnętrza komórki. W przypadku białka *PHO1* jest ono odpowiedzialne za ładowanie fosforanów do ksylemu, za pośrednictwem, którego są one następnie transportowane z korzenia do części nadziemnej. Dodatkowo gen *PHT1;1* jest silnie indukowany przez niedobór fosforu. Stąd w normalnych warunkach (wystarczających) stężenia fosforanów jego ekspresja jest niska, co pociąga za sobą zmniejszony transport fosforanów z gleby do komórki. Oznacza to, że wyciszanie *PHO2* może jedynie w niewielkim stopniu zwiększyć poziom białka *PHT1;1* a tym samym napływ fosforanów do korzenia. Obniżenie poziomu *PHO2*, a tym samym poziomu białka *PHO2* powoduje też jednak

mniejszą degradację białka PHO1. Prowadzi to do tego, że przy zmniejszonym napływie fosforanów z gleby do korzenia następuje zwiększony wypływ fosforanów z korzenia. Stąd obserwujemy obniżenie poziomu fosforanów w korzeniu, gdy dochodzi do obniżenia ekspresji *PHO2*. Otrzymane przez mnie sekwencje dla genu *PHO2* (GenBank, acc no GQ861514), jak i dla 847 aminokwasowej sekwencji białkowej PHO2 (GenBank, acc no ACV72276) zostały umieszczone w bazie danych GenBank.

Oceniam swój udział w publikacji z Plant Methods na 45 %.

Aby przedstawiony powyżej model wpływu wyciszenia genu *PHO2* na poziom fosforanów mógł być spełniony, ekspresja genu *PHO1* powinna być mniej wrażliwa na zmiany poziomu fosforanów aniżeli ekspresja genu transportera fosforanów *PHT1;1*. W pracy z roku 2016 potwierdziłem, że moje założenie okazało się słuszne (Pacak et al., 2016a). Skupiłem się na wpływie stężenia fosforanów oraz wysokiej temperatury na ekspresję genów związanych z utrzymaniem homeostazy fosforanowej w jęczmieniu. Stwierdziłem, że rzeczywiście ekspresja genu *PHO1* jest mniej wrażliwa na zmiany stężenia fosforanów aniżeli geny *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHT1;6* czy też *SPX-MFS*. W publikacji szczególnie nacisk położyłem na identyfikację kolejnych genów zaangażowanych w transport, regulację oraz utrzymywanie prawidłowej homeostazy fosforanowej. Metodami bioinformatycznymi wyznaczyłem geny zaangażowane w gospodarkę fosforanową w jęczmieniu: *PHR2* (czynnik transkrypcyjny Phosphate Starvation Response Regulator 2), *PHO1*, *SPX-MFS* (gen kodujący białko zaangażowane prawdopodobnie w transport fosforanów, skrót nazwy genu od SYG1, PHO81, XPR1 - Major Facility Superfamily) i *SIZ1* (gen kodujący ligazę typu SUMO E3, która przyłącza peptyd SUMO m.in. do czynnika transkrypcyjnego PHR1). W tym celu w pierwszej kolejności przeszukiwałem bazy danych takie, jak Ensembl Plants⁶ oraz GenBank⁷. Wykonując analizy bioinformatyczne zidentyfikowałem gen potencjalnej ligazy typu E3 *NLA* występującej w jęczmieniu (MLOC_52462.2, Ensembl Plants database), potencjalne jęczmienne białko PHO1 (MLOC_12153.1), czynnik transkrypcyjny PHR2 (MLOC_60198.1) oraz białko SIZ1 (MLOC_38182.4). Jęczmienne białko E3 (NLA) posiada cechy charakterystyczne dla ligazy E3 (NLA) zaangażowanej w degradację białek związanych z regulacją homeostazy fosforanowej w Arabidopsis (GenBank nr: NM_001123746.1): domeny SPX_BAH1-like (SYG1/Pho81/XPR1) i RING (Really Interested New Gene) (Pacak et al., 2016a). Białko to określone skrótem NLA (Nitrogen Limitation Adaptation) liczy 333 aminokwasy i jest zaangażowane w przyłączanie cząsteczki ubikwityny do białek uczestniczących w pobieraniu fosforanów – transporter fosforanów (*PHT1*). U Arabidopsis transkrypt kodujący wspomnianą ligazę posiada w 5'UTR miejsce wiązania mikroRNA827 (5' UUAGAUGACCAUCAGCAAACA 3'). Wiadomo, że poziom mikroRNA827 podobnie jak mikroRNA399 zwiększa się w warunkach niedoboru fosforanów (Pacak et al., 2016a). Najbliższy jęczmienny homolog białka NLA występuje w bazie danych Ensembl Plants z oznaczeniem MLOC_52462.2. Liczy ono 330 aminokwasy. To, co odróżnia jęczmienny gen *NLA* od genu *NLA* pochodzącego z Arabidopsis to brak miejsca wiązania dla mikroRNA827

⁶. <http://plants.ensembl.org/index.html>

⁷. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

(Pacak et al., 2016a). Aby być w pełni przekonany, że zidentyfikowane białko jest partnerem jęczmiennego białka PHO2 przeprowadziliśmy drożdżową analizę dwu-hybrydową (dane niepublikowane). Otrzymane wyniki potwierdziły obecność oddziaływań pomiędzy jęczmiennym białkiem PHO2 i białkiem NLA. Obecnie kierowany przeze mnie zespół wykonuje dalsze analizy mające na celu potwierdzenie interakcji PHO2 i NLA innymi metodami pull-down, analiza mikroskopowa typu BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).

W omawianej pracy opublikowanej we **Frontiers in Plant Science** sprawdziłem, jak zmienia się ekspresja genów związanych z gospodarką fosforanową w stresie wysokiej temperatury i jaki wpływ mają te zmiany na poziom fosforanów w jęczmieniu, zarówno w korzeniu jak i w części nadziemnej. Stresy abiotyczne takie jak susza, niska lub wysoka temperatura, brak minerałów w podłożu mają olbrzymi wpływ na produkcję i plon roślin uprawnych. Obserwowany wzrost temperatury stanowi wyzwanie zarówno dla rolników jak i polityków. Ocieplenie klimatu może doprowadzić do redukcji zbioru roślin uprawnych o 10% do 2050 roku (Tai et al., 2014). W przypadku jęczmienia wysoka temperatura prowadzi do zmian w ekspresji prekursorów pri-mikroRNA, jak i w poziomie dojrzałych cząsteczek mikroRNA. Zmiany te znajdują odzwierciedlenie w poziomie ekspresji docelowych mRNA rozpoznawanych przez mikroRNA (Kruszka et al., 2014). Obserwowałem również zmiany na poziomie fenotypowym w jęczmieniu poddanemu działaniu wysokiej temperatury. Wysoka temperatura prowadzi do obniżenia tempa wzrostu jęczmienia. Tydzień po zakończeniu 48 godzinnego działania wysokiej temperatury na dwutygodniowe rośliny jęczmienia zaobserwowałem szybsze starzenie się liści numer 1 oraz zahamowanie wzrostu liści numer 4 (Pacak et al., 2016a). Aby sprawdzić wpływ wysokiej temperatury na ekspresję genów związanych z utrzymaniem homeostazy fosforanowej przeanalizowaliśmy metodą RNA-Seq transkryptom jęczmienia hodowanego w warunkach wysokiej, jak i kontrolnej temperaturze. Otrzymane dane ukazujące zmiany w ekspresji genów zostały zweryfikowane przy wykorzystaniu techniki RT-qPCR. Zauważyliśmy, że wysoka temperatura wpływa na poziom ekspresji genów *PHO1*, *PHO2*, *NLA*, *PHT1;1*, *PHT1;4*, oraz *PHT1;6* zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej w jęczmieniu. Dotyczy to szczególnie części korzeniowej. Jednak pomimo dużych zmian w ekspresji tych genów nie dochodzi do gwałtownych zmian poziomu fosforanów w roślinach (Pacak et al., 2016a). Jęczmień potrafi utrzymać stężenie fosforanów na stałym poziomie. Jest to wspaniały przykład adaptacji rośliny do zmieniających się warunków środowiskowych. Według mojej wiedzy, jako pierwszy pokazałem wpływ wysokiej temperatury na ekspresję genów zaangażowanych w regulację poziomu fosforanów w jęczmieniu. Zaproponowaliśmy również model wyjaśniający sposób regulacji poziomu fosforanów w stresie wysokiej temperatury. Spadek ekspresji transporterów fosforanów *PHT1* powinien skutkować obniżeniem napływu fosforanów do korzenia, a zatem mniejszym w nim poziomem fosforanów. Tak się jednak nie dzieje. Może to wynikać z faktu, że obniżeniu ekspresji ulega również gen *PHO1*, który koduje transporter fosforanów PHO1. Białko to jest odpowiedzialne za ładowanie fosforanów do ksylemu, skąd te są następnie transportowane do części nadziemnej jęczmienia. Spadek ekspresji PHO1 może powodować zatem zahamowanie wypływu fosforanów z korzenia do części nadziemnej. Co ciekawe zauważyliśmy również, że ekspresja genów *PHO2* i *NLA* w części korzeniowej jest odmienna. *PHO2* wykazuje obniżoną, zaś *NLA* podwyższoną ekspresję pod

wpływem wysokiej temperatury. Może to oznaczać, że na poziomie białkowym ilość kompleksów PHO2/NLA biorących udział w degradacji białek związanych z transportowaniem fosforanów nie ulega znaczącej zmianie.

Oceniam swój udział w publikacji z *Frontiers in Plant Science* z roku 2016 na 70 %.

Planuję dalsze analizy białek zaangażowanych w utrzymanie homeostazy fosforanowej w jęczmieniu w stresie wysokiej temperatury. W tym celu złożyłem kolejny projekt do NCN (OPUS 12). W projekcie zatytułowanym „Zbadanie interakcji kompleksu białek typu E2 (PHOSPHATE2) i E3 (NLA) z białkami regulującymi homeostazę fosforanową w jęczmieniu w stresie wysokiej temperatury oraz przy niedoborze fosforanów” (nr rejestracyjny 2016/23/B/NZ9/00857), chciałbym poznać wpływ białek PHO2 i NLA na inne białka w stresie wysokiej temperatury. Zamierzam również we współpracy z grupą Prof. Macieja Kozaka z Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu zbadać struktury jęczmiennych białek PHO2 i E3. W tym celu planuję wykorzystać analizę SAXS (Small- Angle X-Ray Scattering, niskokątowe rozpraszanie promieniowania Rentgena) (Hein et al., 2005; Taube et al., 2014). Wszystkie moje badania w efekcie końcowym powinny doprowadzić do lepszego poznania regulacji homeostazy fosforanowej w jęczmieniu. Jej zrozumienie przyczyni się do efektywniejszego wykorzystania zasobów w tym nawozów sztucznych, obniżenia zanieczyszczenia środowiska, utrzymania plonu na dotychczasowym poziomie, przy zmieniającym się klimacie. Mam tu na myśli zmieniające się czynniki środowiskowe takie jak zanieczyszczenie powietrza, ocieplanie się klimatu, niedobór wody i składników mineralnych.

W pracy przeglądowej „The Role of the *PiBS* Element Containing Promoter-Driven Genes in Pi Transport and Homeostasis in Plants” opublikowanej w 2012 we **Frontiers in Plant Science** opisałem geny zaangażowane w utrzymanie homeostazy fosforanowej u roślin, w tym w jęczmieniu (Sobkowiak et al., 2012). Skupiłem się na elementach występujących w ich promotorach, do których wiążą się czynniki transkrypcyjne, homologi PSR1 (Phosphate Starvation Response1) z *Chlamydomonas reinhardtii*. Elementy wiążące tego typu czynniki są w skrócie nazywane *PiBS* (PHR1 binding sequence, GNATATNC). Motywy *PiBS* występują w promotorach genów kodujących: transportery fosforanów PHT1, niekodujący RNA *IPS1*, genów *MIR399*, a nawet w obrębie 5'UTR genu *PHO2*. Obecnie wykonuję wraz z kierowanym przeze mnie zespołem analizy związane z badaniem aktywności promotora jęczmiennego genu *PHO2*. Jak już wcześniej wspomniałem zidentyfikowałem dwa jęczmienne czynniki transkrypcyjne PHR1 i PHR2. Stosując technikę VIGS wyciszyłem gen *PHR1* w jęczmieniu. Wstępne analizy pokazały, że obniżenie ekspresji *PHR1* w korzeniu jęczmienia jest skorelowane z obniżeniem ekspresji genu *IPS1*. Planuję dalsze analizy typu VIGS w celu określenia wpływu czynników transkrypcyjnych typu PHR na ekspresję genu *PHO2*. Obecnie pracujący pod moim kierunkiem doktorant mgr Paweł Segal stosując drożdżowy system jednohybrydowy identyfikuje czynniki transkrypcyjne, które wiążą się z elementami *PiBS* i innymi elementami związanymi z odpowiedzią na niedobór fosforanów, obecnymi w promotorze i w 5' UTR genu *PHO2*. Otrzymane wyniki są weryfikowane przy wykorzystaniu technik EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) i double binding assay.

Oceniam swój udział w publikacji, która ukazała się w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* w roku 2012 na 70 %.

Podsumowując najważniejsze wyniki mojego osiągnięcia naukowego:

- Wykazałem, że wirus BSMV ma większą efektywność od wirusa BMV w wyciszaniu genów w liściach jęczmienia.
- Udowodniłem, że wirus BSMV występuje również w komórkach korzenia jęczmienia.
- Zidentyfikowałem jęczmienne geny związane z utrzymaniem homeostazy fosforanowej, w tym *PHO2*, *PHR1*, *NLA*, *PHO1*. Stwierdziłem, że wirus BSMV może być wykorzystywany do wyciszania genów w korzeniu jęczmienia. Pokazałem, że wyciszenie genu *PHO2* prowadzi do zwiększenia poziomu fosforanów w części nadziemnej i do obniżenia ich poziomu w korzeniu.
- Stwierdziłem, że na ekspresję takich genów jak transportery fosforanów *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHT1;6*, *PHO1*; enzym sprzęgający *PHO2*, ligaza *NLA*, niekodujący RNA *IPSI* duży wpływ ma wysoka temperatura. Pomimo dużych zmian w ekspresji powyższych genów stężenie fosforanów pozostaje na niezmiennym poziomie w jęczmieniu.
- Przedstawiłem model wyjaśniający sposób utrzymania homeostazy fosforanowej w stresie wysokiej temperatury w jęczmieniu. W trakcie trwania tego stresu dochodzi do gwałtownych zmian w ekspresji genów związanych z utrzymaniem homeostazy fosforanowej. Pomimo obniżenia ekspresji takich genów jak *PHT1;1*, *PHT1;4*, *PHT1;6*, *PHO1*, *PHO2* poziom fosforanów zarówno w korzeniu jak w części nadziemnej jęczmienia pozostaje praktycznie bez zmian. Można to wytłumaczyć w ten sposób, że ograniczeniu pobierania fosforanów przez transportery fosforanów z rodziny *PHT1* towarzyszy równocześnie ograniczenie wypływu fosforanów z korzenia do części nadziemnej. Ten ostatni proces może być wywołany przez obniżenie poziomu ekspresji transportera fosforanów *PHO1* w stresie wysokiej temperatury.

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl **czterech** prac, ich sumaryczny Impact Factor wynosi **14,408** (Zgodny z rokiem opublikowania, za wyjątkiem prac opublikowanych we *Frontiers in Plant Science*, gdzie został umieszczony aktualny, pięcioletni wskaźnik $IF_{(5)}$). Wynika to z faktu, że czasopismo to jest względnie nowe i w 2012 roku dopiero „pracowało” na swój współczynnik oddziaływania, zaś za rok 2016 brak jeszcze wartości IF). Liczba punktów **MNiSW** wynosi **140**. Spośród tych publikacji trzy mają charakter eksperymentalny, a jedna jest pracą przeglądową. W pracach eksperymentalnych jestem pierwszym autorem i w jednej z nich korespondującym. W pracy przeglądowej byłem jej pomysłodawcą i jestem w niej również autorem korespondującym. Łączna liczba cytowań omawianych czterech prac na chwilę obecną (baza Web of Science, stan na dzień 25.02.2017) wynosi **52**.

III. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Wątrobowce i powiązane publikacje

W trakcie pracy magisterskiej oraz doktorskiej moim obiektem badań były wątrobowce. Najważniejszą publikacją była praca opublikowana już po otrzymaniu tytułu doktorskiego w **Journal of Molecular Evolution** (Pacak and Szweykowska-Kulinska, 2003). Pracując nad wątrobowcami opanowałem posługiwanie się programami komputerowymi do analiz taksonomicznych i filogenetycznych takich, jak PHYLIP. Wiedzę tą wykorzystałem analizując dane. W publikacji z 2004 roku w **Acta Physiologiae Plantarum** zbudowałem drzewo podobieństwa pomiędzy izoenzymami syntazy ACC (kwasu 1-aminocyklopropano – 1- karboksylowego) (Jakubowicz and Pacak, 2004). Brałem również udział w analizach porównawczych chloroplastowego intronu tRNA^{Lys}_{UUU}. Wyniki tej pracy zostały umieszczone w publikacji w **Cellular and Molecular Biology Letters**. Introny te są interesujące z tego względu, że w ich obrębie znajduje się sekwencja kodująca maturazę (Jankowiak et al., 2004). Jako współautor byłem również zaangażowany w powstanie publikacji, które ukazały się dwukrotnie w czasopiśmie **Taxon** (Jankowiak et al., 2005; Jankowiak-Siuda et al., 2008). W pracach tych opisaliśmy źródła pochodzenia chloroplastów i mitochondriów u allopoliplodalnych gatunków mchów: *Rhizomnium pseudopunctatum* oraz *Plagiomnium curvatulum*.

W trakcie doktoratu opublikowałem 5 prac naukowych w czasopismach **Genetica**, **Folia Malacologica**, **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, **Cellular and Molecular Biology Letters**, **Postępy Biologii Komórki**.

Wyciszanie genów

Mój dorobek naukowy po doktoracie jest ściśle związany z osiągnięciem naukowym. Aby móc stosować metody genomiki funkcjonalnej w celu poznania sposobu regulacji genów jak również, aby lepiej poznać ścieżki kontrolujące ekspresję genów zaznajomiłem się ze zjawiskiem wyciszania genów (RNAi - RNA interference). Mój pierwszy artykuł opisujący zjawisko RNAi u roślin zwany też po-transkrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS – Post-transcriptional Gene Silencing) napisałem wraz z Marią Barciszewską-Pacak w numerze 61 **Biotechnologii** w roku 2003 (Pacak and Barciszewska-Pacak, 2003). W tym przeglądowym artykule ująłem najnowsze ówczesnie doniesienia literaturowe opisujące dopiero co odkryte cząsteczki małych RNA: siRNA i mikroRNA. Wyjaśniłem na czym polega proces transkrypcyjnego wyciszania genów (TGS – Transcriptional Gene Silencing) i czym różni się on od PTGS. W **dwóch monografiach książkowych**, w których jestem współautorem opisaliśmy metody służące do analizy funkcjonalnej genów u roślin (Barciszewska-Pacak et al., 2005; Barciszewska-Pacak et al., 2016), w tym szczególną rolę wirusa BSMV w badaniu funkcji genów w jęczmieniu. Protokół i zasady postępowania prowadzące do wykorzystania wirusa BSMV jako narzędzia do wyciszania genów zostały opublikowane jako rozdział w monografii książkowej. Umieściłem w niej m.in. zdjęcia pokazujące kolejne kroki związane z samym procesem inokulacji, jak również zmiany fenotypu liści jęczmienia wynikające z rozwijającej się infekcji wirusowej (Barciszewska-Pacak et al., 2016). Wykorzystanie wirusa BSMV do badań naukowych omówione zostało także w rozdziale zatytułowanym „Wirus

pasiastej mozaiki jęczmienia BSMV jako wszechstronne narzędzie genomiki funkcjonalnej” wydawnictwa książkowego **Na Pograniczu Chemii i Biologii** (Barciszewska-Pacak and Pacak, 2014).

Roślinne mikroRNA: ekspresja, biogeneza, i funkcje

Procesem wyciszania genów zajmowałem się i nadal się zajmuję nie tylko ze względu na wykorzystanie tego procesu jako narzędzia służącego do analizy funkcjonalnej genów, ale także, aby poznać sam mechanizm wyciszania genów. Jestem współautorem pracy przeglądowej opublikowanej w **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, w której byłem odpowiedzialny za porównanie procesu wyciszania u roślin i zwierząt (Stepien et al., 2016). Ponieważ jęczmień w porównaniu do innych roślin jest słabo poznaną rośliną pod względem funkcji mikroRNA, dużą część moich badań poświęciłem na identyfikację i poznanie genów mikroRNA i biogenezę tych cząsteczek w jęczmieniu. Stąd powstały publikacje opisujące jęczmienne mikroRNA (Kruszka et al., 2013; Pacak et al., 2016b; Pacak et al., 2016c). W publikacji zatytułowanej „Developmentally regulated expression and complex processing of barley pri-microRNAs” w **BMC Genomics**, gdzie jestem jednym z trzech głównych współautorów, opisaliśmy budowę wybranych genów mikroRNA jęczmienia: *MIR397b-3p*, *MIR159b*, *MIR166n*, *MIR168a-5p/168a-3p*, *MIR171e*, *MIR156g*, *MIR1126*, *MIR1120* oraz zmiany w ekspresji ich pri-mikroRNA. Oprócz budowy genów, stosując technikę RT-qPCR zbadaliśmy poziomy ekspresji pierwotnych transkryptów mikroRNA - pri-mikroRNA w pięciu fazach rozwojowych jęczmienia. Przeanalizowaliśmy formy splicingowe oraz poziomy dojrzałych cząsteczek mikroRNA. W publikacji w **Acta Biochimica Polonica** skupiłem się zaś na różnicach w poziomach dojrzałych cząsteczek mikroRNA w pięciu fazach rozwojowych jęczmienia. Szczegółowe analizy poziomu dojrzałych cząsteczek mikroRNA w poszczególnych fazach rozwojowych przyniosły interesujące wyniki. Zaobserwowałem, że dwie formy izomiR mikroRNA156 zachowują się odmiennie w czasie rozwoju jęczmienia. I tak: dla 5'U mikroRNA156-5p [20 nt] obniża się poziom ekspresji wraz ze wzrostem jęczmienia, zaś poziom 5' UU-mikroRNA156-5p [21 nt] wzrasta wraz ze wzrostem jęczmienia. Udało mi się także wyznaczyć różne docelowe mRNA, które mogą być rozpoznawane przez te dwie formy izomiR. Wyniki moich badań zostały również wykorzystane do konstrukcji platformy mirEX²⁸. Można na niej prześledzić poziom ekspresji zarówno pierwotnych transkryptów pri-mikroRNA jak i dojrzałych cząsteczek mikroRNA. Wyniki tej pracy zostały umieszczone w pracy w **BMC Plant Biology** (Zielezinski et al., 2015). Jestem jednym z głównych autorów tej publikacji. Moje zainteresowanie cząsteczkami mikroRNA znalazło odzwierciedlenie również w publikacji zatytułowanej „The liverwort *Pellia endiviifolia* shares microtranscriptomic traits that are common to green algae and land plants” opublikowanej w **New Phytologist** (Alaba et al., 2015). W pracy tej opisaliśmy trzy mikroRNA, które występują zarówno u wątrobowca *Pellia endiviifolia* jak i u zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. Równocześnie brak wspomnianych trzech mikroRNA u pozostałych dotąd przebadanych roślin lądowych wskazuje na wątrobowce, jako pierwsze rośliny lądowe, stadium przejściowe między glonami a roślinami naczyniowymi. Moje

⁸. <http://www.combio.pl/mirex2>

zainteresowania wpływem stresów abiotycznych na ekspresję mikroRNA u roślin znalazły także odzwierciedlenie w trzech publikacjach (Kruszka et al., 2014; Barciszewska-Pacak et al., 2015; Swida-Barteczka et al., 2016a). W publikacji z **Journal of Experimental Botany** opisaliśmy wpływ wysokiej temperatury na ekspresję prekursorów pri-mikroRNA oraz poziom docelowych mRNA jęczmienia (Kruszka et al., 2014). Badania nad wpływem niedoboru wody na ekspresję genów mikroRNA zostały opublikowane w czasopiśmie **Acta Biochimica Polonica** (Swida-Barteczka et al., 2016). Wpływ stresów abiotycznych na ekspresję pri- i mikroRNA u *Arabidopsis* został z kolei opisany w publikacji we **Frontiers in Plant Science** (Barciszewska-Pacak et al., 2015). Stres wysokiej temperatury wpływa również na ekspresję innych niewymienionych w publikacji **Journal of Experimental Botany** genów mikroRNA. Między innymi wykazałem również obecność genu mikroRNA444.1 w jęczmieniu, którego ekspresja jest specyficznie indukowana w stresie wysokiej temperatury. Prowadzi to do podwyższenia poziomu dojrzałego mikroRNA444.1 i obniżenia ekspresji rozpoznawanego, docelowego mRNA kodującego czynnik transkrypcyjny *MADS57*. Obecnie wykonuję kolejne analizy, w tym badania poziomu giberelin, aby określić elementy ścieżki regulowanej przez mikroRNA444.1 w stresie wysokiej temperatury.

Podsumowując, mój dorobek naukowy po doktoracie poza pracami, które weszły w skład osiągnięcia naukowego obejmuje **20 prac**, w tym 13 prac eksperymentalnych i 7 prac przeglądowych bądź rozdziałów w monografiach. Ich sumaryczny współczynnik wpływu IF wynosi **41,903**, a liczba punktów **MNiSW** wynosi **422**.

Działalność dydaktyczno-organizacyjna

Jako pracownik Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu dużą część pracy przeznaczyłem i wciąż przeznaczam na działalność dydaktyczną i organizacyjną. Prowadziłem ćwiczenia dla studentów Biologii i Biotechnologii m.in. z Biochemii kwasów nukleinowych i białek, Genetyki molekularnej. Byłem autorem koncepcji i koordynatorem wprowadzenia nowego przedmiotu „**Methodology of Experimental Work**” dla studentów II stopnia Biotechnologii w języku angielskim. Przedmiot został przygotowany w ramach projektu „UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości. Wzrost potencjału dydaktycznego Uniwersytetu im. A. Mickiewicza poprzez proinnowacyjne kształcenie w języku angielskim, interdyscyplinarność, e-learning, inwestycje w kadry” realizowanego w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Byłem organizatorem i prowadzącym kurs dla studentów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu zatytułowany „Wykorzystanie techniki real-time PCR oraz innych wysokoprzepustowych metod w biologii molekularnej oraz diagnostyce molekularnej”. W chwili obecnej prowadzę zajęcia dotyczące wykorzystania techniki Real-time PCR zarówno dla studentów jak i doktorantów w ramach modułów do wyboru. Byłem promotorem 13 prac licencjackich oraz sprawowałem opiekę nad studentami wykonującymi prace magisterskie. Byłem także współorganizatorem i prowadzącym zajęcia dla potencjalnych studentów Wydziału Biologii UAM w trakcie Otwartych Drzwi w 2005 (Poznań, 9 stycznia 2005). Wykonałem liczne recenzje dla czasopism naukowych w tym *Acta Biochimica Polonica*, *BMC Genomics*, *Frontiers in Plant Science*, *SpringerPlus*, *Trees*. Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz pełnię funkcję reprezentanta

pracowników naukowych niebędących pracownikami samodzielnymi w trakcie posiedzeń Rady Wydziału UAM w Poznaniu.

Literatura

- Alaba, S., Piszczalka, P., Pietrykowska, H., Pacak, A.M., Sierocka, I., Nuc, P.W., Singh, K., Plewka, P., Sulkowska, A., Jarmolowski, A., Karlowski, W.M., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2015). The liverwort *Pellia endiviifolia* shares microtranscriptomic traits that are common to green algae and land plants. *New Phytol* 206, 352-367. doi: 10.1111/nph.13220.
- Alejska, M., Figlerowicz, M., Malinowska, N., Urbanowicz, A., and Figlerowicz, M. (2005). A universal BMV-based RNA recombination system--how to search for general rules in RNA recombination. *Nucleic Acids Res* 33, e105. doi: 10.1093/nar/gni106.
- Barciszewska-Pacak, M., Grabowska, B., Wojciechowicz, J., Pacak, A., and Figlerowicz, M. (2005). 21 Virus-Induced RNA Silencing in Plants. *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, 323.
- Barciszewska-Pacak, M., Jarmolowski, A., and Pacak, A. (2016). Virus-Induced Gene Silencing for Gene Function Studies in Barley. *Methods Mol Biol* 1398, 293-308. doi: 10.1007/978-1-4939-3356-3_22.
- Barciszewska-Pacak, M., Milanowska, K., Knop, K., Bielewicz, D., Nuc, P., Plewka, P., Pacak, A.M., Vazquez, F., Karlowski, W., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2015). Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 6, 410. doi: 10.3389/fpls.2015.00410.
- Barciszewska-Pacak, M., and Pacak, A. (2014). Wirus pasiastej mozaiki jęczmienia BSMV jako wszechstronne narzędzie genomiki funkcjonalnej. *Na Pograniczu Chemii i Biologii XXXII*, 241-256.
- Berg, M.J., Tymoczko, L.J., and Stryer, L. (2009). Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN VI wydanie, 284, 416.
- Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* 33, 41-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- Dakhiya, Y., Hussien, D., Fridman, E., Kiflawi, M., and Green, R. (2017). Correlations between Circadian Rhythms and Growth in Challenging Environments. *Plant Physiology* 173, 1724-1734. doi: 10.1104/pp.17.00057.
- Delhaize, E., and Randall, P.J. (1995). Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 107, 207-213.
- Gąsiorowski, H. (1997). *Jęczmień: chemia i technologia:[praca zbiorowa]*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I.E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K., and Lacomme, C. (2005). Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol* 138, 2155-2164. doi: 10.1104/pp.105.062810.

- Holme, I.B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M., and Holm, P.B. (2006). Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep* 25, 1325-1335. doi: 10.1007/s00299-006-0188-4.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., and Pogue, G.P. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J* 30, 315-327.
- Huang, T.K., Han, C.L., Lin, S.I., Chen, Y.J., Tsai, Y.C., Chen, Y.R., Chen, J.W., Lin, W.Y., Chen, P.M., Liu, T.Y., Chen, Y.S., Sun, C.M., and Chiou, T.J. (2013). Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 25, 4044-4060. doi: 10.1105/tpc.113.115998.
- International Barley Genome Sequencing, C., Mayer, K.F., Waugh, R., Brown, J.W., Schulman, A., Langridge, P., Platzer, M., Fincher, G.B., Muehlbauer, G.J., Sato, K., Close, T.J., Wise, R.P., and Stein, N. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711-716. doi: 10.1038/nature11543.
- Jakubowicz, M., and Pacak, A. (2004). Relationships between ACC synthase isozymes calculated using phenetic data. The catalytical and evolutionary aspects. *Acta Physiologiae Plantarum* 26, 5-27.
- Jankowiak-Siuda, K., Pacak, A., Odrzykoski, I., Wyatt, R., and Szweykowska-Kulińska, Z. (2008). Organellar inheritance in the allopolyploid moss *Plagiomnium curvatulum*. *Taxon* 57, 145-152.
- Jankowiak, K., Lesicka, J., Pacak, A., Rybarczyk, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2004). A comparison of group II introns of plastid tRNALysUUU genes encoding maturase protein. *Cell Mol Biol Lett* 9, 239-251.
- Jankowiak, K., Rybarczyk, A., Wyatt, R., Odrzykoski, I., Pacak, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2005). Organellar inheritance in the allopolyploid moss *Rhizomnium pseudopunctatum*. *Taxon* 54, 383-388.
- Jankowicz-Cieslak, J., Tai, T.H., Kumlehn, J., Till, B.J: Editors (2017). Biotechnologies for Plant Mutation Breeding. *Springer Open*. doi: 10.1007/978-3-319-45021-6.
- Johnston, A. (2000). Soil and plant phosphate. *International Fertilizer Industry Association*.
- Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Nuc, P., Alaba, S., Wroblewska, Z., Karlowski, W., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2014). Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *J Exp Bot* 65, 6123-6135. doi: 10.1093/jxb/eru353.
- Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Stefaniak, A.K., Kaja, E., Sierocka, I., Karlowski, W., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2013). Developmentally regulated expression and complex processing of barley pri-microRNAs. *BMC Genomics* 14, 34. doi: 10.1186/1471-2164-14-34.
- Liu, T.Y., Huang, T.K., Tseng, C.Y., Lai, Y.S., Lin, S.I., Lin, W.Y., Chen, J.W., and Chiou, T.J. (2012). PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 2168-2183. doi: 10.1105/tpc.112.096636.
- Nilsson, L., Muller, R., and Nielsen, T.H. (2007). Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* 30, 1499-1512. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01734.x.

- Pacak, A., and Barciszewska-Pacak, M. (2003). Zależne od RNA potranskrypcyjne i transkrypcyjne wyciszanie genów u roślin. *Biotechnologia*.
- Pacak, A., Barciszewska-Pacak, M., Swida-Barteczka, A., Kruszka, K., Segal, P., Milanowska, K., Jakobsen, I., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2016a). Heat Stress Affects Pi-related Genes Expression and Inorganic Phosphate Deposition/Accumulation in Barley. *Front Plant Sci* 7, 926. doi: 10.3389/fpls.2016.00926.
- Pacak, A., Geisler, K., Jorgensen, B., Barciszewska-Pacak, M., Nilsson, L., Nielsen, T.H., Johansen, E., Gronlund, M., Jakobsen, I., and Albrechtsen, M. (2010a). Investigations of barley stripe mosaic virus as a gene silencing vector in barley roots and in *Brachypodium distachyon* and oat. *Plant Methods* 6, 26. doi: 10.1186/1746-4811-6-26.
- Pacak, A., Kruszka, K., Swida-Barteczka, A., Nuc, P., Karlowski, W., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2016b). Developmental changes in barley microRNA expression profiles coupled with miRNA target analysis. *Acta Biochim Pol* 63, 799-809. doi: 10.18388/abp.2016_1347.
- Pacak, A., Strozycycki, P.M., Barciszewska-Pacak, M., Alejska, M., Lacomme, C., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., and Figlerowicz, M. (2010b). The brome mosaic virus-based recombination vector triggers a limited gene silencing response depending on the orientation of the inserted sequence. *Arch Virol* 155, 169-179. doi: 10.1007/s00705-009-0556-9.
- Pacak, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2003). Organellar inheritance in liverworts: an example of *Pellia borealis*. *J Mol Evol* 56, 11-17. doi: 10.1007/s00239-002-2375-4.
- Park, B.S., Seo, J.S., and Chua, N.H. (2014). NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of Arabidopsis phosphate homeostasis. *Plant Cell* 26, 454-464. doi: 10.1105/tpc.113.120311.
- Scott, P. (2008). *Physiology and behaviour of plants*. John Wiley & Sons.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55, 555-590. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønland, M., and Smith, F.A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology* 156, 1050-1057.
- Sobkowiak, L., Bielewicz, D., Malecka, E.M., Jakobsen, I., Albrechtsen, M., Szweykowska-Kulinska, Z., and Pacak, A. (2012). The Role of the P1BS Element Containing Promoter-Driven Genes in Pi Transport and Homeostasis in Plants. *Front Plant Sci* 3, 58. doi: 10.3389/fpls.2012.00058.
- Sobkowiak, L., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2007). Fizyczne, chemiczne i genetyczne metody mutagenyzy roślin. *Biotechnologia* 4, 157-169.
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2016). Posttranscriptional

- coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. doi: 10.1002/wrna.1403.
- Swida-Barteczka, A., Kruszka, K., Grabowska, A., Pacak, A., Jarmolowski, A., Kurowska, M., Szarejko, I., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2016). Barley primary microRNA expression pattern is affected by soil water availability. *Acta Biochim Pol* 63, 817-824. doi: 10.18388/abp.2016_1352.
- Tai, A.P., Martin, M.V., and Heald, C.L. (2014). Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. *Nature Climate Change* 4, 817-821.
- Taube, M., Pieńkowska, J.R., Jarmolowski, A., and Kozak, M. (2014). Low-resolution structure of the full-length barley (*Hordeum vulgare*) SGT1 protein in solution, obtained using small-angle X-ray scattering. *PloS one* 9, e93313.
- Ullrich, S.E. (2011). Significance, adaptation, production, and trade of barley. *Barley: production, improvement, and uses*. Wiley-Blackwell, 3-13.
- Zielezinski, A., Dolata, J., Alaba, S., Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Knop, K., Stepień, A., Bielewicz, D., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Sobkowiak, L., Lakomiak, A., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., and Karłowski, W.M. (2015). mirEX 2.0 - an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC Plant Biol* 15, 144. doi: 10.1186/s12870-015-0533-2.

Pacak Andrzej