

# Autoreferat

dr Magdalena Achrem

Katedra Biologii Molekularnej i Cytologii  
Instytut Badań nad Bioróżnorodnością  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Szczeciński

Szczecin 2019

**1. Imię i nazwisko**

Magdalena Achrem

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

Dyplom doktora nauk biologicznych w specjalności biologii. Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Biologii), Uniwersytet Szczeciński; luty 2006.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Studia kariologiczne rodzaju *Secale*.

Promotor: prof. dr hab. Stanisława Rogalska

Recenzenci: prof. dr hab. Maria Krzakowa

dr hab. Barbara Apolinarska

Dyplom ukończenia studiów wyższych magisterskich na kierunku Biologia i Ochrona Środowiska, specjalność – Diagnostyka laboratoryjna, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Biologii), Uniwersytet Szczeciński w Szczecinie; czerwiec 1998.

Tytuł pracy magisterskiej: Charakterystyka molekularna gatunków bliźniaczych *Pellia endiviifolia* z obszaru Polski.

Promotor: prof. dr hab. Roman Zieliński

Recenzent: prof. dr hab. Stanisława Rogalska

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

1998-2006 asystent w Katedrze Biologii Komórki, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Biologii), Uniwersytet Szczeciński

od 2006 adiunkt Katedrze Biologii Komórki (obecnie Katedrze Biologii Molekularnej i Cytologii), Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Biologii), Uniwersytet Szczeciński

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

#### 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

##### **Analiza zróżnicowania genetycznego sekwencji powtarzalnych żyta i możliwości jej wykorzystania w ustalaniu tożsamości odmian i hodowli tego zboża**

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji z listy JCR (posiadających Impact Factor) wydanych w latach 2009-2017.

#### 4.2 Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

##### A. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **MAGDALENA ACHREM, ANNA KALINKA, STANISŁAWA ROGALSKA.** 2014. Assessment of genetic relationships among *Secale* taxa by using ISSR and IRAP markers and the chromosomal distribution of the AAC microsatellite sequence. Turkish Journal of Botany, 38(2):213-225. DOI:10.3906/bot-1207-26.

IF<sub>2014/2015</sub> 1,178 lista MNiSW: 10 pkt

IF<sub>5-letni</sub> 1,098

2. **MAGDALENA ACHREM, ANNA KALINKA, STANISŁAWA ROGALSKA.** 2010. Possible ancient origin of heterochromatic JNK sequences in chromosomes 2R of *Secale vavilovii* Grossh. Journal of Applied Genetic, 51 (1):1-8. DOI: 10.1007/BF03195704.

IF<sub>2010</sub> 1,482 lista MNiSW: 20 pkt

IF<sub>5-letni</sub> 1.925 pkt

3. **ANNA KALINKA, MAGDALENA ACHREM.** 2015. Analysis of the flanking sequences of the heterochromatic JNK region in *Secale vavilovii* Grossh. Chromosomes. Biologia Plantarum, 59 (4):637-644. DOI: 10.1007/s10535-015-0531-0.

IF<sub>2015</sub> 1,665 lista MNiSW: 25 pkt

IF<sub>5-letni</sub> 1,511

4. **MAGDALENA ACHREM, ANNA KALINKA.** 2017. Tracking of intercalary DNA sequences integrated into tandem repeat arrays in *Secale vavilovii*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 86(2):3548. DOI: 10.5586 /asbp.3548.

IF<sub>2017</sub> 0,876 lista MNiSW: 25 pkt

IF<sub>5-letni</sub> 1,321

5. **ANNA KALINKA, MAGDALENA ACHREM, PAULINA POTER.** 2017. The DNA methylation level against the background of the genome size and t-heterochromatin content in some species of the genus *Secale* L. PeerJ, 5:e2889. DOI: 10.7717/peerj.2889.

IF<sub>2017</sub> 2,118 lista MNiSW: 35 pkt

IF<sub>5-letni</sub> 2,469

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, stanowi cykl pięciu oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w latach 2010-2017 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny IF dla cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe to 7,319, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW to 115. W trzech z pięciu publikacjach jestem autorem pierwszym, w dwóch drugim, we wszystkich jestem autorem korespondencyjnym.

W dalszej części autoreferatu prace wchodzące w skład przedstawionego do oceny cyklu są przywoływane jako **P.1-P.5**.

Cytowana w rozdziale 4 literatura uzupełniająca jest załączona w postaci listy na jego końcu.

- B.** Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem osiągnięć naukowo-badawczych

Żyto (*Secale* sp.) jest ważnym gospodarczo zbożem powszechnie uprawianym w Europie Wschodniej i Północnej. Gatunek ten cechuje się wysoką odpornością na stresy biotyczne i abiotyczne oraz efektywnym wykorzystaniem składników pokarmowych z podłoża. Posiada wiele zalet takich jak zdolność do wzrostu na słabych glebach, mrozoodporność i tolerancja na suszę (Targońska i wsp. 2013, Skuza i wsp. 2019). Ze

względu na wysoką zawartość błonnika pokarmowego odznacza się dobrymi walorami pokarmowymi. Mimo wielu pozytywnych cech, w ostatnich latach obserwuje się zmniejszenie powierzchni jego uprawy. Mogą mieć na to wpływ: wzrost areału upraw pszenżyta wypierającego żyto z gleb żytnich, jak również zmniejszenie postępu w jego hodowli w porównaniu z innymi zbożami. Silna presja selekcyjna stosowana w hodowli spowodowała zubożenie różnorodności genetycznej prowadzące do unifikacji odmian (Wiśniewska, 2010). Jednym ze sposobów zwiększania zróżnicowania genetycznego rodzaju jest wykorzystywanie dzikich gatunków jako donorów ważnych, z agronomicznego punktu widzenia, genów (Mackiewicz i Broda 2004). W projektach hodowlanych zainteresowaniem cieszyć się mogą geny zwiększające spektrum odporności rośliny na choroby czy szkodniki (Mackiewicz i Broda 2004, Targońska i wsp. 2013).

Zasadniczym celem hodowli zbóż jest poprawa cech funkcjonalnych odmian, przy zachowaniu na właściwym poziomie różnorodności genetycznej między populacjami lub w obrębie gatunku (Ma i wsp. 2004, Broda i wsp. 2016). Rezerwuarem korzystnych cech, które z powodzeniem można wykorzystać w hodowli roślin są dzikie gatunki spokrewnione z uprawnymi. W przypadku żyta w zależności od stosowanych kryteriów dotyczących definicji gatunku, rodzaj *Secale* obejmuje żyto uprawne oraz od 3 do 11 dzikich gatunków, wśród których wyróżnia się gatunki jednoroczne oraz wieloletnie, a także samo- i obcopolne. Rozróżnienie taksonów żyta było trudne ze względu na brak znaczących różnic między nimi. Problemy z taksonomią tego rodzaju wynikają również z nieporozumień dotyczących rozgraniczenia gatunków i taksonów wewnątrzgatunkowych oraz braku barier krzyżowalności między gatunkami i podgatunkami (Maraci i wsp. 2018). Uzyskanie międzygatunkowych mieszańców w rodzaju *Secale* jest możliwe między wszystkimi taksonami żyta. Wyjątkiem jest gatunek *S. sylvestre*, gdyż jego krzyżowanie z innymi gatunkami rzadko kiedy pozwala uzyskać płodne potomstwo (Kush 1962, Kush i Stebbins 1961, Schreiber i wsp. 2016). Dzięki krzyżowaniu międzygatunkowemu można otrzymać genotypy cechujące się wyższą odpornością na choroby i szkodniki, lepsze jakościowo i szybciej przystosowujące się do zmiennych warunków środowiska (Dostatny i Kloc 2018). Wykazano, że skuteczność krzyżowania i jednocześnie pozyskiwania ziarniaków z mieszańców oddalonych między odmianami i gatunkami dzikimi jest bardzo niska. Dlatego też odpowiedni dobór materiału do krzyżowań oddalonych może mieć decydujące znaczenie dla powodzenia programów hodowlanych.

Systemy markerów molekularnych, w tym: RAPD, ISSR, IRAP, SSR zastosowane we wstępnych badaniach nad genetyczną różnorodnością potencjalnych komponentów do krzyżowań umożliwiają typowanie właściwych kombinacji (Loarce i wsp. 1996, Ma i wsp. 2004). Można je wykorzystać również jako systemy ułatwiające wybór właściwych genotypów w oparciu o obecność unikatowych sekwencji DNA powiązanych z ważną, z agronomicznego punktu widzenia, właściwością rośliny. (Li i wsp. 2011, Miedaner i wsp. 2012). W tym obszarze badań (prac hodowlanych) ważne jest poznawanie i eksploracja możliwości jakie dają skринingowe techniki badawcze. Ważne jest również badanie sekwencji *per se*, ich zmienności, dynamiki, źródeł i sensu zmian po to, aby móc je lepiej wykorzystywać w pracach nad określaniem bioróżnorodności.

W pracy (**P-1**) zastosowano systemy markerowe ISSR (ang. Inter Simple Sequence Repeat) badające polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych oraz IRAP (ang. Inter Retrotransposons Amplified Polymorphism) określające polimorfizm sekwencji znajdujących się między retrotranspozonami. Dodatkowo, za pomocą metody hybrydyzacji *in situ*, badano rozmieszczenie motywu mikrosatelitarnego AAC w chromosomach żyta. W badaniach wykorzystano siedem taksonów żyta: *Secale cereale* L. cv. Dańkowskie Zielonkawe, *Secale cereale* ssp. *afghanicum* Vavilov, *Secale cereale* ssp. *segetale* Zhuk., *Secale sylvestre* Host., *Secale strictum* ssp. *strictum* Presl., *Secale strictum* ssp. *africanum* Stapf, *Secale strictum* ssp. *kuprijanovii* Grossh. oraz linie *Secale vavilovii* Grossh. 225 ż.cz., 116 i 121. W pracy (**P-1**) oznaczono współczynnik PIC (zawartość informacji polimorficznej - Polymorphic Information Content), indeks efektywności metody (EMR), indeks zróżnicowania (DI) oraz indeks systemu markerowego (MI) jako iloczyn EMR i DI. Wysokie wartości w/w współczynników, szczególnie MI dla ISSR 5,097 i dla IRAP 4,376, potwierdzają, że zarówno markery ISSR, jak i IRAP są użyteczne w ocenie zróżnicowania międzygatunkowego w rodzaju *Secale*. Jest to bardzo ważne, ponieważ znajdują one zastosowanie do określania zróżnicowania genetycznego poniżej szczebla gatunku, są szeroko stosowane u odmian i linii zbóż (Stojałowski i wsp. 2004, Szućko i Rogalska 2015, Kalinka i Achrem 2018). Jest to kolejny dowód na występowanie dużego podobieństwa między gatunkami żyta.

Uzyskane wyniki, (analiza UPGMA oraz współczynnik podobieństwa Dice'a), zarówno dla IRAP i ISSR, dowodzą, iż wśród badanych taksonów żyta najbardziej podobne okazały się *S. cereale* i *S. vavilovii* 225 żcz. (81,5% podobieństwa). Najmniejszym podobieństwem w stosunku do wszystkich badanych taksonów żyta wynoszącym od 36,6%

do 50,9% charakteryzowały się gatunki *S. strictum* ssp. *strictum* oraz *S. sylvestre*. Analizując dendrogram można wyróżnić na nim trzy grupy podobieństwa. Do pierwszej należą *S. strictum* ssp. *strictum* oraz *S. sylvestre*, jest to grupa najbardziej oddalona od pozostałych badanych taksonów, przy czym podobieństwo między tymi gatunkami wynosi powyżej 85%. Jednocześnie *S. sylvestre* znacznie różni się od innych gatunków rozmieszczeniem i liczbą bloków sekwencji AAC, również od *S. strictum* ssp. *strictum*. Drugi klaster stanowią *S. strictum* ssp. *kuprijanovii* oraz *S. strictum* ssp. *africanum* między którymi podobieństwo wynosiło 75%. Pozostałe taksony tworzą jedno duże zgrupowanie, w skład którego wchodzi analizowane linie *S. vavilovii*, *S. cereale* oraz jego podgatunki. Wyniki z analiz IRAP i ISSR potwierdzono analizując dystrybucję sekwencji AAC w badanych taksonach żyta. Najbardziej podobny wzór rozmieszczenia sekwencji wykazywały gatunki: *S. vavilovii* oraz *S. cereale* i jego podgatunki (**P-1**). To wysokie podobieństwo między odmianą *S. cereale* cv. Dańkowskie Zielonkawe i dzikimi podgatunkami *S. cereale* oraz *S. vavilovii* wskazuje na istnienie silnej zależności filogenetycznej między nimi. Można się więc spodziewać wysokiej skuteczności krzyżowania i tworzenia materiału dla nowych odmian hodowlanych o pożądanym cechach. Na przykład do hodowli odpornościowej na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną można wykorzystać takie podgatunki *S. cereale* jak: *S. cereale* ssp. *afghanicum*, *S. cereale* ssp. *segetale* i *S. cereale* ssp. *ancestrale*.

Analiza sekwencji powtarzalnych jest niezbędna dla zrozumienia organizacji i funkcjonowania genomów zbóż. Dotyczy to w szczególności gatunków żyta, u którego sekwencje powtarzalne stanowią ponad 90% genomu (Flavell i wsp. 1977), z czego z kolei ważną część stanowią retrotranspozony – ważne źródło zmienności dla regulacji allelicznych odpowiedzi genów na stres abiotyczny (Makarevitch i wsp. 2015). Prowadzone przeze mnie badania z udziałem różnych gatunków rodzaju *Secale* ukazały wpływ niekodujących sekwencji powtarzalnych na żywotność roślin. Zaobserwowano, że niektóre rośliny gatunku *S. vavilovii* miały obniżoną płodność i żywotność. Nie stwierdzono, aby były one zainfekowane jakąkolwiek chorobą ani zaatakowane przez szkodniki. Obserwacje cytogenetyczne wykazały obecność dodatkowego prążka heterochromatynowego na długim ramieniu jednego lub dwóch chromosomów pary 2R (Nagaki i wsp. 1999, Rogalska i wsp. 2001). Wykazano, że dodatkową heterochromatynę budują sekwencje rodziny *JNK*. Region *JNK* zbudowany jest z wysoce zmetylowanych, tandemowych powtórzeń o długości 1200 pz. Są one powtórzone 4000 razy w tym miejscu (Nagaki i wsp. 1999, Rogalska i wsp. 2002a).

W roślinach bez dodatkowego prążka w chromosomach 2R, sekwencja *JNK* jest rozproszona w całym genomie, gdzie występuje w 20-krotnych powtórzeniach. Interesującym jest fakt, że taki prążek obserwowano także w *S. cereale* (Nagaki i wsp. 1999). Obserwacja procesu mejozy w roślinach, u których zaobserwowano dodatkową heterochromatynę, nie wykazała żadnych zaburzeń w koniugacji chromosomów (Rogalska i wsp. 2002b). Okazało się, że trudno uzyskać ziarniaki z roślin, które miały dodatkowy prążek heterochromatynowy na obu chromosomach 2R. Rośliny te były słabe, pozbawione wigoru, o silnie zredukowanej płodności i najczęściej szybko zamierały. Obserwowane zmiany w niektórych roślinach *S. vavilovii*, związane z sekwencją *JNK*, której występowanie wiązało się z obniżeniem płodności skłoniło do bardziej szczegółowych badań genomu, w celu wyjaśnienia przyczyny tych zmian.

Oprócz występowania dodatkowego prążka heterochromatynowego, cechą charakterystyczną analizowanych linii *S. vavilovii*, była niska zawartość pentozanów oraz mozaikowe zabarwienie pylników i ziarniaków. Ze względu na fakt, iż występowanie mozaikowego fenotypu może być spowodowane działalnością genetycznych elementów ruchomych przeprowadzono hybrydyzację *in situ* z sondą zaprojektowaną do sekwencji genu transpozazy transpozonów systemu *Ac* kukurydzy (Achrem i wsp. 2005). Nie wykazano jednak sygnału hybrydyzacyjnego w regionie *JNK*. Następnie by stwierdzić obecność sekwencji retrotranspozonowych w dodatkowym prążku heterochromatynowym przeprowadzono lokalizację retrotranspozonów z grupy *Ty1-copia* i *Ty3-gypsy* w chromosomach linii *S. vavilovii*. Używając jako sondy molekularnej, sekwencji odpowiadającej *RT* (*Reverse Transcriptase*) retrotranspozonów z rodzin *Ty1-copia* i *Ty3-gypsy*, z wykorzystaniem metody FISH, uzyskano jedynie oczekiwane charakterystyczne, rozmieszczenie tych retrotranspozonów wzdłuż wszystkich chromosomów z pominięciem dodatkowego prążka (**P-2**). Nie świadczy to o braku elementów ruchomych w tym miejscu, ponieważ mogą występować formy pozbawione obszaru kodującego odwrotną transkryptazę czy transpozazę. W celu poznania pochodzenia heterochromatynowej sekwencji *JNK* przeprowadzono analizę za pomocą algorytmu BLAST. Stwierdzono podobieństwo sekwencji *JNK* do sekwencji 5S rDNA 17 gatunków rodzaju *Hordeum*, które wahało się od 68% do 97% w zależności od gatunku. Za pomocą analizy FISH z sondą molekularną zaprojektowaną do sekwencji genu 5S rRNA *S. cereale*, zlokalizowano większe sygnały hybrydyzacyjne w chromosomach 1RS oraz 5RS i mniejszy sygnał w obszarze dodatkowego prążka na



chromosomie 2RL (**P-2**). Geny 5S rRNA mogą być przenoszone w genomie czego skutkiem może być powstawanie pseudogenów. Chociaż sam mechanizm rozprzestrzeniania się tych genów wciąż nie jest do końca wyjaśniony. Pseudogeny są konsekwencją duplikacji genów, które mogą powstawać przez przeniesienie lub poprzez powielanie genomowego DNA, większość z nich powstaje w wyniku utraty części sekwencji kodującej. Oznacza to, że zidentyfikowany w badaniach obszar nietypowego prążka heterochromatynowego może stanowić również zespół wadliwych genów oraz zmodyfikowanych fragmentów, które gromadzone są w jednym miejscu w chromosomie 2RL (**P-2**).

Sekwencja *JNK* w liniach *S. vavilovii* gromadzona jest w genomie w określonym regionie pary chromosomów 2R. Nie poznano dokładnie mechanizmu kumulacji tak licznych sekwencji w jednym tylko miejscu w genomie, jednakże z obserwacji wynika, że mogły one mieć wpływ na zmniejszenie żywotności. W ramach realizowanego przeze mnie projektu badawczego, finansowanego przez MNiSW (N N310 436038), podjęto się rozwiązania problemu czy obniżenie wigoru roślin *S. vavilovii* wiąże się z występowaniem heterochromatynowego bloku sekwencji *JNK*, który wpływa wyciszająco na sąsiadujące sekwencje. By potwierdzić to założenie podjęto badania dotyczące poznania obszarów flankujących sekwencję *JNK* (**P-3**). Aby poznać sekwencje flankujące znany obszar wykorzystuje się klasyczną metodę przeszukiwania bibliotek za pomocą sond. Jednakże przygotowanie biblioteki i jej przeszukiwanie jest czasochłonne. Dlatego też zastosowano szybszą i bardziej wydajną metodę opartą na PCR, taką jak technika genome walking. Dodatkowo by potwierdzić występowanie flankujących sekwencji przy dodatkowym prążku heterochromatynowym zastosowano metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (**P-3**). Zidentyfikowana metodą genome walking sekwencja wykazywała najwyższy stopień podobieństwa (około 90%) do dwóch klonów sekwencji powtórzonej *R173-2* oraz *R-173-3*, która jest charakterystyczna dla rodzaju *Secale*. Analiza FISH wykazała, że w liniach *S. vavilovii* sekwencja *R173-2/173-3* występuje tylko w tym miejscu w chromosomie, gdzie zlokalizowano nietypową heterochromatynę. Już pierwsze uzyskane wyniki stanowiły wartościowe źródło informacji, umożliwiających nakreślenie i realizację dalszych etapów badań. Ukazano bowiem, że sekwencja *JNK* sąsiaduje z sekwencją powtarzalną *R173*, która nie koduje żadnego poznanego jak dotąd białka, więc ewentualny wpływ heterochromatyny na ten obszar nie powodowałby zmian w żywotności osobników posiadających dodatkowy prążek zbudowany z sekwencji rodziny *JNK*. Obszar ten bezpośrednio graniczy z niekodującą

sekwencją powtarzalną i znajduje się po obu jej stronach przez co istnieje możliwość, że pełni funkcję izolatora, który zapobiegania rozprzestrzenianiu się heterochromatyny na przyległe geny. Takie bariery oddzielające heterochromatynę od obszarów euchromatynowych występują powszechnie zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym. Można też przyjąć, że to sekwencja *JNK* pełni taką funkcję wobec sekwencji *R173*. Potwierdzić to może fakt, iż zarówno w sekwencji powtarzalnej *R173*, jak i *JNK* występuje motyw CTCF (CCCTC-binding factor). Odgrywa on rolę zarówno jako pozytywny lub negatywny regulator transkrypcji (Filippova 2008, Zlatanova i Caiafa 2009).

Badania, które wykonano i wnioski przedstawione w artykule **P-3** pokazały, iż sekwencja *JNK* może przylegać także do innej sekwencji, ale tylko wówczas kiedy wstępuje poza głównym *locus* w chromosomie 2RL. To spowodowało konieczność modyfikacji przyjętej hipotezy, iż sekwencja *JNK* jest wstawiana do specyficznych sekwencji w jednym miejscu w genomie. Istnieje bowiem możliwość, że te inne *loci JNK* pojawiają się w wyniku działania genetycznego elementu ruchomego. Te wyniki wskazują na to, że sekwencja *JNK* lub jej fragment może być przenoszona w procesie retrotranspozycji. Obecność sekwencji *JNK*, wykazujących duże podobieństwo do sekwencji 5S rRNA (**P-2**), może świadczyć o intensywnej dynamice tych powtarzających się elementów w genomie żyta (**P-3**).

W oparciu o otrzymane wyniki badań (**P-3**) zrealizowałam kolejne zadania badawcze, które bardziej szczegółowo pokazało strukturę dodatkowego prążka heterochromatynowego. Podczas analizy sekwencji flankujących, oprócz produktów oczekiwanej długości, które stanowiły sąsiadujące sekwencje *JNK*, zamplifikowano sekwencje o innych długościach, które znajdują się pomiędzy sekwencjami z rodziny *JNK* (**P-4**). Wyniki te wskazują na niejednorodność struktury badanego regionu. Jednakże zaskakujące było to, że zidentyfikowane sekwencje wykazywały podobieństwo do sekwencji charakterystycznych dla bardzo oddalonych ewolucyjnie organizmów. Analizy wykazały wysokie podobieństwo tych sekwencji do: genu 5-kinazy glutaminianu i domniemanej dehydrogenazy alkoholowej pierwotniaków z rodzaju *Leishmania*, do mRNA mitochondrialnego genu białka rybosomalnego S4 u roślin, do genu glikoproteiny (G) wirusa IHNV oraz do sekwencji powtarzalnej żyta i chromosomu 3B pszenicy (**P-4**). Analizując te sekwencje i sposób ich wstawienia łatwiej wytłumaczyć obecność sekwencji żytnich czy pszenicznych między powtarzalnymi blokami *JNK*. Wśród sekwencji występujących między blokami *JNK* zidentyfikowano fragment podobny do końcowej części pseudogenu transpozazy elementu

*Revolver-1*. Mogą one być wbudowywane i tracić swoją funkcję, przekształcać się w pseudogeny, które są lokalizowane również w bloku *JNK* badanych linii *S. vavilovii*. W obrębie bloku sekwencji *JNK* zidentyfikowano także sekwencję wykazującą bardzo wysokie podobieństwo do sekwencji mRNA mitochondrialnego białka rybosomalnego S4 u *Arabidopsis thaliana* biorącego udział w procesie translacji. Niektóre geny mitochondrialne mogą zostać przeniesione do genomu jądrowego u roślin. Po transferze geny te ulegają inaktywacji, co dalej prowadzi często do modyfikacji ich sekwencji. Sekwencje podobne do sekwencji mitochondrialnych znajdujące się w genomie jądrowym nazwano NUMTs (Nuclear mitochondrial pseudogenes) (Hazkani-Covo i wsp. 2010). Prawdopodobnie sekwencja wykazująca wysokie podobieństwo do sekwencji mRNA mitochondrialnego białka rybosomalnego S4 w *S. vavilovii*, podobna jest do genu takich gatunków roślin jak: *Arabidopsis thaliana*, *Brassica nigra*, *B. napus*, jest genem NUMT, który zmutował i został wstawiony w obszar heterochromatynowy. Trudniej wytłumaczyć dlaczego badane sekwencje wykazywały podobieństwo do fragmentu genu dehydrogenazy alkoholowej i 5-kinazy glutaminianu występujących u świdrowców z rodzaju *Leishmania*. Rodzina świdrowców (Trypanosomatidae) to pasożytnicze pierwotniaki infekujące zarówno zwierzęta, jak i rośliny, których wektorami są owady. Prawdopodobna może być hipoteza, że istniały świdrowce, które były pasożytami żyta i doszło do przeniesienia (horyzontalny transfer genów, HGT) pewnych sekwencji z genomu tych pierwotniaków do genomu rośliny (**P-4**).

Uzyskane wyniki (**P-2**, **P-3**, **P-4**) nie wskazały związku pomiędzy obniżeniem wigoru a zmianami w genomie *S. vavilovii*, ale pozwoliły poznać strukturę sekwencji powtarzalnych bloku *JNK*. Nasze badania wskazują na niezwykle złożoność tego regionu heterochromatyny oraz przybliżają mechanizm, który wytłumaczyłby w jaki sposób pomiędzy blokami sekwencji powtarzalnych z rodziny *JNK* zostały wstawione obce sekwencje. Można postawić hipotezę, że stanowią one fragmenty różnych genów lub pseudogeny. Aktywne pseudogeny mogą oddziaływać regulacyjnie na aktywność genów poprzez ncRNA (**P-3**).

Podsumowując powyższe, należy zauważyć, że poszerzenie wiedzy odnośnie heterochromatyny jest niedocenione zwłaszcza w świetle dzisiejszych badań, które pokazują, że sekwencje te są bogate w geny RNA pełniące znaczącą rolę w epigenetycznej regulacji ekspresji genów (Siomi i Siomi 2008). Badanie nieznanych czynników występujących w regionach sekwencji powtarzalnych jest również niezbędne, do poznania i zrozumienia

mechanizmów kontroli genomu oraz ekspresji fenotypowej (Tomita i wsp. 2011), co może mieć znaczenie w nowoczesnej hodowli roślin.

Genomy roślin zawierają podstawową informację genetyczną, która określa właściwości i zachowanie biologiczne gatunku, a zatem muszą być względnie stabilne. Dotychczas większość badań skupiała się na roli sekwencji DNA, i jej wpływie na oczekiwany fenotyp. Jednakże genom roślin może szybko i dynamicznie reagować na zmiany środowiskowe pokonując ograniczenia nakładane przez wysoce stabilną sekwencję DNA (Peng i Zhang 2009). Pod wpływem stresu środowiskowego mechanizmy epigenetyczne, m.in. metylacja DNA, mogą szybko i odwracalnie modyfikować epigenom indukując zmiany transkrypcji genów, które wpływają na pojawienie się nowych cech adaptacyjnych (Mirouze i Paszkowski 2011, Lanciano i Mirouze 2017). Umożliwiają także długoterminowe zmiany w ekspresji genów. Narażenie na czynnik pierwotny może aktywować gen lub zestaw genów i utrzymywać ten stan, co ułatwia szybszą reakcję na kolejne zmiany (Bruce i wsp. 2007). Badania wykazały, że metylacja sekwencji bogatych w GC działa jako centralny punkt koordynacji wielu mechanizmów epigenetycznych i zapewnia, wierne przekazywanie potomstwu modyfikacji epigenetycznych (Mathieu i wsp. 2007). Regulacje epigenetyczne są zaangażowane w ekspresję wielu genów o znaczeniu rolniczym, biorących również udział w procesach adaptacyjnych.

Opierając się na otrzymanych wynikach badań (**P-1**), stwierdzono, że konieczne jest poznawanie nie tylko zróżnicowania genetycznego taksonów żyta, ale także epigenetycznego. Gatunki z rodzaju *Secale* różnią się wielkością genomów, dlatego też można oczekiwać zróżnicowania poziomu metylacji DNA pomiędzy nimi. Celem kolejnych przeprowadzonych przeze mnie badań było ukazanie poziomu metylacji cytozyny w gatunkach żyta w powiązaniu z wielkością genomu i ilością heterochromatyny telomerycznej (**P-5**). Analizowano wyniki globalnej (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) i genomowej (MSAP - Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism) metylacji cytozyny w DNA w ośmiu taksonach żyta (podobnie jak w pracy **P-1**) wraz z danymi dotyczącymi wielkości ich genomu oraz ilości telomerycznej heterochromatyny. Przeprowadzone badania po raz pierwszy ukazały zróżnicowanie gatunków żyta oparte na zmienności metylacji cytozyny w DNA. Dodać należy, że praca ta miała charakter nowatorski, ponieważ zmienność globalnej metylacji cytozyny między gatunkami nie jest dobrze poznana, choć niektóre badania pokazują istotne różnice międzygatunkowe (Alonso i wsp. 2015). Rozmiar genomu u

roślin jest cechą gatunkowo specyficzną, a jego powiększanie w trakcie ewolucji wynika przede wszystkim ze wzrostu liczby kopii sekwencji powtarzalnych (Bennett i Leitch, 2012; Alonso i wsp. 2015), które występują głównie w obszarach heterochromatynowych. Zatem oczekiwano wzrostu poziomu metylacji w gatunkach żyta charakteryzujących się większym genomem. By określić poziom polimorfizmu metylacji cytozyny w DNA pomiędzy gatunkami z rodzaju *Secale* zastosowano technikę MSAP. W tej pracy wykorzystano parę enzymów *MspI* i *HpaII*, które rozpoznają sekwencję 5'-CCGG-3', jednak tną DNA zależnie od statusu metylacji tej sekwencji: *MspI* nie przetnie DNA, jeśli zewnętrzna cytozyna jest zmetylowana w pełni lub hemimetylowana. *HpaII* nie przetnie DNA, kiedy cytozyna jest w pełni zmetylowana, natomiast tnie DNA jeśli zewnątrz cytozyna jest hemimetylowana. Zarówno analiza samych MSL (ang. Methylation-Susceptible Loci), jak i łączna analiza loci MSL i NML (ang. Non-Methylated Loci) potwierdza, że najbardziej odmienny od pozostałych badanych gatunków pod względem epigenetycznym jest gatunek *S. sylvestre*, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami (P-1). Jest on również filogenetycznie najstarszy wśród gatunków *Secale*. Różnice w liczbie i rozmieszczeniu sekwencji powtarzalnych tego gatunku w porównaniu z innymi taksonami wskazują, że amplifikacje i delecje tych sekwencji stanowiły podstawę w szlaku ewolucyjnym w tym rodzaju, co wpływa również na poziom metylacji DNA. Jednakże uzyskane w badaniach różnice pomiędzy *S. sylvestre*, a pozostałymi badanymi taksonami żyta, ukazane dzięki technice MSAP, nie są istotne statystycznie. Wyniki te pozwalają więc na sformułowanie hipotezy, że odmienność tego gatunku wynikać może również ze zmian ekspresji genu, które mogły zostać wymuszone zmianami środowiskowymi. Okazało się, że poziom metylacji sekwencji CCGG w analizowanych gatunkach żyta był wysoki i wynosił od 60% w *S. strictum* ssp. *africanum* do 66% w *S. cereale* ssp. *segetale*, przy czym nie stwierdzono istotnych różnic we wzorze metylacji sekwencji pomiędzy parami taksonów żyta (P-5). Uzyskane wyniki ukazują wyższy stopień metylacji DNA w taksonach *Secale* w porównaniu z innymi gatunkami takimi jak *Brassica oleracea* (Salmon i wsp. 2008) i *Arabidopsis thaliana* (Cervera i wsp. 2002), czego przyczyną może być większa liczba sekwencji powtarzalnych (92%) w genomach gatunków rodzaju *Secale*. Bardziej odmienny epigenetycznie, w stosunku do taksonów należących do gatunków *S. cereale* i *S. strictum*, jest gatunek *S. vavilovii*. Należy jednak podkreślić, że całkowity poziom metylacji badanych loci był bardzo zbliżony u wszystkich taksonów (P-5).

W pracy (**P-5**) zastosowano dodatkowo technikę ELISA by poznać globalną metylację badanych gatunków żyta, która może odzwierciedlać funkcjonalne zmiany w genomie takie jak: mutacje, stabilność genomową, zmiany ekspresji genów czy rearanżacje chromosomowe. Poziom globalnej metylacji był bardzo wysoki i wynosił od 53% dla *S. strictum* do 83% dla *S. cereale* ssp. *segetale* i wykazał statystycznie istotne różnice między badanymi taksonami. W większości gatunków, zgodnie z oczekiwaniami, był on wyższy niż uzyskany za pomocą MSAP, z wyjątkiem takich gatunków jak *S. strictum* i *S. sylvestre*. Możliwe jest, że w genomach wszystkich badanych taksonów *Secale* poziom metylacji CpG jest podobny, natomiast tak duże różnice w poziomie zawartości 5-metylocytozyny wynikają z różnic w metylacji CHG i CHH. Uzyskana zmienność wzorów metylacji DNA (przy zastosowaniu MSAP) wśród badanych taksonów żyta wykazuje dość niski poziom. Pokazuje też, że w procesie ewolucji, każdy takson gromadził epiallele i wiernie przekazywał je z pokolenia na pokolenie, co dało różnice w uzyskanych wartościach procentowych i zmianach wzorów metylacji DNA pomiędzy badanymi taksonami (**P-5**).

Metylacja DNA jest mechanizmem epigenetycznym, który jest bezpośrednio związany z frakcją heterochromatyny w genomie. Ewolucyjne zwiększanie rozmiaru genomów poprzez dodawanie heterochromatyny powinno być związane ze zwiększaniem poziomu globalnej metylacji cytozyny w DNA. W ewolucji żyta od momentu, gdy *Secale* odłączyło się od wspólnego przodka z pszenicą, miał miejsce wzrost zawartości DNA, który był związany z dodawaniem heterochromatyny, głównie telomerycznej, co przyczyniło się do zwiększenia genomu. Przeprowadzone analizy dotyczące procentowej zawartości telomerycznej heterochromatyny w całym genomie każdego taksonu pokazują, że zawartość t-heterochromatyny jest zróżnicowana. Najmniej t-heterochromatyny stwierdzono u *S. sylvestre* (6,18%) i *S. strictum* oraz jego podgatunków (6,25%-7,72%). Pomędzy tymi taksonami nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości t-heterochromatyny. Więcej t-heterochromatyny występowało w genomach *S. vavilovii* (13,39%) oraz *S. cereale* i jego podgatunków (10,94%-12,29%). W przeciwieństwie do metody MSAP, której wyniki pokazały, że między wszystkimi taksonami brak istotnych różnic, analiza zawartości t-heterochromatyny potwierdza wcześniejsze rezultaty (**P-1**). Uzyskane wyniki dotyczące zawartości t-heterochromatyny i wielkości genomów badanych taksonów żyta zestawiliśmy z danymi dotyczącymi metylacji DNA. Wyniki uzyskane zarówno z analizy MSAP, jak i ELISA, pokazały, że najwyższym procentem metylacji charakteryzuje się *S. cereale* ssp.

*segetale*, co koreluje pozytywnie z wysoką zawartością DNA - 16,07 pg (2C) i dużymi blokami telomerycznej heterochromatyny, która stanowi aż 11%. Podobnie zależność ta kształtuje się w *S. cereale* ssp. *afghanicum* oraz *S. cereale*. Wyniki badań potwierdziły zakładaną hipotezę, że wraz ze zwiększaniem się genomów wzrastać będzie poziom metylacji DNA (**P-5**). Analiza wszystkich danych pokazała, że nie można tylko na podstawie wielkości genomu czy zawartości telomerycznej heterochromatyny wnioskować o poziomie metylacji genomu. Jest to zagadnienie o wiele bardziej złożone. Zmniejszenie liczby metylowanych cytozyn przy wzroście zawartości DNA w genomie może być spowodowane obniżeniem stosunku powtarzających się sekwencji w genomie w porównaniu z jego wielkością lub wynikać z gęstości metylacji sekwencji powtarzalnych (Alonso i wsp. 2015). Wykazano, że najmniejszym genomem charakteryzuje się *S. strictum* ssp. *africanum* (2C - 14,76 pg), który charakteryzuje się niskim procentem heterochromatyny telomerycznej (6%). Jednakże w przeciwieństwie do wartości oczekiwanej globalna metylacja tego taksonu była wysoka i stanowiła aż 70%. Wy tłumaczeniem tego fenomenu jest fakt, że jest to gatunek endemiczny i jego ewolucja mogła toczyć się odmiennie w porównaniu do innych taksonów żyta czy podgatunków *S. strictum* (Hammer 1990). Niższą do oczekiwanej wartość globalnej metylacji uzyskano także w *S. vavilovii* (66%) przy wysokiej zawartości DNA (2C - 16,66 pg) i telomerycznej heterochromatyny (13%). Ta zmienność w poziomie metylacji DNA może wynikać ze zmian wynikających z procesu adaptacyjnego roślin, w którym metylacja jest ważnym mechanizmem epigenetycznym. Różnice w metylacji DNA mogą być spowodowane przez dostosowanie organizmów do konkretnego środowiska. Może to być jedną z przyczyn, ukazanego przez nas, niskiego poziomu globalnej metylacji DNA w *S. strictum* ssp. *strictum* (53%) w porównaniu z innymi taksonami, a nawet jego podgatunkami, mimo wysokiej zawartości DNA (2C - 16,22 pg) (**P-5**). Obserwowane różnice pomiędzy zawartością t-heterochromatyny a poziomem metylacji cytozyn w DNA można też tłumaczyć zróżnicowaniem genetycznych elementów ruchomych, które wykazują tendencję do gromadzenia się w obszarach heterochromatynowych. Znaczna część zróżnicowania wielkości genomu spowodowana jest zmianami w obecności i amplifikacji elementów zdolnych do transpozycji. Ruchome elementy genetyczne często są głównym celem metylacji DNA, ponieważ powinny być wyciszone, aby zapewnić stabilność i integralność genomu. Zmiany poziomu metylacji DNA mogą być również związane ze zmianami liczby elementów ruchomych w genomie. Ma to związek ze zróżnicowaną liczbą elementów ruchomych, a

także gatunkową specyficznością elementów ruchomych, które mogły ulegać amplifikacji w genomie konkretnego gatunku po jego ewolucyjnym oddzieleniu. Porównując analizy IRAP opartych na retrotranspozonach, które przedstawiłam w artykule **P-1**, z wynikami metylacji DNA (**P-5**) stwierdziłam, że najmniej podobnymi taksonami okazały się gatunki *S. strictum* ssp. *strictum* oraz *S. sylvestre*. Interesujące było utworzenie klastra pomiędzy *S. strictum* ssp. *africanum* i *S. cereale* ssp. *segetale* i ich wysokie podobieństwo (79%). Wysoki poziom metylacji w podgatunku *S. strictum* ssp. *africanum*, który charakteryzuje się jednym z najmniejszych genomów wśród gatunków z rodzaju *Secale*, można wytłumaczyć gromadzeniem się w czasie ewolucji retrotranspozonów, które wpływały na poziom tego procesu. Uważam, że zmiany w obecności lub braku sekwencji retrotranspozonowych znacząco wpływają na zróżnicowanie gatunków. Tym bardziej, że TE przyczyniają się do ewolucji roślin (Quadrona i wsp. 2016) i mogą wpływać na cechy rolnicze (Martin i wsp. 2009, Ong-Abdullah i wsp. 2015). Pojawia się obraz, w którym polimorfizm TE i związane z nimi modyfikacje epigenetyczne mogą odgrywać kluczową rolę w adaptacji (Rey i wsp. 2016). Niewątpliwie TE stanowią nowe źródło cech adaptacyjnych do hodowli roślin (Lanciano i Mirouze 2017).

Za szczególne osiągnięcia zawarte w cyklu publikacji wykazanych do przewodu habilitacyjnego uważam:

1. Ocenę wykorzystania różnych markerów DNA generowanych w reakcji PCR (w oparciu o sekwencje mikrosatelitarne i retrotranspozonowe) do określenia zależności i zróżnicowania genetycznego pomiędzy *S. cereale* i gatunkami dzikimi z uwzględnieniem *Secale vavilovii* z dodatkowym prążkiem JNK. Może być to wykorzystane w programach hodowlanych.
2. Wykazanie wysokiego podobieństwa między żytem uprawnym a gatunkami dzikimi (0,37-0,85), co pozwala na oczekiwanie wysokiej skuteczności krzyżowania i formowania materiału wyjściowego dla nowych odmian o pożądanym cechach.
3. Analizę zróżnicowania genetycznego między liniami żyta, przy pomocy markerów ISSR i IRAP, ukazującą jej potencjalną użyteczność w ustalaniu tożsamości odmian.
4. Kompleksową analizę bloku sekwencji powtarzalnych JNK występującego w niektórych roślinach *S. vavilovii*, którego występowanie związane jest z obniżeniem ich płodności i żywotności.
  - a. Wykazanie podobieństwa sekwencji JNK do sekwencji 5S rDNA.



- b.** Ukazanie niezwyklej złożoności regionu heterochromatyny JNK, niejednorodnej struktury i obecność obcych, bardzo różnorodnych sekwencji.
- c.** Ukazanie, że sekwencje między JNK wykazały podobieństwo do genu 5-kinazy glutaminianu i domniemanej dehydrogenazy alkoholowej pierwotniaków z rodzaju *Leishmania*, do mRNA mitochondrialnego genu białka rybosomalnego S4 u roślin, do genu glikoproteiny (G) wirusa IHNV oraz do sekwencji powtarzalnej żyta i chromosomu 3B pszenicy.
- d.** Wykazanie, że sekwencja JNK jest flankowana przez sekwencje powtarzalną R173, która jest charakterystyczna dla genomu żytniego. Obszar ten bezpośrednio graniczy z niekodującą sekwencją powtarzalną i znajduje się po obu stronach przez co może pełnić funkcję izolatora, uniemożliwiając rozprzestrzenianie się obszaru heterochromatynowego na przyległe obszary.
- e.** Ustalenie, że obszar nietypowego prążka heterochromatynowego – blok JNK - może stanowić zespół wadliwych genów (pseudogenów) lub elementów ruchomych, które gromadzone są głównie w jednym miejscu w chromosomie 2RL. Jest to niezmiernie istotne, ponieważ aktywne pseudogeny mogą oddziaływać regulacyjnie na aktywność genów poprzez ncRNA
- 5.** Ukazanie wysokiego poziomu metylacji DNA w taksonach *Secale* przy zastosowaniu techniki MSAP, który wahał się od 60% w *S. strictum* ssp. *africanum* do 66% w *S. cereale* ssp. *segetale*. Jak również bardzo wysokiego poziomu globalnej metylacji (ELISA), który wynosił od 53% dla *S. strictum* do 83% dla *S. cereale* ssp. *segetale* i wykazał statystycznie istotne różnice między badanymi taksonami.
- 6.** Potwierdzenie najmniejszego podobieństwa gatunku *S. sylvestre* pod względem genetycznym i epigenetycznym w porównaniu z innymi badanymi gatunkami z rodzaju *Secale*.
- 7.** Stwierdzenie, że podczas ewolucji w rodzaju *Secale*, przy zwiększaniu rozmiarów genomu szczególnie poprzez dodawanie sekwencji heterochromatynowych, nie musi dochodzić do zwiększenia poziomu metylacji DNA.

## Podsumowanie

Wyniki badań, które zaplanowano i zrealizowano przyczynią się do poszerzenia wiedzy o zróżnicowaniu genomów gatunków z rodzaju *Secale* w oparciu o sekwencje powtarzalne, które są przydatne w hodowli roślin. Moim zdaniem to sekwencje powtarzalne generują istotne różnice między genomami, które mogą ukazywać powiązania między gatunkami oraz być użyteczne w praktycznej hodowli żyta i ustalaniu tożsamości odmian. Porównanie natury i rozmieszczenia sekwencji powtarzalnych pomiędzy gatunkami mniej lub bardziej spokrewnionymi dostarcza wielu informacji o ich ewolucji i pozwala na skuteczne wykorzystanie w programach hodowlanych. Znajomość dystrybucji, genomowej organizacji, chromosomowej lokalizacji oraz pochodzenia ewolucyjnego sekwencji powtarzalnych jest niezbędna dla zrozumienia organizacji i funkcjonowania genomów zarówno roślinnych i zwierzęcych. Sekwencje powtarzalne podlegają szybkiej ewolucji wykazując dużą zmienność, wynikającą z ich amplifikacji, przemieszczania i mutacji. Pozwala to na ich wykorzystanie jako użytecznych markerów molekularnych. Jednakże wszystkie te cechy sekwencji powtarzalnych, powodują trudności w ich analizie oraz poznaniu ostatecznych mechanizmów wstawiania i zmiennej dystrybucji tych sekwencji w genomie.

## Bibliografia

1. Achrem M, Kalinka A, Rogalska S. 2005. Localization of the gene coding the transposase of maize Ac/Ds system on rye chromosomes (*Secale vavilovii* Grossh. i *Secale cereale* L.) by FISH. W: Variability and Evolution. New Perspectiv. Red.: W. Prus-Głowacki, E. Pawlaczyk. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 515-521.
2. Alonso C, Pérez R, Bazaga P, Herrera CM. 2015. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. *Frontiers in Genetics*, 6(4):1-9
3. Bennett M, Leitch I. 2012. Angiosperm DNA C-values database. (release 8.0, Dec. 2012). Available at [www.kew.org/cvalues/](http://www.kew.org/cvalues/).
4. Broda Z, Tomkowiak A, Mikołajczyk S, Weigt D, Górski F, Kurasiak-Popowska D. 2016. The genetic polymorphism between the wild species and cultivars of rye *Secale cereale* L. *Acta Agrobotanica*, 69(3):1652.
5. Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. 2007. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173(6):603–8.
6. Cervera MT, Ruiz-García L, Martínez-Zapater JM. 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(4):543-552.
7. Ćwiklińska A, Broda Z, Bocianowski J. 2009. Analiza porównawcza cech dzikich gatunków rodzaju *Secale* L. w celu poszerzenia zmienności genetycznej przydatnej w hodowli. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 252:119–137.

8. Dostatny DF, Kloc G. 2018. Inwentaryzacja, gromadzenie oraz wykorzystanie zasobów dzikich gatunków roślin uprawnych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 283:25-26.
9. Filippova G.N. 2008. Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Current Topics in Developmental Biology*, 80:337-360.
10. Flavell RB, Rimpau J, Smith DB. 1977. Repeated sequences DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma*, 63:205-222.
11. Hammer K. 1990. Breeding system and phylogenetic relationships in *Secale*. *Biologisches Zentralblatt*, 109(1):45-50.
12. Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W. 2010. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (NUMTS) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genet.*, 6:e1000834.
13. Kalinka A, Achrem M. 2018. Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid triticale (*x Triticosecale*). *Planta*, 247(4):807-829.
14. Khush G S, Stebbins G L. 1961. Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*. I. Some new data on the ancestry of *S. cereale*. *American Journal of Botany*, 48:723-730.
15. Khush G S. 1962. Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*. II Interrelationships of the wild species. *Evolution*, 16:484-496.
16. Lanciano S, Mirouze M. 2017. DNA Methylation In Rice and Relevance for Breeding Epigenomes, 1:10.
17. Li Y, Haseneyer G, Schön CC, Ankerst D, Korzun V, Wilde P, Bauer E. 2011. High levels of nucleotide diversity and fast decline of linkage disequilibrium in rye (*Secale cereale* L.) genes involved in frost response. *BMC Plant Biology*, 11(1):6.
18. Loarce Y, Gallego R, Ferrer E. 1996. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica*, 88(2):107-115.
19. Ma R, Yli-Mattila T, Pulli S. 2004. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas*, 140(3):210-221.
20. Mackiewicz D, Broda Z. 2004. Ocena przydatności hodowlanej mieszańców żyta uprawnego *Secale cereale* (L.) z dzikimi gatunkami z rodzaju *Secale*. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 231:265-277.
21. Makarevitch I, Waters AJ, West PT, Stitzer M, Hirsch CN, Ross-Ibarra J, Springer NM. 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. *PLOS Genetics*, 11(1):e1004915.
22. Maraci Ö, Özkan H, Bilgin R. 2018. Phylogeny and genetic structure in the genus *Secale*. *PLoS One*, 13(7):e0200825.
23. Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, 461:1135-1138.
24. Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J. 2007. Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, 130(5):851-62.
25. Miedaner T, Hübner M, Korzun V, Schmiedchen B, Bauer E, Haseneyer G, Wilde P, Reif JC. 2012. Genetic architecture of complex agronomic traits examined in two testcross populations of rye (*Secale cereale* L.). *BMC Genomics*, 13:706.
26. Mirouze M, Paszkowski J. 2011. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:267-274.
27. Nagaki K, Tsujimoto H, Saskuma T. 1999. A novel repetitive sequence, termed the JNK repeat family, located on an extra heterochromatic region of chromosome 2R of Japanese rye. *Chromosome Research*, 6: 95-101.

28. Ong-Abdullah M, Ordway JM, Jiang N, Ooi SE, Kok SY, Sarpan N, Azimi N, Hashim AT, Ishak Z, Rosli SK, et al. 2015. Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature*, 525:533–537.
29. Peng H, Zhang J. 2009. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding. *Progress in Natural Science*, 19:1037–1045.
30. Quadrana L, Bortolini Silveira A, Mayhew GF, LeBlanc C, Martienssen RA, Jeddloh JA, Colot V. 2016. The *Arabidopsis thaliana* mobilome and its impact at the species level. *eLife*, 5, e15176.
31. Rey O, Danchin E, Mirouze M, Loot C, Blanchet S. 2016. Adaptation to global change: A transposable element-epigenetics perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, 31:514–526.
32. Rogalska SM, Achrem M, Słomińska-Walkowiak R, Filip, E, Skuza L, Pawłowska J, Apolinarska B. 2002a. Polymorphism of heterochromatin bands on chromosomes of rye *Secale vavilovii* Grossh. lines. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 44:111-117.
33. Rogalska SM, Achrem M, Stróżycki P. 2001. The pScJNK1 repeated sequences identified on an extra heterochromatin band on chromosome 2R of *Secale vavilovii* Grossh. lines. *Biological Bulletin*, 38:15-19.
34. Rogalska SM, Apolinarska B, Achrem M, Słomińska-Walkowiak R, Skuza L, Filip E. 2002b. Meiotic Behavior of chromosomes in PMCs in plants of *Secale vavilovii* Grossh. lines with additional heterochromatin in chromosome 2R. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 44:119-124.
35. Salmon A, Clotault J, Jenczewski E, Chable V, Manzanares-Dauleux MJ. 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174(1):61-70.
36. Schreiber M, Himmelbach A, Börner A, Mascher M. 2019. Genetic diversity and relationship between domesticated rye and its wild relatives as revealed through genotyping-by-sequencing *Evolutionary Applications*, 12:66-77.
37. Siomi H, Siomi MC. 2008. Interactions between transposable elements and argonautes have (probably) been shaping the *Drosophila* genome throughout evolution. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18:181-187.
38. Skuza L, Szućko I, Filip E, Strzała T. 2019. Genetic diversity and relationship between cultivated, weedy and wild rye species as revealed by chloroplast and mitochondrial DNA non-coding regions analysis. *PLoS One*, 14(2):e0213023.
39. Stojalowski S, Milczarski P, Masojć P. 2004. Usefulness of ISSR markers for identification of inbred lines and mapping of rye genome. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 231:237–246.
40. Szućko I, Rogalska SM. 2015. Application of ISSR-PCR, IRAP-PCR, REMAP-PCR, and ITAP-PCR in the assessment of genomic changes in the early generation of triticale. *Biologia Plantarum*, 59:708-714.
41. Targońska M, Hromada-Judycka A, Bolibok-Braęoszewska H, Rakoczy-Trojanowska M. 2013. The specificity and genetic background of the rye (*Secale cereale* L.) tissue culture response. *Plant Cell Reports*, 32:1–9
42. Tomita M, Okutani A, Beiles A, Nevo E. 2011. Genomic, RNA, and ecological divergences of the *Revolver* transposon-like multi-gene family in *Triticeae*. *BMC Evolutionary Biology*, 11:269.
43. Wiśniewska H. 2010. Poszerzenie bioróżnorodności uprawnych form pszenicy i pszenżyta poprzez transfer genów z dzikich i uprawnych form plemienia *Triticeae*. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 555:465-477.
44. Wright IS, Kalisz S, Slotte T. 2013. Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1760):20130133.
45. Zlatanova J, Caiafa P. 2009. CCCTC-binding factor: to loop or to bridge. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(10):1647-60.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### **A) Dorobek naukowy**

Poza omówionym powyżej głównym nurtem badawczym, prowadzę również badania w różnych obszarach biologii molekularnej i cytogenetyki roślin i zwierząt. Oprócz pięciu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, w swoim dotychczasowym dorobku naukowym posiadam 10 publikacji indeksowanych przez ISI Web of Science, pozostałe 10 nieindeksowane (większość anglojęzycznych), 7 prac w recenzowanych, wydawnictwach pokonferencyjnych oraz 10 rozdziałów w monografii (załącznik nr 3). Jestem również autorką 3 rozdziałów w podręczniku „Chromatyna. Molekularne mechanizmy epigenetyczne” (Rogalska S., Achrem M., Wojciechowski A. 2010. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu) oraz dwóch rozdziałów skryptu (Wybrane metody biologii i cytogenetyki molekularnej. 2008. Red. S. Rogalska). Wyniki badań prezentowałam na 24 konferencjach krajowych i międzynarodowych (na 10 konferencjach wygłaszałam referaty).

Pierwsze prace w moim dorobku naukowym wiążą się z tematem badań, zapoczątkowanym pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Stanisławy Rogalskiej i realizowanych przez kilka lat w Katedrze Biologii Komórki Wydziału Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydziału Biologii) Uniwersytetu Szczecińskiego. Prace te dotyczyły głównie analiz cytogenetycznych różnych gatunków z rodzaju *Secale*, a przede wszystkim linii *S. vavilovii*. W czasie prowadzonych analiz linii *S. vavilovii*, stwierdzono wypadanie niektórych roślin z badanej populacji. Obserwacje cytogenetyczne, które wykonywałam wykazały obecność dodatkowego prążka heterochromatynowego na długim ramieniu jednego lub dwóch chromosomów pary 2R (**II.A.9 załącznik 3**). Dodatkowy prążek znajdował się w odległości od 1,95µm do 2,08µm od centromeru, a jego wielkość wynosiła ok. 0,65µm (**II.A.9 załącznik 3**). Okazało się, że uzyskanie ziarniaków z roślin, które miały dodatkowy prążek heterochromatynowy na obu chromosomach 2RL było niezmiernie trudne. Rośliny te były słabe, pozbawione wigoru, o silnie zredukowanej płodności i najczęściej szybko zamierały. Obserwacja procesu mejozy tych roślin, u których zaobserwowano dodatkową heterochromatynę, nie wykazała żadnych zaburzeń w koniugacji chromosomów (**II.A.10 załącznik 3**). Okazało się, że dodatkowa frakcja heterochromatyny zbudowana jest z sekwencji rodziny *JNK*, która różni się od heterochromatyny subteleromerowej, centromerowej i interstycjalnej, ponieważ budują ją inne rodziny powtórzeń nukleotydowych DNA.

Sekwencja ta identyfikowana jest w chromosomach 2RL *S. cereale* L. (Nagaki i wsp. 1999) i w liniach *S. vavilovii* (**II.A.9 załącznik 3**). Region JNK zbudowany jest z wysoko zmetylowanych, tandemowych powtórek o długości 1200 pz, powtórzonych 4000 razy w dodatkowym prążku heterochromatynowym (Nagaki i wsp. 1999). W roślinach bez dodatkowego prążka heterochromatynowego w chromosomach 2R, sekwencja JNK jest rozproszona w całym genomie, gdzie występuje w 20-krotnych powtórzeniach (Nagaki i wsp. 1999, **II.D.11 załącznik 3**). W ramach realizacji powyższych badań jestem współautorem dwóch prac recenzowanych, które ukazały się w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej *Acta Biologica Cracoviensia* (**II.A.9 i II.A.10 załącznik 3**).

Równocześnie poszerzałam swoje umiejętności o nowe techniki badawcze. W 1999 roku i 2000 roku odbyłam staże w Katedrze Genetyki Zwierząt i Podstaw Hodowli Zwierząt w Akademii Rolniczej w Poznaniu (dwukrotnie dwa tygodnie) oraz w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (jeden tydzień). Dzięki nim wprowadziłam w Katedrze Biologii Komórki m.in. technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, która pozwoliła mi prowadzić analizy z zakresu cytogenetyki molekularnej. Znalazło to odzwierciedlenie w kolejnych publikacjach (*Biological Bulletin of Poznań* **II.D.27 załącznik 3**, *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis* **II.D.19 załącznik 3**) i siedmiu rozdziałów w monografiach (**II.D.10, II.D.11, II.D.17, II.D.19, II.D.20, II.D.25, II.D.26 załącznik 3**).

W latach 2001-2002 w ramach projektu badawczego, finansowanego przez MNiSW (6P06A 035 20), którego byłam kierownikiem, badałam rozmieszczenie genetycznych elementów ruchomych w chromosomach żyta. Badania te były częścią mojej pracy doktorskiej „*Studia kariologiczne w rodzaju *Secale**”.

Moje zainteresowania naukowe od początku działalności akademickiej koncentrowały się na problematyce związanej z genomami roślin, zazwyczaj skupiały się wokół badań z zakresu biologii i cytogenetyki molekularnej zbóż. Jest to główny nurt tematyczny większości prac, których jestem współautorem oraz realizowanych przeze mnie projektów. Jednym z tematów była analiza występowania pszenicznych sekwencji mikrosatelitarnych (*MST101* i *wmc104*) jako markerów molekularnych odporności na przedźniwne porastanie ziarniaków w kłosie w odmianach żyta, pszenicy i pszenżyta. Porastanie jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym w uprawie, ponieważ prowadzi do obniżenia plonu i zmniejszenia wartości odżywczej ziarna. Odmiany zbóż wykazują zróżnicowanie pod względem tolerancji na

porastanie, dlatego też bardzo ważne jest wyselekcjonowanie odmian odpornych na to zjawisko. Wyniki, które uzyskałam opublikowałam jako rozdział w monografii - Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych (**II.D.21 załącznik 3**). Ukazują one sprzężenie badanych markerów z tolerancją na porastanie wybranych odmian żyta, pszenicy i pszenżyta, co może być przydatne w praktyce hodowlanej.

Jednocześnie rozwijałam swoje zainteresowania dotyczące dynamicznych zmian, szczególnie sekwencji powtarzalnych, w genomach zbóż. Bardzo dobrym obiektem badań do śledzenia przemian genomowych jest X *Triticosecale* Witt. Pszenżyto jako mieszańiec międzyrodzajowy zawiera mniej spokrewnione genomy rodzicielskie niż mieszańce międzygatunkowe, przez co zmiany genomowe są często bardziej nasilone i łatwiejsze do zarejestrowania. Dodatkowo, genom triticales wykazuje dużą złożoność ze względu na wielkość i wysoki poziom ploidalności. Te cechy czynią z pszenżyta bardzo cenny gatunek do analizy wczesnych ewolucyjnych procesów, które występują w złożonym allopoliploidalnym genomie. Do śledzenia zmian w genomie mieszańcowym wykorzystano pszenżyto LMur powstałe ze skrzyżowania pszenicy odmiany Lanca z żytem odmiany Muro. Uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez Panią Prof. dr hab. S. Rogalską i dr A. Kalinkę, które obejmowały analizę rearanzacji sekwencji nukleotydowych DNA w genomach mieszańców i ukazanie różnic w rozkładzie liczby chromosomów w badanych liniach oraz określenie lokalizacji retrotranspozonów w chromosomach. Badania prowadzono w dwóch pokoleniach mieszańców by uzyskać informację o ich ewentualnej stabilizacji genetycznej. Wymiernym efektem ukazanych badań były prace opublikowane w czasopismach *Planta* (**II.A.1 załącznik 3**), *Advance of Cell Biology* (**II.A.6 załącznik 3**) oraz pięć rozdziałów w monografiach (**II.D.9, II.D.12, II.D.14, II.D.16, II.D.18 załącznik 3**). Część badań dotyczyła bezpośredniej eliminacji chromosomu/chromatyny z komórek macierzystych pyłku jako aspektu niestabilności prowadzącej do nieregularnej mejozy i zaburzeń w procesie mejotycznym. Obserwacje wykazały, że chromatyna ulega eliminacji wraz z częścią cytoplazmy tworząc „mini-komórkę”. Wyniki badań ukazały się w *The Nucleus* (**II.D.8 załącznik 3**), które nie znajduje się na liście JCR, ale przywołane zostało 13 razy w renomowanych publikacjach z listy JCR.

W pracy zawodowej podejmowałam szereg tematów badawczych dotyczących analiz molekularnych. Już w ciągu kilku pierwszych lat mojej działalności naukowej po doktoracie podjęłam współpracę z pracownikami innych jednostek naukowych na Wydziale Biologii US.

W ramach nawiązanej w latach 2007-2013 współpracy z kierownikiem Katedry Zoologii Ogólnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego Panem prof. dr hab. J. Domagałą uczestniczyłam jako wykonawca w realizacji grantu - Restauracja rybacka zlewni Drawy z uwzględnieniem rekultywacji, ochrony i poprawy środowiska oraz rozwoju społeczno-gospodarczego regionu z Programu Operacyjnego Zrównoważonego rozwoju sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich. Badania te umożliwiły dokonać pierwszej oceny genetycznej populacji *Salmo trutta* pochodzącego z Drawieńskiego Parku Narodowego i jego otuliny. Podjęcie tego typu badań jest niezbędne, ponieważ w ostatnich latach zmniejsza się liczba populacji ryb łososiowatych, co spowodowane jest zmianami siedliskowymi, małym przeżyciem w morzu, kłusownictwem, czy też nieodpowiedzialnym zarybianiem. Populacje troci są ważnym elementem ichtiofauny pod względem przyrodniczym, ale mają również istotne znaczenie gospodarcze. Ze względu na wysokie walory smakowe troć to ryba poszukiwana na rynku krajowym, ale także stanowiła przedmiot eksportu. Podstawą eksploatacji tych ryb były połowy morskie, choć część odławiano również w rzekach. Obecnie występowanie troci w niektórych rzekach coraz częściej zapewnione jest w wyniku restytucji. Zarybianie rzek może mieć duży wpływ na integralność genetyczną rdzennych populacjach. Nieodpowiedzialne zarybianie może doprowadzić do utraty charakterystycznych dla danej populacji genów przez introgresję z wylęgarni ryb. Znajomość zróżnicowania genetycznego i struktury populacji *Salmo trutta* jest konieczna dla skutecznego programu ochrony ryb, jak i odpowiedniego zarządzania istniejącymi zasobami. Aby oszacować genetyczne zróżnicowanie populacji troci, nasz zespół zastosował dwa systemy markerowe: RAPD i SSR. Badano zmienność pomiędzy populacjami *Salmo trutta* m. *fario* i *Salmo trutta* m. *trutta* pochodzącymi z Regi oraz trzech cieków zlewni Drawy. Otrzymane wyniki wskazały na bardzo duże zróżnicowanie genetyczne badanych populacji ryb. Wyniki niniejszych badań zostały opublikowane w Folia Biologica (**II.A.2 załącznik 3**) oraz Polish Journal of Natural Sciences (**II.D.4 załącznik 3**), jako zbiorcza ekspertyza (**II.E załącznik 3**) i rozdziały w monografii (**II.D.6, II.D.7 załącznik 3**), były także zaprezentowane na dwóch konferencjach naukowych (**III.B. 6, III.B.7 załącznik 3**).

Konsekwencją tej współpracy były badania dotyczące populacji *Coregonus lavaretus*. Sieja zwyczajna także jest rybą o dużym znaczeniu gospodarczym, jej mięso jest wysoko cenione, ze względu na smak. W Polsce sieja zaliczana jest do gatunków zagrożonych. Degradacja ich naturalnego środowiska spowodowała, że gatunek ten traci miejsca



naturalnego rozrodu. Naturalna struktura genetyczna sieci została naruszona przez działania antropogeniczne z udziałem eutrofizacji, regulacji rzek, wprowadzaniem gatunków obcych, jak również nadmierną eksploatacją tego gatunków. Zmienność genetyczną dwóch populacji sieci (*Coregonus lavaretus*) z Zatoki Pomorskiej i Dolnej Odry oceniano za pomocą markerów mikrosatelitarnych. Pierwsze wyniki wskazują, że obie badane populacje wykazywały wysoką zmienność genetyczną. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych wykazała wyższą obserwowaną heterozygotyczność w porównaniu z heterozygotycznością oczekiwaną w wszystkich badanych populacji. Wysoka liczba heterozygot może być związana z intensywnym napływem genów z poza lokalnej populacji. Wstępne wyniki badań opublikowano w czasopiśmie *Acta Biologica* (**II.D.2 załącznik 3**).

W 2010 roku rozpoczęłam współpracę z Panią dr Anetą Wieczorek z Katedry Ekologii i Ochrony Środowiska WB Uniwersytetu Szczecińskiego dotyczącą określenia zmienności genotypowej wewnątrz- i międzypopulacyjnej kompleksu *Opegrapha vulgata*. Były to pierwsze badania molekularne dotyczące grupy *Opegrapha vulgata*, taksony tych porostów występują najczęściej na korze różnych gatunków drzew, bardzo rzadko występują na podłożu skalnym. Osobniki tej grupy charakteryzują się brakiem wyrazistości cech. W dostępnych zestawieniach opisów blisko spokrewnionych gatunków jest mało cech wykluczających, natomiast zdarza się często, że cechy jednych taksonów pokrywają się z zakresem innych. Zatem przedstawiciele tej grupy gatunków mają bardzo mało cech diagnostycznych. Cechy mikroskopowe nie są stałe nawet w obrębie pojedynczego owocnika. Towarzyszą temu problemy natury taksonomicznej i nomenklatorycznej. Porosty są bardzo trudnym materiałem w badaniach molekularnych. Dopracowano metody izolacji DNA z owocników i zoptymalizowano reakcję PCR. Uzyskane przez nas wyniki ukazały duży polimorfizm we wszystkich przebadanych okazach z kompleksu *O. vulgata*, co świadczy o wysokiej zmienności genetycznej taksonów wchodzących w skład tej grupy. Dopracowanie technik izolacji i amplifikacji DNA dla tej grupy, umożliwiło rozszerzenie badań o taksony *Zwackhia viridis* i *Hypogymnia physodes*. Wstępne wyniki badań wydają się dość obiecujące i zaowocowały dwoma artykułami w *Acta Mycologica* (**II.D.3 załącznik 3**) i *Polish Journal of Ecology* (**II.A.4 załącznik 3**).

W 2010 roku zostałam wykonawcą grantu „Filogeneza oraz zróżnicowanie genetyczne gatunków sekcji *Elatinella* Seub., z rodzaju *Elatine* L. (Elatinaceae)”, którego kierownikiem była Pani prof. dr hab. A. Popiela (kierownik Katedry Botaniki i Ochrony Przyrody). W

ramach grantu z Panią dr A. Kalinką (Katedra Biologii Komórki WB US) prowadziłam badania kariologiczne *Elatine gussonei*. Jest to gatunek endemiczny o dobrze poznanej morfologii, dla którego liczba chromosomów nie była dotychczas poznana. Dopracowano metodykę wykonania preparatów cytogenetycznych i ustalono diploidalną liczbę 54 chromosomów dla badanego gatunku. Wyniki pracy opublikowane zostały w Acta Botanica Croatica (**II.A.3 załącznik 3**).

Przez cały czas starałam się doskonalić swój warsztat badawczy, w związku z tym ubiegałam się o staż naukowy. W 2009 roku uzyskałam stypendium indywidualne z Fundacji Rozwoju Systemu Edukacji (FRSE) w ramach Funduszu Stypendialnego i Szkoleniowego (FSS). Dzięki temu odbyłam trzymiesięczny staż z zakresu biologii molekularnej i biotechnologii w Katedrze Genetyki i Biologii Roślin Norweskiego Uniwersytetu Nauk Przyrodniczych (Norwegian University of Life Sciences, Department of Plant and Environmental Sciences, Ås, Norwegia). Badania, które wykonywałam w ramach stażu dotyczyły analizy nowych genów związanych z tolerancją na chłód *ST1-31* i *ST3-127*. Materiałem badawczym były genotypy trawy - *Festuca pratensis*, wrażliwe na zamarzanie, poddawane aklimatyzacji przez 1, 2 i 3 tygodnie. Próbami kontrolnymi były rośliny niepoddawane aklimatyzacji zimnem. Praca polegała na określeniu poziomu ekspresji badanych genów w tkankach kostrzewy łąkowej oraz przeszukaniu biblioteki BAC *Festuca pratensis* pod kątem badanych genów i poznanie ich sekwencji nukleotydowej. Wyizolowanie oraz oznaczenie aktywności tych genów umożliwia wyhodowanie odmian odpornych na mróz. Pobyt ten umożliwił poznanie nowych technik i nawiązanie kontaktów naukowych.

Zainteresowanie tematyką badań realizowanych podczas stażu przyczyniło się do napisania artykułu dotyczącego roli mechanizmów epigenetycznych w odpowiedzi roślin na niską temperaturę, który ukazał się w czasopiśmie indeksowanym przez ISI Web of Science w Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica (**II.A.5 załącznik 3**).

Długoletnia praca obejmująca budowę i funkcjonowanie frakcji heterochromatynowej, a także zgłębienie zagadnień epigenetycznych zaowocowało napisaniem trzech rozdziałów w podręczniku „Chromatyna. Molekularne mechanizmy epigenetyczne.” (Rogalska S., Achrem M., Wojciechowski A. 2010. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu), a także rozdziału w monografii (**II.D.1 załącznik 3**).

W ramach pracy na rzecz społeczności naukowej wykonałam cztery recenzje dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym (Scientia Horticulturae, African Journal of Biotechnology, Turkish Journal of Botany, Journal of Applied Genetics).

Wykonałam także zamawianą ekspertyzę książki prof. dr hab. R. Ziemińskiej pt. „Niebinarne i wielowarstwowe pojęcie płci”, powstałej w ramach realizacji grantu Narodowego Centrum Nauki UMO-2014/15/B/HS1/03672 (styczeń-luty 2018).

Byłam kierownikiem trzech projektów badawczych, dwóch finansowanych przez KBN i jednego przez Fundację Rozwoju Systemu Edukacji (FRSE). Byłam też wykonawcą w jednym grantie finansowanym przez KBN oraz w grantie finansowanym z Programu Operacyjnego Zrównoważonego rozwoju sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich 2007-2013.

W 2018 roku zostałam wyznaczona przez Dziekana do koordynowania działań na Wydziale Biologii w projekcie „Korelacja identyfikacji i zwalczania transgranicznych powiązań terrorystycznych i przestępczych w obszarze badań genetycznych i informatycznych” z programu INTERREG 5A EWT POLSKA – MEKLEMBURGIA - BRANDRBURGIA 2014-2020. Wydział Biologii US jest Partnerem Stowarzyszonym w w/w projekcie międzynarodowym. Planowane przedsięwzięcia w projekcie mają charakter naukowo-dydaktyczny (ze względu na realizowany na Wydziale Biologii US kierunek Biologiczne Podstawy Kryminalistyki). Są czynnościami eksperymentalnymi, w wyniku których powstanie jednolity algorytm postępowania obejmujący elementy badań genetycznych i aspekty legalne. Ponadto wypracowane zostaną sposoby przekazywania partnerom danych wrażliwych (np. profili DNA) pomiędzy laboratoriami kryminalistycznymi partnerów zaangażowanych. Badania realizowane przeze mnie w tym projekcie będą dotyczyły identyfikacji substancji biologicznych z wykorzystaniem markerów mRNA i miRNA oraz stosowania technik hybrydyzacyjnych w kryminalistyce.

Podczas swojej pracy naukowo-badawczej uzyskałam dwie nagrody zespołowe JM Rektor Uniwersytetu Szczecińskiego II i III stopnia za osiągnięcia naukowe. Dodatkowo w 2006 roku za osiągnięcia naukowe otrzymałam Medal Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego „*Amicus Sciential et Veritatis*”.

Wykaz wszystkich moich publikacji oraz pozostałe działania składające się na moją aktywność naukową przedstawiłam w załączonym wykazie opublikowanych prac naukowych

wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzacji nauki (załącznik nr 3).

### Plany naukowo-badawcze

W literaturze przedmiotu trudno jest znaleźć doniesienia o metylomach roślin posiadających duże genomy, takich jak żyto. Moje plany badawcze kierują się w stronę analizy porównawczej metylomów wybranych taksonów z rodzaju *Secale*. Uważam, że jest to ważny temat ponieważ zróżnicowanie epigenetyczne warunkowane różnymi wzorcami metylacji DNA i modyfikacji histonów może być związane m.in. z fenotypem roślin, stabilnością genomu czy poliploidyzacją. Uważa się bowiem, że modyfikacje te mają wpływ na ewolucję roślin, a ich poznanie może służyć ulepszeniu roślin i powstawaniu nowych odmian uprawnych zbóż.

Drugim, interesującym mniej, kierunkiem badań jest analiza linii *S. vavilovii*, które charakteryzują się takimi cechami jak obniżona zawartość pentozanów, mozaikowe zabarwienie pylników i ziarniaków oraz występowanie dodatkowego prążka zbudowanego z sekwencji powtarzalnej *JNK*, związanej z obniżoną płodnością. Linie te mogą stanowić podstawę analiz populacji mapujących w odniesieniu do poznawania przyczyn np. osłabionej żywotności i płodności w liniach wsobnych.

### Zestawienie liczbowe osiągnięć naukowych

Typ publikacji	Przed doktorem	Po doktoracie	Razem			
			liczba	IF	IF <sub>(5-letni)</sub>	Punkty MNiSW w roku ukazania
<b>PRACE ORYGINALNE</b>						
W czasopismach posiadających IF	2	13	15	16,893	19,653	276
W czasopismach nieposiadających IF	3	7	10	-	-	54
Autorstwo rozdziału w monografii	6	4	10	-	-	43
Prace w recenzowanych,	-	7	7			10

wydawnictwach pokonferencyjnych						
Autorstwo monografii lub podręcznika	-	1	1	-	-	24
<b>Ogółem</b>	<b>11</b>	<b>32</b>	<b>43</b>	<b>16,893</b>	<b>19,653</b>	<b>407</b>
<b>DONIESIENIA KONFERENCYJNE KRAJOWE I MIĘDZYNARODOWE</b>						
	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem			
Konferencje międzynarodowe	3	4	7			
Konferencje krajowe	10	7	17			
Ogółem	13	11	24			

\*Sumaryczny impact factor wg listy Journal Citation Reports (JCR), bez prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne, wynosi **9,574 (5-letni IF<sub>2017</sub> 11,329)**

\*Sumaryczny impact factor wg listy Journal Citation Reports (JCR), dla prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne wynosi **7,319(5-letni IF<sub>2017</sub> 8,324)**

### **B) Działalność dydaktyczna i organizacyjna**

Podczas pracy na stanowisku asystenta (1998-2006), jak i adiunkta (od 2006) prowadziłam zajęcia dydaktyczne na Wydziale Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego z przedmiotów: Biologia komórki, Biologia molekularna z cytogenetyką, Cytogenetyka i inżynieria chromosomowa, Cytogenetyka klasyczna, Biologia chromosomów, Epigenetyka, Genomika i epigenetyczna regulacja ekspresji genu, Mutacje i mutageneza, Metody badań mikroskopowych, Wpływ czynników środowiskowych na genom i epigenom (na kierunkach: Biologia, Biotechnologia, Biologiczne Podstawy Kryminalistyki, Genetyka i inżynieria chromosomowa, Ochrona i Inżynieria Środowiska Przyrodniczego, Mikrobiologia).

W okresie od 2009-2018 byłam promotorem 16 prac magisterskich (kierunek: Biotechnologia, Biologiczne Podstawy Kryminalistyki) oraz 14 prac licencjackich (kierunek: Biotechnologia). Obecnie jestem promotorem dwóch osób wykonujących prace magisterskie

(kierunek: Biotechnologia, Biologiczne Podstawy Kryminalistyki) oraz jednej osoby wykonującej pracę licencjacką (kierunek: Biotechnologia).

Sprawowałam również opiekę nad Sekcją Cytogenetyki Koła Naukowego Biologów Komórki Matrix (2006-2011) działającego przy Katedrze Biologii Komórki. Prowadziłam także praktyki zawodowe dla studentów Wydziału Biologii z kierunków Biotechnologia (III rok I°) oraz Genetyka i Biologia Eksperymentalna (III rok I°).

W ramach działalności dydaktycznej w latach 2006-2011 byłam opiekunem roku na kierunku Biotechnologia I i II stopień, natomiast od 2014 roku jestem opiekunem roku kierunku Biologia I i II stopień, powołanym przez Prodziekana ds. Studentów Wydziału Biologii US. Dwukrotnie otrzymałam nagrodę Samorządu Studenckiego Wydziału Biologii (Mentor Wydziału Biologii) zajmując I miejsce w konkursie na najlepszego nauczyciela akademickiego w 2010 i 2016 roku.

Angażowałam się w zajęcia promocyjne mające na celu popularyzację nauki w środowisku lokalnym. Organizowałam i prowadziłam zajęcia laboratoryjne z zakresu badań mikroskopowych, cytogenetycznych i biologii molekularnej w ramach akcji „Noc Biologów” i „Wiosna Biologów” organizowanych przez Wydział Biologii US (2011-2019). Brałam również udział w organizacji Namiotu Eksperymentów podczas szczecińskiej Nocy Naukowców w latach 2008-2009. Od 2007 roku aktywnie uczestniczę w prowadzeniu zajęć laboratoryjnych i wykładów w ramach Zachodniopomorskiego Festiwalu Nauki, od 2014 roku odpowiadam za organizację Zachodniopomorskiego Festiwalu Nauki na Wydziale Biologii US jako Koordynator Wydziałowy powołany przez Dziekana WB.

Prowadziłam również wykłady z zakresu epigenetyki w szkołach ponadgimnazjalnych. A także zajęcia laboratoryjne z zakresu analizy włosów ludzkich dla uczniów klasy kryminalistycznej LO nr VII w Szczecinie, w latach 2016-2019.

Byłam opiekunem naukowym pracy przygotowywanej na Olimpiadę Biologiczną w roku szkolnym 2013/2014 oraz 2014/2015 uczennicy XIII LO w Szczecinie, która została wyróżniona na etapie okręgowym olimpiady, natomiast w 2015 roku zdobyła tytuł laureata Olimpiady Biologicznej.

Od 2016 roku jestem członkiem Komitetu Okręgowego Olimpiady Biologicznej, odpowiedzialnym za realizację zadań związanych z przeprowadzeniem zawodów I i II stopnia Olimpiady Biologicznej w województwie zachodniopomorskim i lubuskim.

W okresie 2008-2013 byłam członkiem Zespołu Kierunkowego ds. Jakości i Programów Kształcenia dla kierunku Biotechnologia. Za efektywną pracę nad jakością programu kształcenia zostałam wyróżniona w 2012 roku Nagrodą zespołową JM Rektora Uniwersytetu Szczecińskiego za szczególne osiągnięcia dydaktyczne. W kolejnych latach 2014-2017 byłam powołana przez Dziekana WB US na członka Zespołu Wydziałowego ds. Jakości i Programów Kształcenia Wydziału Biologii US. Wraz zespołem opracowaliśmy Wydziałowy System Zapewnienia Jakości Kształcenia obowiązujący na WB US.

W ramach działalności organizacyjnej w latach 2008-2012 reprezentowałam grupę niesamodzielną pracowników naukowo-dydaktycznych w Radzie Wydziału Biologii US będąc jej członkiem. W obecnej kadencji (2015-2019) również powierzono mi tę funkcję. Od 2016 roku, jako przedstawiciel niesamodzielną pracowników naukowo-dydaktycznych Wydziału Biologii jestem członkiem Senatu Uniwersytetu Szczecińskiego, w którym powierzono mi dodatkową funkcję członka Komisji Skrutacyjnej Senatu US.

W 2016 roku Dziekan WB powołał mnie jako członka Komisja ds. Wydawnictw Wydziału Biologii US na okres 2016-2020. Ponadto, od 2015 roku JM Rektor Uniwersytetu Szczecińskiego ustanowił mnie członkiem Rady Monitorującej projekt Centrum Biologii Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii, której celem jest ocena realizacji skutków projektu.

*Magdalena  
Achrem*