

**AUTOREFERAT  
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU  
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

**dr Kamil Frankowski**

**Bydgoszcz 2017**

**I. Imię i nazwisko:**

Kamil Frankowski

**II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

**1. Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie fizjologii roślin**

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, 2008

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Regulowane przez światło oraz IAA geny kodujące syntazy i oksydazy ACC u *Pharbitis nil* oraz ich znaczenie w mechanizmie kwitnienia”

Promotor: prof. dr hab. Jan Kopcewicz.

Recenzenci: prof. dr hab. Franciszek Dubert (Instytut Fizjologii Roślin imienia Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk, Kraków), prof. dr hab. Stefan Malepszy (Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, SGGW, Warszawa).

**2. Dyplom magistra biologii w zakresie fizjologii roślin**

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, 2000

Tytuł pracy magisterskiej: „Izolacja białek oddziałujących z fitochromem w szlaku transdukcji sygnału świetlnego”.

Promotor: prof. dr hab. Jan Kopcewicz

Recenzent: prof. dr hab. Stanisław Kowalczyk, prof. dr hab. Andrzej Tretyn

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

1. 28.02.2010 – 1.10.2009, adiunkt w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

2. 01.10.2004 – 30.09.2009, asystent w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

#### **IV. Ukończone kursy, szkolenia, warsztaty i staże naukowe**

1. Miesięczny staż w Laboratorium Mikrobiologicznym Szpitala Dziecięcego, 2015r.
2. Miesięczny staż w Narwiańskim Parku Narodowym, Kurowo, 2015r.
3. „Jednodniowe warsztaty z zakresu użytkowania systemu LightCycler” Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o., Toruń, 2010r.
4. Tygodniowy kurs aplikacyjny „IH-1000 and IH-Com” –DiaMed, Szwajcaria, 2010r.
5. “Mikromacierze DNA oraz analiza wyników” MBS, Warszawa, 2009r.
6. “Real-Time PCR” Polska Akademia Nauk i MBS, Warszawa, 2005r.
7. Studium Pedagogiczne, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, 2000r.
8. Miesięczny udział w Letniej Szkole Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej, Gdańsk, 1999r.
9. Kurs “Molecular Cloning” – DNA Gdańsk i Politechnika Gdańska, 1999r.

#### **V. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311**

##### **a) Tytuł osiągnięcia naukowego**

**„Hormonalne i molekularne czynniki regulujące nodulację i odcinanie organów generatywnych lubinu żółtego”**

##### **b) Publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**

(autorzy <sup>a</sup>, rok wydania, tytuł publikacji, wydawnictwo, tom, strony, IF <sup>b</sup>, MNiSW <sup>c</sup>)

<sup>a</sup> Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5.

<sup>b</sup> Wartość IF wg JCR dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z rokiem ich opublikowania.

<sup>c</sup> Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z rokiem ich opublikowania.

- 1. Frankowski K,** Wilmowicz E, Kućko A, Mączkowski R, Marciniak K, Kopcewicz J. The generative development of traditional and self-completing (restricted branching) cultivars of white lupin (*Lupinus albus* L.), yellow lupin (*L. luteus* L.) and narrow-leafed lupin (*L. angustifolius* L.) grown under different phytotron conditions. *Plant Breeding and Seed Science* 2014, 69:47-57 (punkty MNiSW 7)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji wszystkich badań, zbadaniu wpływu rodzaju materiału glebowego oraz nawożenia na rozwój generatywny odmian tradycyjnej Butan i epigonalnej Boros łubinu białego uprawianych w warunkach fitotronowych; koordynacji i współudziale w wykonywaniu pozostałych doświadczeń, zbieraniu danych, analizie statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników. Napisałem również wstępną wersję manuskryptu. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy szacuję na 75%.*

- 2. Frankowski K,** Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Kopcewicz J. Molecular cloning of *BLADE-ON-PETIOLE* gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 2015a, 179:35-39 (IF 2,971; punkty MNiSW 35)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji wszystkich badań, optymalizacji warunków reakcji RT-qPCR, współuczestnictwie w identyfikacji cDNA LIBOP i wykonaniu analiz RT-qPCR, interpretacji uzyskanych wyników badań. Koordynowałem wykonanie wszystkich doświadczeń. Napisałem wstępną wersję manuskryptu i wykonałem korektę autorską. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy szacuję na 65%.*

- 3. Frankowski K,** Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Kopcewicz J.

Profiling the *BLADE-ON-PETIOLE* gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 2015b, 37:220 DOI 10.1007/s11738-015-1972-y (IF 1,563; punkty MNiSW 25)

*Mój wkład w realizację pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części analiz mikroskopowych, wysianiu i współudziale w zbiorze materiału roślinnego, izolacji kwasów nukleinowych użytych do zbadania zmian aktywności transkrypcyjnej genu *LlBOP*, współudziale w analizie uzyskanych wyników. Napisałem wstępną wersję manuskryptu i wykonałem korektę autorską. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy szacuję na 75%.*

- 4. Wilmowicz E, Frankowski K, Kućko A, Świdziński M, Alché JD, Nowakowska A, Kopcewicz J.** The influence of abscisic acid on ethylene biosynthesis pathway in the functioning of flower abscission zone in *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 2016, 206:49-58 (IF 2,971; punkty MNiSW 35)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współuczestnictwie w tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu eksperymentów, pomocy w przygotowaniu materiału roślinnego do analiz immunolokalizacji i ekspresji genów, współuczestnictwie w oznaczeniu poziomu endogennego ABA i ACC, pomocy w wykonywaniu reakcji immunocytochemicznych, izolacji kwasów nukleinowych użytych do badania ekspresji genów, interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu tekstu i przygotowaniu korekty manuskryptu. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy szacuję na 60%.*

- 5. Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Alché JD, Kopcewicz J.** Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2017, DOI: 10.5586/asbp.3540 (IF 1,213; punkty MNiSW 25)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale w zbiorze materiału roślinnego, wykonaniu analiz RT-qPCR, współudziale w identyfikacji cDNA *LlACS* i *LlACO*, oznaczeniach chromatograficznych ACC, pomocy w reakcjach immunolokalizacji ACC, analizie statystycznej, interpretacji uzyskanych wyników oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu i wykonaniu korekty autorskiej. Mój udział procentowy w powstanie tej pracy szacuję na 60%.*

- c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Cytowania prac naukowych, stanowiących osiągnięcie napisano pogrubioną czcionką. Wszystkie cytowania umieszczono w spisie literatury.

## Wprowadzenie

Polityka ekologiczna Unii Europejskiej zmierza do powiązania rozwoju gospodarczego z ochroną zasobów naturalnych, czego istotą jest otrzymanie optymalnego i dobrego pod względem jakości produktu, przy minimalnej ingerencji w środowisko naturalne. Zgodnie z tą tendencją, dąży się do zwiększenia wykorzystania polskich surowców białkowych, które początkowo miałyby uzupełnić, a z czasem zastąpić surowce dotychczas masowo importowane i wykorzystywane w przemyśle paszowym, m.in. śrutę sojową. Zakłada się, że podstawowe źródło białka mogą stanowić nasiona roślin z rodziny bobowatych (*Fabaceae*), m.in. łubinów. Gatunek ten posiada szereg zalet ekonomicznych, proekologicznych oraz agronomicznych. Łubiny stanowią dobry beznakładowy przedplon dla roślin następczych (Bieniaszewski i in. 2007; Szukała 1993; Szukała i in. 1999). Analiza wymagań glebowo klimatycznych poszczególnych gatunków roślin strączkowych wykazuje, że na glebach najsłabszych, które w Polsce stanowią przewagę areалу uprawowego, łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) ma szansę stać się podstawową rośliną wysokobiałkową.

Spośród wielu pożądanых cech charakteryzujących *L. luteus* najważniejszą jest symbioza z bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Bradhyrhizobium lupini*, umożliwiająca wykorzystanie azotu atmosferycznego, co zmniejsza konieczność stosowania sztucznych nawozów i obniża koszty upraw. Syntetyzowane w korzeniach i wydzielane do ryzosfery flawonoidy indukują u bakterii biosyntezę lipo-chito-oligosacharydowych czynników Nod, które aktywują proces brodawkowania (Fernández-Pascual i in. 2007). Grupa prostetyczna obecnej w brodawkach leghemoglobiny (Llb) jest syntetyzowana przez bakteroidy, natomiast część białkowa powstaje w komórkach roślinnych. Leghemoglobina występuje w brodawkach w formie zawierającej Fe(II) i wykazuje wysokie powinowactwo do tlenu, dzięki czemu zapewnia odpowiednie warunki tlenowe niezbędne dla aktywności nitrogenazy i efektywnego wiązania N<sub>2</sub> (Rajasekaran i in. 2011). Wyniki badań prowadzonych u *Medicago truncatula* i *Pisum sativum* wskazują, że w proces tworzenia i funkcjonowania brodawek zaangażowane są czynniki transkrypcyjne BOP (*BLADE-ON-PETIOLE*) (Couzigou i in. 2012). Należą one do rodziny białek systemicznej odpowiedzi obronnej roślin indukowanej przez patogeny - NPR1 (ang. *non-expressor of PRI*) (Ha i in. 2003; 2004).

Dzięki dobrze rozwiniętemu palowemu systemowi korzeniowemu łubiny mogą pobierać z głębszych warstw gleby znaczne ilości wapnia, fosforu i potasu. Resztki poźniwe pozostawiają w glebie około 15–35 kg P·ha<sup>-1</sup>, 80–110 kg K·ha<sup>-1</sup> i 20–30 kg Ca·ha<sup>-1</sup>, co sprzyja uzyskiwaniu większych plonów roślin następczych (Szukała 1997). Dodatkowo, gromadzone w nasionach specyficzne białka zapasowe zawierające korzystny skład aminokwasowy, sprawiają, że odmiany *L. luteus* o niskiej zawartości alkaloidów są przerabiane na paszę dla monogastrycznych zwierząt hodowlanych. Łubin żółty należy więc do gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym (Podleśny i Strobel 2007). Pomimo wspomnianych zalet powierzchnia jego uprawy w Polsce jest jednak niewielka, a udział w strukturze zasiewów nie przekracza 1% (Podleśny 2005). Istotnym problemem bezpośrednio rzutującym na niski areał upraw łubinu żółtego jest jego obniżone plonowanie wynikające z przedwczesnego i nadmiernego odcinania organów generatywnych, zwłaszcza kwiatów. U tego gatunku na I piętrze kwiatostanu opada do 60%, na drugim niemal 90%, a na wyższych piętrach kwiatostanu wszystkie zawiązane kwiaty (Prusiński i Borowska 2002). Początkowo sądzono, że odpadanie organów generatywnych może wynikać z niedostatecznego zapylenia kwiatów (Rognli 2007), różnej dostępności asymilatów i substancji mineralnych (Bangerth 1989) oraz bodźców stresowych, takich jak atak patogenów, niedobór światła, susza czy zranienie (Estronell i in. 2013; Sawicki i in. 2015). Niemniej jednak, u podstaw wszystkich odpowiedzi fizjologicznych roślin leży aktywność specyficznych genów, których ekspresja może być regulowana przez szereg czynników w tym fitohormony. Związki te działają na zasadzie równowagi, co oznacza, iż zakłócenia w biosyntezie lub szlaku transdukcji sygnału jednego z nich aktywują lub dezaktywują funkcjonowanie drugiego. Skutki działania różnych fitohormonów często nakładają się na siebie, dlatego istotną kwestią jest poznanie ich wzajemnych interakcji w regulacji poszczególnych procesów fizjologicznych.

Z uwagi na łatwość uzyskania mutantów oraz roślin transgenicznych większość dotychczasowych badań molekularnych dotyczących utrzymywania się organów generatywnych prowadzona jest na rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*) oraz pomidorze zwyczajnym (*Lycopersicon esculentum*) (Lanahan i in. 1994; Burr i in. 2011). Zidentyfikowane u *A. thaliana* i *L. esculentum* geny *BOP* i *JNT* (*JOINTLESS*) są zaangażowane w odcinanie organów (Mao i in. 2000; McKim i in. 2008). Zagadnienia te są jednak słabo poznane u roślin strączkowych. Opisanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację odcinania organów generatywnych jest istotne dla

podejmowania świadomych działań zmierzających do poprawy ich plonowania. Dlatego celem prac badawczych wchodzących w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego było określenie molekularnych i hormonalnych czynników regulujących proces nodulacji oraz utrzymywanie się organów generatywnych u *L. luteus*.

### Metodologia badań

W początkowym etapie badań materiał roślinny stanowiły tradycyjne i samokończące (epigonalne) odmiany łubinu białego (*Lupinus albus* L.), żółtego (*L. luteus* L.) oraz wąskolistnego (*L. angustifolius* L.). Nasiona łubinu białego i wąskolistnego traktowano przez dobę preparatem przeciwgrzybowym (Vitavax 200 FS/woda, w stosunku 1:2). Do zaprawienia nasion łubinu żółtego zastosowano Sarfun (250ml/100kg nasion). Nasiona wszystkich odmian łubinów szczepiono Nitraginą (3g/1kg nasion). Po dwóch godzinach wysiewano je na głębokość ok. 3-4 cm w doniczkach o pojemności 11 litrów (po 5 nasion w każdej doniczce, w rozstawie ok. 20 cm). Rośliny uprawiano w fitotronie w warunkach długiego dnia (16 h światła + 8 h ciemności), w temperaturze 22°C ± 1°C. Po wykiełkowaniu pierwszych nasion podano nawóz Polifoska 3 w dwóch dzielonych, zgodnych z zaleceniami stosowanymi w uprawie łubinów, dawkach. Szczegółowy opis doświadczeń z uwzględnieniem poszczególnych wariantów badawczych podano w publikacji **Frankowski i in. (2014b)**.

Badania molekularne, biochemiczne i cytologiczne prowadzono wyłącznie na odmianie Taper łubinu żółtego. Do oznaczenia endogennych hormonów (ABA, ACC) zastosowano chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem masowym (GC/MS). Ilościową analizę prowadzono metodą rozcieńczeń izotopowych ze znakowanymi standardami wewnętrznymi. Monitorowano charakterystyczne jony dla badanego związku i odpowiadające im jony w standardach wewnętrznych (**Wilmowicz i in. 2016, Frankowski i in. 2017**).

Identyfikację oraz ekspresję cDNA badanych genów wykonano z wykorzystaniem następujących technik: izolacja kwasów nukleinowych, PCR (tradycyjny, RT-PCR, 5'- i 3'-RACE-PCR, Real Time PCR) i klonowanie molekularne w systemach bakteryjnych. Specyficzność reakcji zapewniło zastosowanie komplementarnych starterów i odpowiednich sond (**Frankowski i in. 2015a, 2015b, 2017; Wilmowicz i in. 2016**).

W celu określenia lokalizacji komórkowej i tkankowej ACC i ABA zastosowano metodę immunofluorescencyjną z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych (ACC-Ab



oraz ABA-Ab) i wtórnych znakowanych fluorochromem Alexa Fluor 488 (**Wilmowicz i in. 2016, Frankowski i in. 2017**).

### Uzyskane wyniki

W początkowym etapie doświadczeń określono wpływ materiału glebowego oraz nawożenia mineralnego na rozwój tradycyjnych i samokończących (epigonalnych) odmian łubinu białego (Butan i Boros), żółtego (Mister i Taper) i wąskolistnego (Kadryl i Sonet) uprawianych w warunkach fitotronowych (**Frankowski i in. 2014a**). Najlepszy dla badanych procesów fizjologicznych był materiał glebowy klasy V (Butan, Mister, Boros, Sonet) oraz klasy IIIa (Kadryl, Mister, Taper, Boros, Sonet). W przypadku wszystkich odmian łubinów rosnących w optymalnych warunkach glebowych nawożenie zwiększało liczbę wytwarzanych kwiatów. Jednakże, zjawisku temu towarzyszyło podniesienie stopnia aborcji tych organów u roślin odmiany Boros i Mister. Z kolei, u odmian Taper i Kadryl obserwowano obniżenie intensywności tego procesu. Ten sam zabieg agrotechniczny odpowiednio zmniejszał lub zwiększał odcinanie kwiatów u roślin odmiany Sonet uprawianych w materiale glebowym klasy IIIa i V i jednocześnie nie miał wpływu na aborcję tych organów u odmiany Butan (**Frankowski i in. 2014a**). Uzyskane wyniki badań pozwoliły ustalić optymalne warunki upraw fitotronowych łubinów.

Z uwagi na to, że u *M. truncatula* i *P. sativum* czynniki transkrypcyjne BOP regulują prawidłową nodulację, w kolejnym etapie badań po raz pierwszy u *L. luteus* zidentyfikowano sekwencję cDNA genu *BLADE-ON-PETIOLE* (*LIBOP*, NCBI nr KC792647.1) (**Frankowski i in. 2015a**). W obrębie przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIBOP (486 aa) wykazano obecność konserwowanych domen i motywów charakterystycznych dla białek z rodziny NPR1, tj. czterech powtórzeń ankirynowych (ANK1-4) odpowiedzialnych za interakcje między białkami oraz motyw BTB/POZ zawierający resztę Cys32, która reguluje oligomeryzację białek. Porównanie przewidywanej sekwencji LIBOP z wytypowanymi przez program BlastP homologami wykazało wysokie podobieństwo do LaNOOT-BOP-COCH (99%) z *L. angustifolius* oraz LjBTB/POZ (82%) z *Lotus japonicus*. Ekspresja *LIBOP* oraz *LILbI* - genu kodującego leghemoglobinę nadającą brodawkom czerwone zabarwienie - była wyższa w górnej części korzeni podczas tworzenia brodawek w porównaniu do części dolnej. W czasie rozwoju tych struktur transkrypt *LIBOP* utrzymywał się na względnie stałym poziomie, jednakże był znacząco niższy niż *LILbI*. Co więcej, aktywność transkrypcyjna *LILbI* była skorelowana z intensywnością czerwonego zabarwienia

brodawek (**Frankowski i in. 2015a**). Na podstawie wzorca ekspresji *LIBOP* można stwierdzić, że gen ten jest zaangażowany w regulację nodulacji, a tym samym wiązanie azotu, co jest ważnym procesem bezpośrednio przekładającym się na plonowanie.

Poza procesem nodulacji czynniki transkrypcyjne BOP są zaangażowane również w regulację powstawania strefy odcinania (AZ), w której dochodzi do separacji organów. Dlatego w kolejnej pracy określono wzorzec aktywności transkrypcyjnej genu *LIBOP* podczas powstawania i funkcjonowania AZ, odpowiedzialnej za utrzymywanie organów generatywnych, co jest kolejnym czynnikiem determinującym plonowanie *L. luteus*. Na podstawie wyników badań cytologicznych wykazano, że AZ powstaje u podstawy szypułek rozwijających się organów generatywnych (**Frankowski i in. 2015b**). Łatwe do odróżnienia, małe, izodiametryczne komórki o gęstej cytoplazmie, pojawiają się w szypułkach w pełni rozwiniętych, nieotwartych kwiatów. Zmiany na poziomie komórkowym korelują ze zwiększonym poziomem transkryptu *LIBOP* w AZ osiągając maksymalną wartość we fragmentach tkanek zawierających w pełni wykształconą strefę odcinania. Po zapyleniu kwiatów oraz podczas rozwoju strąków aktywność transkrypcyjna badanego genu znacznie się obniża. W AZ naturalnie odpadających kwiatów oraz w AZ aktywowanej przez usunięcie kwiatu poziom mRNA *LIBOP* był odpowiednio trzy- i dziesięciokrotnie wyższy w odniesieniu do kontroli. Kwas abscysynowy (ABA) i etylen (ET), powszechnie stosowane jako stymulatory odcinania organów generatywnych, podnosiły aktywność transkrypcyjną *LIBOP*, podczas gdy aplikacja inhibitorów ich biosyntezy (AVG, NDGA) lub działania (NBD), jak również prekursora ET (ACC, kwas 1-amino-cyclopropano-1-karboksylowy) nie wywoływała znaczących zmian w poziomie mRNA badanego genu (**Frankowski i in. 2015b**). Uzyskane wyniki wskazują, że *LIBOP* jest zaangażowany zarówno w powstawanie strefy odcinania, jak i jej funkcjonowanie.

Odcinanie organów generatywnych warunkowane jest aktywacją w pełni wykształconej AZ, a proces ten jest regulowany m.in. przez fitohormony, w tym ET. Z tego powodu uznano za konieczne zbadanie jego roli w regulacji odcinania organów generatywnych u *L. luteus* (**Frankowski i in. 2017**). W warunkach fitotronowych 40% kwiatów wytwarzanych przez roślinę ulegało samoczynnej aborcji. Pod wpływem egzogennych ACC i ET ilość odpadających kwiatów wzrastała odpowiednio do 49% i do 95%. Z kolei, zastosowanie inhibitora biosyntezy etylenu (AVG) odwracało stymulujące działanie tego hormonu na odcinanie organów generatywnych, w taki sposób, że aborcji uległo tylko 15% kwiatów. Co więcej, AVG powodował również

spadek samoczynnej aborcji w porównaniu do roślin kontrolnych. Podobny efekt do AVG odnotowano po zastosowaniu NBD, który znacząco obniżał aborcję kwiatów. W dalszym etapie prac zidentyfikowano pełne sekwencje kodujące syntazę i oksydazę ACC (*LIACS*, GeneBank acc. no KF573522.1 i *LIACO*, GeneBank acc. no KF573523.1) oraz zbadano ich ekspresję w AZ. W przewidywanej sekwencji aminokwasowej *LIACS* stwierdzono występowanie charakterystycznych dla syntaz ACC jedenastu zachowywanych reszt aminokwasowych, które są istotne dla ich aktywności enzymatycznej m.in. reszta Lys wchodząca w skład centrum aktywnego i zaangażowana w wiązanie kofaktora (PLP) oraz substratu (SAM); reszta Glu odpowiedzialna za specyficzność substratową, reszta Ser stanowiąca część charakterystycznego tripeptydu Arg/Lys-Leu/Val-Ser - prawdopodobne miejsce fosforylacji. Z kolei, sekwencja białka *LIACO* zawiera charakterystyczny motyw Hsp177-X-Asp179-X(54)-Hsp234 tworzący kieszeń wiążącą kofaktor oraz motyw Arg244-X-Ser246 wiążący kosubstrat. W obrębie charakterystycznej dla oksydaz ACC sekwencji aminokwasów zlokalizowane są, istotne dla aktywności enzymatycznej, reszty Lys i Arg. Z uwagi na obecność sekwencji kodujących opisane regiony oraz reszty aminokwasowe w zidentyfikowanych *LIACS* i *LIACO* można przypuszczać, że geny te kodują funkcjonalne białka enzymatyczne. Na podstawie porównania filogenetycznego przewidywanych sekwencji aminokwasowych białka *LIACS* stwierdzono najwyższe podobieństwo do białek LaACS3 (97%) oraz VrACS (85%) zidentyfikowanych odpowiednio u *L. albus* i *Vigna radiata*. Z kolei, białko *LIACO* wykazywało najwyższą (86%) homologię do GsACO, GmACO i VrACO z *Glycine soja*, *Glycine max* i *Vigna radiata*. Aktywność transkrypcyjna zarówno *LIACS* jak i *LIACO* wzrastała w szypułkach w pełni rozwiniętych kwiatów i młodych strąków. W AZ szypulek naturalnie odpadających kwiatów poziom mRNA badanych genów był odpowiednio dwu- i trzykrotnie wyższy niż w kontroli. Zmianom tym towarzyszyła akumulacja ACC, który specyficznie zlokalizowano w komórkach AZ. Dodatkowo, odcięcie kwiatu u jego podstawy, prowadzące do aktywacji AZ, powodowało stopniowy wzrost ekspresji *LIACS* i *LIACO* (Frankowski i in. 2017). Podsumowując, u *L. luteus* funkcjonuje zależny od ET szlak kontrolujący odcinanie organów generatywnych. Zmiany zarówno aktywności transkrypcyjnej genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę tego fitohormonu, jak i zawartości ACC wskazują, że ET odgrywa istotną rolę w tworzeniu i funkcjonowaniu AZ u *L. luteus*.

U roślin wiele efektów fizjologicznych jest wypadkową interakcji zachodzących między fitohormonami. Silnym stymulatorem odcinania organów u licznych gatunków roślin, obok ET, jest ABA. Dlatego celowym było wykonanie serii doświadczeń określających interakcje obu hormonów w kontroli odcinania organów generatywnych u *L. luteus*. Egzogenny ABA stymulował odcinanie kwiatów, a efekt ten był odwracany przez zastosowanie inhibitora jego biosyntezy (NDGA) (Wilmowicz i in. 2016). Potwierdzeniem roli ABA w regulacji odcinania organów generatywnych była jego akumulacja w komórkach aktywowanej AZ. Ponadto, aplikacja NDGA prowadziła również do obniżenia poziomu siły sygnału tego hormonu w komórkach strefy odcinania. Jednoczesna aplikacja ABA oraz inhibitora działania ET (NBD) całkowicie zahamowała odcinanie kwiatów *L. luteus*. Dodatkowo, ABA stymulował ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę ET (*LIACS*, *LIACO*), jak również podnosił poziom prekursora tego hormonu. Jednocześnie, należy zaznaczyć, że ACC był specyficznym zlokalizowany w komórkach AZ. Zahamowanie biosyntezy ABA przez NDGA prowadziło natomiast do obniżenia poziomu ekspresji *LIACS* i *LIACO*, jak również zawartości ACC i poziomu jego sygnału w komórkach AZ (Wilmowicz i in. 2016). Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że egzogenny ABA stymuluje odcinanie organów generatywnych u *L. luteus* poprzez podniesienie poziomu aktywności transkrypcyjnej syntazy i oksydazy ACC oraz samego ACC.

### Dyskusja

Pomimo wielu lat badań i jeszcze dłuższej tradycji uprawy roślin strączkowych w Polsce wciąż niewystarczająco poznane są podstawy biochemiczne i genetyczne całego szeregu aspektów związanych z ich morfogenezą. Opisane molekularne mechanizmy regulujące wybrane procesy wzrostu i rozwoju u gatunków modelowych, m.in. *A. thaliana* nie są tak uniwersalne, jak dotychczas uważano. Dlatego istnieje uzasadniona potrzeba poszukiwania nowych gatunków modelowych, m.in. spośród roślin uprawnych, a zwłaszcza strączkowych. Zdobyta dzięki nim wiedza obok poznawczego będzie miała także aspekt praktyczny.

Plonowanie roślin strączkowych w Polsce jest znacznie ograniczone z uwagi na naturalnie występujące niekorzystne warunki glebowe i klimatyczne (Kotecki 1990). Zależy także od działania czynników wewnętrznych, m.in. fitohormonów i innych

cząsteczek sygnałowych, które wpływają na takie procesy jak np. prawidłowy wzrost i funkcjonowanie korzenia oraz morfologia kwiatów i utrzymywanie się organów generatywnych (Prusiński i Borowska 2002). Dlatego w pracach wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zidentyfikowano i zbadano ekspresję genów zaangażowanych w nodulację oraz powstawanie i funkcjonowanie strefy odcinania organów generatywnych (*LIBOP*, *LIACS*, *LIACO*, *LILb1*) (Frankowski i in. 2015a; 2015b). Ponadto określono zawartość oraz lokalizację ABA i ACC w komórkach AZ szypulek kwiatów (Wilmowicz i in. 2016, Frankowski i in. 2017). Wykonano także szereg analiz fizjologicznych i genetycznych mających na celu zbadanie roli i wzajemnych interakcji ET i ABA w procesie odcinania kwiatów.

Z uwagi na dużą zmienność warunków prowadzone dotychczas uprawy polowe lub wazonowe, nie pozwalały na jednoznaczną interpretację wyników badań molekularnych. Dlatego w pierwszym etapie doświadczeń określono warunki upraw fitotronowych wybranych odmian łubinów białego, żółtego i wąskolistnego (Frankowski i in. 2014a). Rośliny uprawiane w fitotronie charakteryzowały się przyspieszonym kwitnieniem, były mniejsze niż te uprawiane na polu, jednak uzyskiwane plony były porównywalne. Optymalizacja warunków upraw fitotronowych łubinów stanowiła punkt wyjścia do dalszych badań mających na celu poznanie wpływu molekularnych i hormonalnych czynników regulujących nodulację i odcinanie organów generatywnych u tych roślin.

Dotychczas łubin biały jako roślina modelowa był powszechnie stosowany w badaniach nad mechanizmami nabywania tolerancji na stres pokarmowy (Johnson i in. 1996). Jednakże, w naszych warunkach klimatycznych, w przeciwieństwie do łubinu żółtego, zarówno łubin biały, jak i wąskolistny nie są roślinami o dużej wartości użytkowej. Dlatego w oparciu o dotychczasową wiedzę i wyniki wstępnych analiz fizjologicznych oraz molekularnych do dalszych etapów badań wybrano *L. luteus*. Użyta w badaniach samokończąca, szybko i równomiernie dojrzewająca odmiana Taper charakteryzuje się wysokim współczynnikiem plonowania. Ponadto, spośród wszystkich łubinów uprawianych w Polsce zawartość białka w nasionach oraz niski poziom substancji antyżywniowych sprawia, że łubin żółty może stać się rodzimą rośliną wysokobiałkową i stanowić alternatywę dla importowanych surowców paszowych (Podleśny i Strobel 2007). Dodatkowo, uprawa tego gatunku w materiale glebowym klasy V, ubogim w substancje mineralne, jest najbardziej korzystna ze względu na zdolność *L. luteus* do wiązania azotu atmosferycznego (20 do 200kg N/ha) i

w konsekwencji wzbogacanie gleby w ten ważny makroelement (Podslesny i Brzóska 2006).

Z uwagi na ważne funkcje jakie odgrywają czynniki transkrypcyjne BOP w procesie nodulacji u innych gatunków roślin (Cuozigou i in. 2012; Khan i in. 2014) zidentyfikowano sekwencję kodującą genu *LIBOP* i zbadano jego ekspresję podczas rozwoju korzenia i brodawek u *L. luteus*. Aktywność transkrypcyjna *LIBOP* była wyższa w części korzenia zawierającej brodawki (Frankowski i in. 2015a). U *M. truncatula* i *P. sativum* ekspresja ortologów genu *BOP* - *NOOT* i *COCH* była najwyższa w górnej części korzenia (Cuozigou i in. 2012). Z kolei, u gatunków niewchodzących w symbiozę z bakteriami brodawkowymi, jak np. *A. thaliana* nie stwierdzono obecności mRNA *BOP1* w tym organie (Ha i in. 2004). Wykazano, że *NOOT* i *COCH* determinują aktywność merystematyczną komórek i biorą udział w utrzymywaniu komunikacji pomiędzy strefą merystematyczną a rejonami bocznymi - korą i tkankami przewodzącymi brodawek (Ha i in. 2003). U *L. luteus* podwyższony poziom mRNA *LIBOP* w brodawkach korzeniowych, korelował z akumulacją transkryptu *LILb1* i wzmożoną aktywnością leghemoglobiny wskazując, że *LIBOP*, podobnie jak jego ortologi zidentyfikowane u innych gatunków roślin, jest zaangażowany nie tylko w tworzenie brodawek korzeniowych, ale także w ich właściwe funkcjonowanie (Frankowski i in. 2015a).

U *A. thaliana*, *P. sativum*, *M. truncatula*, *L. japonicus* i *Nicotiana tabacum* czynniki transkrypcyjne BOP warunkują powstawanie strefy odcinania (Ha i in. 2003; McKim i in. 2008; Wu i in. 2012; Cuozigou i in. 2016), co jest pierwszym etapem separacji organów kwiatowych. U *L. luteus*, jak również innych gatunków roślin m.in. *A. thaliana* i *N. tabacum* wykazano, że AZ jest zbudowana z małych izodiametrycznych komórek, a jej powstawaniu towarzyszą zmiany ekspresji *LIBOP* (Frankowski i in. 2015a). Jego aktywność transkrypcyjna jest wysoka w różnicującej się AZ kwiatów, podczas gdy w pełni wykształconej AZ strąków poziom mRNA *LIBOP* jest znacznie niższy, co świadczy o jego udziale w powstawaniu tych specyficznych komórek. Wyniki badań prowadzonych u *A. thaliana* wskazują, że również *BOP1* i *BOP2* ulegały ekspresji tuż przed odcięciem organu, a mutanty z defektami w tych genach charakteryzowały się brakiem AZ (McKim i in. 2008). Mechanizm działania *BOP* w różnicowaniu komórek AZ nie został jak dotąd poznany. Wiadomo jednak, że u *N. tabacum* obecność transkryptu *NtBOP* jest wymagana dla prawidłowego wzrostu elongacyjnego komórek AZ (Wu i in. 2012).

Odcinanie organów jest procesem związanym z przemianami na poziomie komórkowym zachodzącymi w pełni wykształconej strefie odcinania. Ważnymi koordynatorami tych procesów są fitohormony, które kontrolują nie tylko powstawanie, i funkcjonowanie AZ, ale również tworzenie pokładu rozdzielającego oraz tkanki zabezpieczającej bliznę. Głównymi stymulatorami odcinania organów generatywnych są ABA i ET, które regulują działanie m. in. enzymów hydrolitycznych (poligalaktouronazy, peroksydazy, esterazy, ekspansyny) i tym samym decydują o aktywacji komórek pokładu rozdzielającego w AZ (Roberts i in. 2000; Van Doorn 2002; Taylor i Whitelaw 2001). U *L. luteus* zarówno ABA, ET jak i sztuczna aktywacja AZ przez odcięcie kwiatu powodowały silną akumulację *LIBOP* (Frankowski i in. 2015a). Wysoki poziom mRNA badanego genu zaobserwowano także w aktywnej AZ. Wyniki tych pionierskich doświadczeń dotyczących udziału *LIBOP* w funkcjonowaniu AZ wskazują, że transkrypt tego genu stanowi ważny element mechanizmu regulującego miejsce i czas separacji organów generatywnych u *L. luteus*.

Wyniki badań fizjologicznych potwierdziły, że u *L. luteus*, podobnie jak u innych gatunków roślin (*Olea europaea*, *Beloperone*, *Pachystachus*) (Weis i in. 1988; Woltering 1987) ET jest silnym stymulatorem odcinania kwiatów. Gazowa natura tego hormonu uniemożliwia określenie jego poziomu w szypułkach kwiatów i strąków *L. luteus*, a jedynie produkcję ET przez całą roślinę. Dlatego w kolejnym etapie doświadczeń zidentyfikowano oraz określono wzorce ekspresji genów kodujących syntazę (*LIACS*) i oksydazę (*LIACO*) ACC, katalizujące odpowiednio przekształcenie S-adenozylometioniny (SAM) do ACC oraz utlenianie ACC do ET (Argueso i in. 2007; Frankowski i in. 2007, 2017). W przewidywanej sekwencji aminokwasowej *LIACS* występują m.in. reszta Lys wchodząca w skład centrum aktywnego i zaangażowana w wiązanie kofaktora (PLP) oraz substratu (SAM); reszta Glu odpowiedzialna za specyficzność substratową, reszta Ser stanowiąca część charakterystycznego tripeptydu Arg/Lys-Leu/Val-Ser - prawdopodobne miejsce fosforylacji. Z kolei, sekwencja białka *LIACO* zawiera charakterystyczny motyw Hsp177-X-Asp179-X(54)-Hsp234 tworzący kieszeń wiążącą kofaktor oraz motyw Arg244-X-Ser246 wiążący kosubstrat. W obrębie charakterystycznej dla oksydaz ACC sekwencji aminokwasów zlokalizowane są, istotne dla aktywności enzymatycznej, reszty Lys i Arg. Na podstawie wykonanych analiz bioinformatycznych stwierdzono, że uzyskane sekwencje nukleotydowe kodują białka enzymatyczne. Poziom ekspresji *LIACS* i *LIACO*, jak również prekursora etylenu – ACC – były wyższe w szypułkach kwiatów naturalnie odpadających niż w szypułkach z

nieaktywną strefą odcinania (**Frankowski i in. 2017**). Co więcej, ACC był silnie lokalizowany w komórkach AZ, przy czym prawdopodobnie jego znaczna część pochodzi z syntezy *de novo*. Nie jest również wykluczone, że związek ten może być uwalniany z przedziałów komórkowych (np. z wakuoli), a także dystrybuowany wiązkami przewodzącymi z innych tkanek. Gómez-Cadenas i in. (2000) zaobserwowali, że ACC może być transportowany ksylemem i floemem, z kolei Tophof i in. (1989) oraz Saftner i Martin (1993) wykazali, że u jęczmienia, pszenicy i kukurydzy istnieje transport krótkodystansowy pomiędzy komórkami mezofilu.

Prowadzone od wielu lat badania dotyczące odcinania organów (m.in. liści i kwiatów) wskazują, że ABA jest silnym stymulatorem tego procesu (Sagee i Erner 1991; Vernieri i in. 1992; Zacarias i in. 1995; Sexton 1995), choć znane są wyjątki, m.in. u *Begonii* (Hänisch i in. 1973). Stąd, mechanizm działania tego fitohormonu w regulacji odcinania organów wzbudza wiele kontrowersji. Dotychczas, nie udało się ustalić czy jest on bezpośrednim aktywatorem komórek AZ czy też może działać pośrednio, np. poprzez regulację poziomu innych fitohormonów. Pokazano, że w regulacji wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin ABA oddziałuje z ET. Interakcje te mogą mieć charakter synergistyczny lub antagonistyczny, włączając w to zarówno pozytywny, jak i negatywny wzajemny wpływ na biosyntezę oraz szlaki przekazywania sygnałów (Burdon i Sexton 1990; Ghassemian i in. 2000; Beaudoin i in. 2000; Gazzarrini i McCourt 2001; Finkelstein i Gibson 2002; Sharp i LeNoble 2002; Anderson i in. 2004). U *L. luteus* ABA stymuluje odcinanie kwiatów (**Wilmowicz i in. 2016**). Z kolei, jednoczesna aplikacja tego fitohormonu i inhibitora działania ET prawie całkowicie hamowała separację tych organów sugerując, że oba hormony współdziałają ze sobą w tym procesie. Potwierdzeniem istnienia takiej zależności są wyniki uzyskane przez Suttle i Abrams (1993a) na siewkach *Gossypium hirsutum*. Co prawda, u *G. hirsutum* inhibitor biosyntezy ABA obniżał produkcję ET prowadząc do zahamowania odcinania liścieni, to jednak u mutantów pomidora i kukurydzy charakteryzujących się deficytem ABA stwierdzono nadmierne gromadzenie ET (Suttle i Hulststrand 1993b; Sharp 2002). W związku z rozbieżnościami dotyczącymi roli ABA w regulacji biosyntezy ET w kolejnym etapie badań określono poziom i lokalizację prekursora ET oraz zbadano aktywność transkrypcyjną genów kodujących syntazę ACC (*LIACS*) i oksydazę ACC (*LIACO*) w AZ kwiatów *L. luteus*. Obserwowany wzrost poziomu ACC w AZ i wiązkach przewodzących po aplikacji ABA był skorelowany z podwyższoną aktywnością transkrypcyjną *LIACS* i *LIACO* co może wskazywać, że ET pełni rolę



pośrednika w regulowanym przez ABA procesie odcinania kwiatów (**Wilmowicz i in. 2016**). Mimo obniżenia poziomu ACC pod wpływem inhibitora biosyntezy ABA nie stwierdzono różnic w aktywności transkrypcyjnej genów kodujących syntazę oraz oksydazę ACC. Zatem, prekursor ET może być syntetyzowany, jak i transportowany z innych tkanek do miejsca działania. Akumulację ACC po egzogennym ABA obserwowano również u *Citrus sinensis* i *Gossypium* (Gómez-Cadenas i in. 2000). U *Ipomoea nil* stwierdzono natomiast, że ABA stymulował produkcję ET (Wilmowicz i in. 2008), jak również podnosił poziom aktywności transkrypcyjnej genów kodujących syntazy i oksydazy ACC (*PnACS1*, *PnACS2*, *PnACO1*, *PnACO3*) (Frankowski i in. 2014b). Podwyższoną aktywność transkrypcyjną oksydazy ACC obserwowano także przed odcięciem płatków u *Rosa hybrida* (Müller i in. 2000) oraz owoców u *Prunus persica* (Bonghi i in. 2000). Nie można również wykluczyć istnienia niezależnych od ET szlaków kontrolujących odcinanie organów. Jednak, u *L. luteus* indukowane przez ABA odcinanie kwiatów wynika ze stymulującego działania tego hormonu na ekspresję genów kodujących syntazę i oksydazę ACC, podniesienia poziomu ACC i prawdopodobnie w konsekwencji z podwyższonej produkcji ET (**Wilmowicz i in. 2016**).

### Podsumowanie

Czynnikami decydującymi o plonowaniu roślin strączkowych są m.in. właściwie funkcjonujące brodawki korzeniowe umożliwiające symbiozę z bakteriami i wiązanie azotu atmosferycznego oraz wytworzenie i utrzymanie prawidłowo rozwiniętych organów generatywnych. Procesy te są regulowane na poziomie hormonalnym i genetycznym. Wyniki badań stanowiących osiągnięcie naukowe umożliwiły ustalenie nowych faktów dotyczących regulacji wyżej wymienionych procesów. Po zoptymalizowaniu warunków upraw fitotronowych, po raz pierwszy u łubinu żółtego zidentyfikowano mRNA genu *LIBOP* kodującego czynnik transkrypcyjny, który jest zaangażowany w powstawanie i funkcjonowanie brodawek korzeniowych. Przeprowadzono także pionierskie analizy, w których określono, że *LIBOP* odpowiada nie tylko, jak dotychczas uważano, za różnicowanie strefy odcinania kwiatów, ale również za jej aktywność. Cennym osiągnięciem było także wykazanie, że hormonalne modulatory kontrolujące funkcjonowanie strefy odcinania organów generatywnych *L. luteus* wpływają na aktywność transkrypcyjną *LIBOP*. Co więcej, egzogenny kwas

abscysynowy powoduje odcinanie kwiatów poprzez stymulację ekspresji genów (*LIACS*, *LIACO*) kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę etylenu.

Uzyskane wyniki badań wskazują, że nadmierne i przedwczesne odcinanie organów generatywnych łubinu żółtego jest determinowane wieloma czynnikami, a regulacja tego zjawiska ma charakter kompleksowy (aktywność transkrypcyjna genów, endogenny poziom hormonów). Poziom ekspresji badanych genów związanych z biosyntezą i metabolizmem fitohormonów, jak również powstawaniem i aktywacją strefy odcinania zmienia się nie tylko w czasie ontogenezy rośliny czy pod wpływem czynników środowiska, ale jest również regulowany przez same fitohormony. Zatem, modulowanie poziomu mRNA genów związanych z rozwojem kwiatów w celu zwiększenia produktywności łubinu żółtego może być możliwe np. wskutek zastosowania oprysków odpowiednio dobranymi regulatorami wzrostu i rozwoju roślin. Dodatkowo, sam *LIBOP* stanowi potencjalny molekularny marker procesu odcinania organów generatywnych u tego gatunku. Może on w przyszłości posłużyć do wyselekcjonowania odmiany o zmniejszonym stopniu aborcji kwiatów, a tym samym wyższym współczynniku plonowania.

### **Literatura**

- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert Ch, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460 – 3479
- Argueso CT, Hansen M, Kieber JJ (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *J Plant Growth Regul* 26: 92 – 105
- Bangerth F (1989) Dominance among fruits/sinks and the search for correlative signal. *Physiol Plant* 76: 608 – 614
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103 – 1116
- Bonghi C, Tonutti P, Ramina A (2000) Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regul* 31: 35 – 42
- Burdon JN, Sexton R (1990) The role of ethylene in the shedding of red raspberry fruit. *Ann Bot* 66: 111 – 120
- Burr CA, Leslie ME, Orlowski SK, Chen I, Wright CE, Daniels MJ, Liljegren SJ (2011) CAST AWAY, a membrane-associated receptor-like kinase, inhibits organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 156: 1837 – 1850
- Couzigou JM, Zhukov V, Mondy S, Abu el Heba G, Cosson V, Ellis TH, Ambrose M, Wen J, Tadege M, Tikhonovich I, Mysore KS, Putterill J, Hofer J, Borisov AY, Ratet P (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes. *Plant Cell* 24: 4498 – 4510

- Fernández-Pascual M, Pueyo JJ, de Felipe MR, Golvano MP, Lucas MM (2007) Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dyn Soil Dyn Plant* 1: 1 – 16
- Finkelstein R, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development: "cross-talk" or "voices in a crowd"? *Curr Opin Plant Biol* 5: 26 – 32
- Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2007) Regulacja biosyntezy etylenu u roślin. *Post Bioch* 53: 66 – 73
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Mączkowski R, Marciniak K, Kopcewicz J (2014a) The generative development of traditional and self-completing (restricted branching) cultivars of white lupin (*Lupinus albus* L.), yellow lupin (*L. luteus* L.) and narrow-lafed lupin (*L. angustifolius* L.) grown under different phytotron conditions. *Plant Breeding and Seed Science* 69: 47 – 57 - **publikacja wchodząca w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Świeżawska B, Kęsy J, Kopcewicz J (2014b) Ethylene, IAA and ABA interactions in the control of photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Biol Plant* 58(2): 305 –310
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Kopcewicz J (2015a) Molecular cloning of *BLADE-ON-PETIOLE* gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. *J Plnt Physiol* 179: 35 – 39 - **publikacja wchodząca w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Kopcewicz J (2015b) Profiling the *BLADE-ON-PETIOLE* gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiol Plant* 37:220 DOI 10.1007/s11738-015-1972-y - **publikacja wchodząca w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Alché JD, Kopcewicz J. Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2017, DOI: 10.5586/asbp.3540 - **publikacja wchodząca w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**
- Gazzarrini S, McCourt P (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 4: 387 – 391
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117 – 1126
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2000) Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210: 636 – 643
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC (2004) *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45: 1361 –1370
- Ha CM, Kim GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG (2003) The *BLADE-ON-PETIOLE 1* gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130: 161 – 172
- Hänisch ten Cate CH, Bruinsma J (1973) Abscission of flower bud pedicels in *Begonia*. I. Effect of plant growth regulating substances on the abscission with intact plants and with explants. *Acta Bot Neerl* 22: 666 – 674
- Johnson JF, Vance CP, Allan D (1996) Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. *Plant Physiol* 112: 31 – 41
- Khan M, Xu H, Hepworth SR (2014) *BLADE-ON-PETIOLE* genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Science* 215–216: 157–171

- Kotecki A (1990) Wpływ temperatury i opadów na rozwój i plonowanie odmian łubinu żółtego. *Biul Oceny Odm* 20: 91 – 99
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521 – 530
- Mao L, Begum D, Chuang HW, Budiman MA, Szymkowiak EJ, Irish EE, Wing RA (2000) *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406: 910 – 913
- McKim SM, Stenvik GE, Butenko MA, Kristiansen W, Cho SK, Hepworth SR, Aalen RB, Haughn GW (2008) The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* 135: 1537 – 1546
- Müller R, Lind-Iversen S, Stummann BM, Serek M (2000) Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *J Hort Sci Biot* 75: 12 – 18
- Podleśny J, Strobel W (2007) Wpływ odmiany i terminu siewu na plon oraz skład aminokwasowy białka nasion łubinu żółtego. *Acta Agrophys* 10(1): 175 – 185
- Podleśny J (2005) Rośliny strączkowe w Polsce- perspektywy uprawy i wykorzystanie nasion. *Acta Agrophysica* 6: 213 – 224
- Podleśny J, Brzóska F (2006) Uprawa łubinu żółtego na nasiona. *Biuletyn IUNG-PIB Puławy* ss. 35.
- Prusiński J, Borowska M (2002) Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie. Cz. I Zastosowanie regulatorów wzrostu w uprawie roślin strączkowych. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 33 – 38
- Rajasekaran R, Arunachalam C, Arunkumar S (2011) Dissecting Lupinus Leghemoglobin - A Proteomics Approach. *Advanced Biotech* 10: 29 – 36
- Roberts JA, Whitelaw CA, Gonzalez-Carranza ZH, McManus MT (2000) Cell separation processes in plants: models, mechanisms and manipulation. *Ann Bot* 86: 223 – 235
- Rognli OA (2007) GMOs and the role of seed yield capacity in herbage breeding programs. *Biofork Fokus* 12: 13 – 21
- Saftner RA, Martin MN (1993) Transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into isolated maize mesophyll vacuoles. *Physiol Plant* 87: 535 – 543
- Sagee O, Erner Y (1991) Gibberellins and abscisic acid content during flowering and fruit set of 'Shamouti' orange. *Sci Hort* 48: 29 – 39
- Sawicki M, Ait Barka E, Clément C, Vaillant-Gaveau N, Jacquard C (2015) Cross-talk between environmental stresses and plant metabolism during reproductive organ abscission. *J Exp Bot* 66(7): 1707 – 19
- Sexton RA (1995) Abscission. W: Pessaraki M. (red.), *Handbook of Plant and Crop Physiology* (497-527). Nowy Jork: Marcel Dekker.
- Sharp RE (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Env* 25: 211 – 222
- Sharp RE, LeNoble ME (2002) ABA, ethylene and the control of root and shoot growth under water stress. *J Exp Bot* 53: 33 – 37
- Suttle JC, Abrams SR (1993) Abscission-promoting activities of abscisic acid and five abscisic acid analogs in cotton seedlings and explants. *Plant Growth Regul* 12: 111 – 117
- Suttle JC, Hultstrand JF (1993) Involvement of abscisic acid in ethylene-induced cotyledon abscission in cotton seedlings. *Plant Physiol* 101: 641 – 646
- Szukała J (1993) Czynniki agrotechniczne warunkujące plonowanie łubinu. W: *Łubin w gospodarce i w życiu człowieka*. Wyd. PTŁ Poznań: 99 – 108

- Szukała J, Maciejewski T, Bieniaszewski T, Prusiński J (1999) Stan i możliwości uprawy łubinu w regionie wielkopolski. Mat. konf. „Łubin w polskim i europejskim rolnictwie”. Przysiek, 2–3 września 1999: 35 – 43
- Szukała J (1997) Rola roślin strączkowych w odbudowie żyzności gleby i wzroście plonów. Biuletyn ODR Marszew: ss. 11
- Taylor JE, Whitelaw CA (2001) Signals in abscission. *New Phytol* 151: 323 – 340
- Tophof S, Martinoia E, Kaiser G, Hartung W, Amrhein N (1989) Compartmentation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and N-malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in barley and wheat mesophyll-cells and protoplasts. *Physiol Plant* 75: 333 – 339
- Van Doorn WG (2002) Effect of ethylene on flower abscission: a survey. *Ann Bot* 89(6): 689 – 693
- Vernieri P, Tagliasacchi AM, Forino L, Lanfranchi A, Lorenzi R, Avanzi S (1992) Abscisic acid levels and cell structure in single seed tissues of shedding affected fruits of *Malus domestica* Borkh. *J Plant Physiol* 140: 699 – 706
- Weis KG, Goren R, Martin GC, Webster BD (1988) Leaf and inflorescence abscission in olive. I. Regulation by ethylene and ethephon. *Bot Gazette* 149: 391 – 397
- Wilmowicz E, Kęsy J, Kopcewicz J (2008) Ethylene and ABA interactions in the regulation of flower induction in *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol* 165(18):1917 –1928
- Wilmowicz E, Frankowski K, Kućko A, Świdziński M, Alché JD, Nowakowska A, Kopcewicz J (2016) The influence of abscisic acid on ethylene biosynthesis pathway in the functioning of flower abscission zone in *Lupinus luteus*. *J Plant Physiol* 206: 49 – 58 - **publikacja wchodząca w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego**
- Woltering EJ (1987) Effects of ethylene on ornamental pot plants: a classification. *Scientia Hort* 31: 283 – 294
- Wu XM, Yu Y, Han LB, Li CL, Wang HY, Zhong NQ, Yao Y, Xia GX (2012) The tobacco *BLADE-ON-PETIOLE2* gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant Physiol* 159: 835 – 850
- Zacarias L, Talon M, Ben-Cheikh W, Lafuente MT, Primo-Millo E (1995) Abscisic acid increases in non-growing and paclobutrazol-treated fruits of seedless mandarins. *Physiol Plant* 95: 613 – 619

## VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Oprócz pięciu oryginalnych publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie IV Autoreferatu, jestem również współautorem dwudziestu czterech prac, w tym: jednego przeglądowego i trzynastu eksperymentalnych artykułów posiadających współczynnik wpływu IF; dziesięciu polskojęzycznych przeglądowych artykułów opublikowanych w czasopiśmie, które nie są ujęte w bazie JCR. Pełny wykaz prac znajduje się w Załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

### Rozwój naukowy

Jestem absolwentem studiów magisterskich Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, na kierunku Biologia. Tytuł magistra uzyskałem w 2000 roku na podstawie obrony pracy zrealizowanej w Zakładzie Fizjologii i Morfogenezy Roślin (obecnie Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii) pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kopcewicza. W pracy wyizolowałem białka z *Avena L.* oddziałujące z formami P<sub>r</sub> i P<sub>fr</sub> fitochromu, wskazując na ich rolę w łańcuchu transdukcji sygnału fitochromowego. W trakcie prowadzonych doświadczeń napisałem pracę przeglądową poruszającą badane zagadnienia, która została opublikowana w 2001 r. w *Postęпах Biochemii* (Frankowski i in. 2001). Trzy lata później zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin UMK w Toruniu, gdzie wykonywałem badania dotyczące hormonalnych mechanizmów regulujących kwitnienie modelowej rośliny dnia krótkiego *Ipomoea nil L.* (syn. *Pharbitis nil*). W 2008 roku obroniłem pracę doktorską pt. „Regulowane przez światło oraz IAA geny kodujące syntazy i oksydazy ACC u *Pharbitis nil* oraz ich znaczenie w mechanizmie kwitnienia”. Niektóre z uzyskanych przeze mnie wyników badań zostały zamieszczone w eksperymentalnych artykułach o zasięgu międzynarodowym (Kęsy i in. 2010) oraz przedstawione na licznych konferencjach. Stwierdziłem, że ekspresja genów kodujących syntazy ACC i oksydazy ACC jest zróżnicowana organowo oraz regulowana przez auksynę i światło, co wskazuje, że produkcja etylenu podlega złożonej i wielokierunkowej kontroli na różnych etapach wzrostu i rozwoju roślin *P. nil*. Uzyskane wyniki badań wskazują, że wzrost aktywności transkrypcyjnej genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę etylenu jest przyczyną hamowania kwitnienia u *P. nil* przez nieindukcyjny fotoperiod (LD) oraz auksynę.

### **Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych prowadziłem badania dotyczące identyfikacji zależnych od fitohormonów szlaków indukcji kwitnienia *P. nil* (grant MNiSW N N303 333436). Wśród wielu uzyskanych wyników, najistotniejsze było wykazanie, że geny *PnACS1* (NCBI nr DQ235256) i *PnACS2* (NCBI nr EF127816), *PnACO1* (NCBI nr EF127817.2), *PnACO3* (NCBI nr EF127818.2) kodujące odpowiednio syntazy i oksydazy ACC są zaangażowane również w regulację kwitnienia badanej rośliny (Kęsy i in. 2010). Po aplikacji IAA na liścienie siewek *P. nil*

zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów *PnAC1* i *PnAC2*, które prowadziły do wzmożonej produkcji ET (Kęsy i in. 2010). Uzyskane wyniki badań sugerują, że IAA stymuluje ekspresję genu *PnACO3*, podczas gdy światło tylko w niewielki sposób wpływa na jego aktywność transkrypcyjną - odwrotnie niż w przypadku *PnACO1* (Wilmowicz i in. 2011, 2013, 2014a). Co więcej wykazano, że kwas absycynowy, podobnie jak ma to miejsce w przypadku IAA, podnosi aktywność transkrypcyjną genów biosyntezy etylenu i w konsekwencji hamuje kwitnienie *P. nil* (Frankowski i in. 2014b). Zaletą poruszanej tematyki badawczej obok poznawczego jest także praktyczny aspekt wiedzy o mechanizmach kontrolujących kwitnienie u roślin. Opisanie fizjologicznych i molekularnych mechanizmów regulujących ten proces ma bowiem znaczenie dla sterowania płodnością roślin, podstawowym parametrem hodowlanym u wielu gatunków użytkowych.

Jak wykazano u *A. thaliana* małe regulatorowe RNA (mikroRNA, miRNA) są zaangażowane w interakcje fitohormonów. Regulują one aktywność specyficznych genów docelowych m.in. *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*). Egzogenna auksyna podnosi aktywność transkrypcyjną genów odpowiedzi auksynowej *AUX/IAA* (*AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID*). W promotorach tych genów obecne są charakterystyczne sekwencje nukleotydowe AuxRE (*Auxin Responsive Element*), które wiążą czynniki transkrypcyjne ARF. W związku z tym, że u *A. thaliana* miR167 odpowiada za lokalizację mRNA genów *ARF6* i *ARF8*, przez co reguluje procesy rozwojowe kwiatu, zidentyfikowaliśmy homolog genu *ARF8* będący genem docelowym dla *InMIR167*. Zbadaliśmy również jego udział w rozwoju generatywnym *P. nil* (grant MNiSW N N303321637). Uzyskane cDNA *InARF8-like* (NCBI nr EF216864) zawiera sekwencję komplementarną do miR167 i koduje sekwencję aminokwasową zawierającą charakterystyczną dla czynników ARF domenę DBD (*DBD binding domain*) oraz domenę *AUX/IAA* i region bogaty w Gln, aktywującą ekspresję genów odpowiedzi na auksynę (Glazińska i in. 2014a). Wzorce ekspresji genów *MIR167* i *InARF8-like* wskazują, iż miR167 przez degradację mRNA *InARF8-like* może regulować jego aktywność. Czynniki regulujące kwitnienie *P. nil* nie mają wpływu na ekspresję miR167 i mRNA *InARF8-like*, co wyklucza ich rolę w tym procesie. Z kolei, oba geny biorą udział w reakcjach kontrolowanych przez auksynę, m. in. rozwój liścieni, liści, hypokotyli i merystemu wierzchołkowego pędu oraz morfogeneza kwiatów (Glazińska i in. 2014a). Wykazaliśmy także, że *InMIR319* oraz światło biorą udział w regulacji

poziomu transkryptu *InTCP4* zaangażowanego w rozwój *Ipomoea nil* (Glazińska i in. 2014b).

Kolejnym kierunkiem moich badań było określenie udziału jasmonianów w regulacji starzenia liścieni *P. nil*. Wykazaliśmy, że inhibitor biosyntezy jasmonianów odwracał stymulujący efekt ciemności na starzenie tych organów (Wilmowicz i in. 2016). Z kolei, egzogeny ester metylowy kwasu jasmonowego (JAMe), który podawano na liścienie roślin uprawianych na świetle stymulował ich starzenie. Poziom JA w liścieniach roślin kontrolnych był niższy niż u tych uprawianych w ciemności, jednak jego zawartość była wyższa niż JAMe. Wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *InJMT* (*JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE*), który koduje metylotransferazę katalizującą reakcję przekształcenia JA w JAMe, prowadzi do podniesienia zawartości metylowej pochodnej JA w liścieniach roślin uprawianych w ciemności, czemu towarzyszył spadek zawartości JA (Wilmowicz i in. 2016). Uzyskane wyniki badań wskazują, że JAMe jest związkiem aktywnym biologicznie w procesie starzenia liścieni *P. nil*. Podobną rolę związek ten może pełnić u roślin o znaczeniu gospodarczym. Wykorzystanie poznanych zależności i przeciwdziałanie starzeniu może mieć praktyczne zastosowanie, np. w celu pozyskania dużej biomasy.

Poza badaniami dotyczącymi hormonalnej regulacji wybranych procesów wzrostu i rozwoju *P. nil* równolegle uczestniczyłem w pracach nad rolą jasmonianów w reakcjach obronnych *Hippeastrum* (zwartnica). Roślina ta jest narażona na infekcję grzybem *Phoma narcissi*, prowadzącą do czerwienienia wszystkich organów. Zainfekowane rośliny rosną słabo, co stanowi duży problem ekonomiczny w przemyśle kwaciarskim. Uważano, że czerwienienie tkanek jest spowodowane gromadzeniem antocyjanów. Jednak wyniki badań prowadzonych w Instytucie Sadownictwa i Kwaciarsstwa w Skierniewicach wykazały, że pochodzi ono od związku Hpp-1, który zmniejsza zdolność *P. narcissi* do infekcji tkanek. W związku z tym, że pojawienie się Hpp-1 było obserwowane również w wyniku zranienia, w naszych doświadczeniach ustalono zmiany stężenia endogennych jasmonianów (JA i JAMe) w zranionych cebulach *Hippeastrum*. Mechaniczne uszkodzenie łusek powoduje akumulację JA, jednak począwszy od 20 minuty po zadziałaniu bodźca stresowego jego zawartość sukcesywnie maleje. Należy dodać, że przez cały czas wzrostu intensywności czerwonego zabarwienia pozostaje na poziomie niższym niż JAMe. Po 40 minutach zawartość metylowej pochodnej JA jest 25 razy wyższa niż w łuskach cebul kontrolnych (Wilmowicz i in. 2014b). Podwyższony poziom JAMe i obniżenie ilości JA



może wynikać z faktu, że zranienie stymuluje aktywność transkrypcyjną genu *JMT*. Wydaje się więc, że JAMe odgrywa ważniejszą rolę w uruchomieniu reakcji obronnych na stres niż JA, co jest związane z jego większą aktywnością metaboliczną, stabilnością oraz lepszą przenikalnością. Można przypuszczać, że wytworzenie czerwonego barwnika o właściwościach podobnych do fitoaleksyn, nie wymaga biosyntezy jasmonianów *de novo*, a może być związane ze stymulacją ekspresji *JMT* i powstaniem JAMe. U innych gatunków roślin akumulacja transkryptu *JMT* jest indukowana nie tylko w miejscu działania czynnika stresowego, ale ma charakter reakcji systemicznej, dlatego prawdopodobnie również u *Hippeastrum* JAMe może pełnić funkcję długodystansowej cząsteczki sygnałowej. Kwas 2-(4-izobutylofenylo) propionowy, inhibitor biosyntezy jasmonianów, podany na zranione łuski cebul *Hippeastrum* obniżał poziom tych hormonów i hamował tworzenie związku o właściwościach podobnych do fitoaleksyn. Oznacza to, że oba procesy są ze sobą skorelowane i sygnalizuje ważność tych zmian dla pojawienia się adekwatnej odpowiedzi na czynnik stresowy (Wilmowicz i in. 2014b). Wyjaśnienie kaskady zdarzeń w mechanizmie transdukcji sygnału prowadzącego do tworzenia się czerwonego zabarwienia może być przydatne do uzyskania jak najwcześniejszej odpowiedzi na stres i uniemożliwienia rozwoju i rozprzestrzenienia się *P. narcissi* na organach *Hippeastrum*.

W okresie tym powstał szereg prac przeglądowych poruszających głównie tematykę hormonalną (Frankowski i in. 2009, 2013; Kućko i in. 2014; Marciniak i in. 2010; Wilmowicz i in. 2011, 2012a, 2012b, 2014b).

### **Literatura:**

- Frankowski K**, Kęsy J, Kopcewicz J. Fitochrom i transdukcja sygnału świetlnego *Post Bioch.* 2001; 47: 184-191
- Kęsy J, **Frankowski K**, Wilmowicz E, Glazińska P, Wojciechowski W, Kopcewicz J. The possible role of *PnACS2* in IAA-mediated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Plant Growth Regul.* 2010; 61:1-10
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Glazińska P, Kęsy J, Kopcewicz J. Involvement of ABA in flower induction of *Pharbitis nil*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2011; 80:21-26
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Kęsy J, Glazińska P, Wojciechowski W, Kućko A, Kopcewicz J. The role of *PnACO1* in light- and IAA-regulated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Acta Physiologiae Plantarum* 2013; 35(3):801-810

- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Kęsy J, Kućko A, Kopcewicz J. Involvement of the IAA-regulated ACC oxidase gene *PnACO3* in *Pharbitis nil* flower inhibition. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2014a; 56(1):1-7
- Frankowski K**, Wilmowicz E, Kućko A, Świeżawska B, Kęsy J, Kopcewicz J. Ethylene, IAA and ABA interactions in the control of photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Biologia Plantarum* 2014; 58(2):305-310
- Glazińska P, Wojciechowski W, Wilmowicz E, Zienkiewicz A, **Frankowski K**, Kopcewicz J. The involvement of *InMIR167* in the regulation of expression of its target gene *InARF8*, and their participation in the vegetative and generative development of *Ipomoea nil* plants. *J. Plant Physiol.* 2014a; 171:225-234
- Glazińska P, Wilmowicz E, Wojciechowski W, **Frankowski K**, Kopcewicz J. Impact of *InMIR319* and light on the expression of *InTCP4* gene involved in the development of *Ipomoea nil* plants. *Acta Physiol. Plant.* 2014b; 36:29-43
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Kućko A, Kopcewicz J. Participation of jasmonates in dark-induced senescence of cotyledons in *Ipomoea nil*. 2016 *Acta Physiol Plant* 38(9):1-9.
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Grzegorzewska W, Kęsy J, Kućko A, Banach M, Szmidt-Jaworska A, Saniewski M. The role of jasmonates in the formation of a compound of chalcones and flavans with phytoalexin-like properties in mechanically wounded scales of *Hippeastrum x hybr.* bulbs. *Acta Bot. Cracov.ser. Bot.* 2014b; 56:1-5
- Frankowski K**, Świeżawska B, Wilmowicz E, Kęsy J, Kopcewicz J. Szlak sygnałowy kwasu jasmonowego – nowe informacje. *Post. Bioch.* 2009; 55:337-41
- Frankowski K**, Wilmowicz E, Kućko A, Sidłowska M, Kęsy J, Kopcewicz J. Metabolizm kwasu abscysynowego. *Post. Bioch.* 2013; 59:83-88
- Kućko A, Wilmowicz E, **Frankowski K**, Piotrowski K, Kęsy J, Marciniak K, Kopcewicz J. Szlaki biosyntezy auksyn u roślin. *Post. Biol. Kom.* 2014; 41:121-128
- Marciniak K, Turowski T, Wilmowicz E, **Frankowski K**, Kęsy J, Kopcewicz J. Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin. *Post. Biol. Kom.* 2010; 37:137-151
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Glazińska P, Sidłowska M, Marciniak K, Kopcewicz J. Rola giberelin w regulacji kwitnienia roślin. *Kosmos* 2011; 60:129-140
- Wilmowicz E, **Frankowski K**, Kućko A, Kęsy J, Sidłowska M, Studzińska – Czyszka

A, Marciniak K, Kopcewicz J. Mechanizm odcinania organów u roślin. *Post. Biol. Kom.* 2014b; 41:599-615

Wilmowicz E, **Frankowski K**, Sidłowska M, Kućko A, Kęsy J, Gąsiorowski A, Glazińska P, Kopcewicz J. Biosynteza jasmonianów u roślin – najnowsze odkrycia. *Post. Bioch.* 2012a; 58:26-33

Wilmowicz E, Kućko A, Sidłowska M, **Frankowski K**, Maciejewska B, Glazińska P, Kopcewicz J. Rola jasmonianów w regulacji rozwoju generatywnego roślin. *Kosmos* 2012b; 61:603-612

## **VII. Dane bibliometryczne publikacji wchodzących w skład dorobku naukowego:**

1. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodna z rokiem opublikowania) pozycji literaturowych: **525**
2. Sumaryczny *impact factor* (zgodny z rokiem opublikowania) pozycji literaturowych: **28,648**
3. Indeks H (według bazy Web of Science): 5

## **VIII. Udział w projektach badawczych i współpraca naukowa**

W ramach pracy naukowej uczestniczyłem w realizacji grantów finansowanych przez: Narodowe Centrum Nauki, Komitet Badań Naukowych, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Szczegółowy opis udziału w poszczególnych projektach znajduje się w załączniku nr 4 do wniosku (pkt II ppkt F; pkt III ppkt A3).

Realizacja wyżej wymienionych projektów była możliwa dzięki współpracy z:

- Estación Experimental del Zaidín CSIC, Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants w Granadzie (Hiszpania),
- Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach,
- Kujawsko-Pomorskim Ośrodkiem Doradztwa Rolniczego w Minikowie (oddział w Przysieku),
- Poznańską Hodowlą Roślin Sp. z o.o. w Tulcach koło Poznania.

Wyniki przeprowadzonych badań były prezentowane w formie posterów lub wystąpień ustnych na konferencjach i zjazdach:

a) przed doktoratem (2004-2007)

- krajowych (2 streszczenia)
- międzynarodowych (1 streszczenie)

b) po doktoracie (2008 - 2016)

- zagranicznych (5 streszczeń),
- krajowych (30 streszczeń).

W ramach pracy dydaktyczno-naukowej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu (lata 2004 - 2010) sprawowałem opiekę naukową nad 5 studentami przygotowującymi prace magisterskie w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii (dawniej Zakładzie Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu). Szczegółowy opis dotyczący osiągnięć dydaktycznych i popularyzatorskich zawiera załącznik nr 6 do wniosku.

