Załącznik numer 3

AUTOREFERAT

przedstawiający opis kariery zawodowej oraz istotnej aktywności naukowej

Dr Katarzyna Otulak-Kozieł

Instytut Biologii,

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

1. Imię i nazwisko: **Katarzyna Otulak – Kozieł [orcid.org/0000-0001-9424-1662]**

2. Wykształcenie – dyplomy, stopnie naukowe

•od 30.10.2008r - doktor nauk rolniczych, specjalność: Biologiczne podstawy rolnictwa i ochrona środowiska; Wydział Rolnictwa i Biologii; SGGW w Warszawie na podstawie obronionej z wyróżnieniem rozprawy doktorskiej „Cytologiczna charakterystyka patogenezy roślin porażonych wirusem Y ziemniaka (PVY) różniących się szybkością pojawiania nekroz" wykonana pod kierunkiem dr hab. G. Garbaczewskiej, prof. nadzw. SGGW.

Recenzentami pracy byli: Prof. dr hab. Adam Woźny (UAM, Poznań) oraz prof. Dr hab. Władysław Golinowski (SGGW)

•2002-2003 r.- równoległe Studia Pedagogiczne, przy Wydziale Nauk Ekonomicznych SGGW w Warszawie;

•2003 r.- magister inżynier rolnictwa, specjalność: Biotechnologia rolnicza; Wydział Rolniczy SGGW w Warszawie;

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu

od 12.2010 – adiunkt w Katedrze Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii; SGGW w Warszawie

2008-2010 – asystent w Katedrze Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii; SGGW w Warszawie

4. Opis osiągnięcia, o którym mowa w art. 219 ust.1 pkt.2 Ustawy

a) tytuł:

„Dynamika zmian na terenie symplastu i apoplastu komórki roślinnej w efekcie inokulacji wirusem Y ziemniaka (PVY^{NTN}) podczas interakcji zgodnej i niezgodnej"

b) publikacje:

1. **Otulak K.,** Garbaczewska G., (**2014**) The participation of plant cell organelles in compatible and incompatible *Potato virus Y* – tobacco and –potato plant interaction, *Acta Physiologia Plantarum*, 36: 85-99. DOI: 10.1007/s11738-013-1389-4.
   Pkty MNiSW=25; *Pkty MNiSW=70 , IF $_{\text{w roku publikacji}}$= 1,732, IF $_{\text{5letni}}$= 1,69, liczba cytowań 9.
   Mój udział w publikacji polegał na: zaplanowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich analiz ultrastrukturalnych zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wraz z lokalizacją białka płaszcza wirusa techniką immunozłotową, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 90%.

2. **Otulak K.,**Garbaczewska, G., (**2012**) Cytopathological *Potato virus Y* structures during *Solanaceous* plants infection, *Micron*, **43(7)**: 839-50.
   Pkty MNiSW=20 pkt, *Pkty MNiSW=100, IF $_{\text{roku publikacji}}$=1,912, IF$_{\text{5letni}}$ =2,0 , liczba cytowań 13.

Mój udział w publikacji polegał na: określeniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich analiz ultrastrukturalnych, analizie otrzymanych wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 90%.

3. **Otulak K.,** Kozieł E., Lockhart B.E.L., Garbaczewska G., (**2017**) Ultrastructural effects of PVY^{NTN} infection of *Capsicum annum* L. cv. Yolo Wonder generative organs. *Phytopatologia Mediterranea* 56(3): 379-391. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-20252.
   Pkty MNiSW 30 pkt, *Pkty MNiSW=70, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =1,442, IF$_{\text{5 letni}}$=1,819, liczba cytowań 3.
   Mój udział w publikacji polegał na: zaplanowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich analiz mikroskopowych i lokalizacji białka płaszcza wirusa z zastosowaniem zarówno transmisyjnej mikroskopii elektronowej jak i fluorescencyjnej, analizie wyników, napisaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 70%.

4. **Otulak-Kozieł K.,** Kozieł E., Lockhart B.E.L., (**2018**) Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by *Potato virus Y* (PVY^{NTN}). *International Journal of Molecular Sciences* 19(3): 862 DOI:10.3390/ijms19030862, ***artykuł na zaproszenie do numeru specjalnego: 'Plant Innate Immunity 2.0',***
   Pkty MNiSW=30, *Pkty MNiSW= 140, IF $_{\text{w roku publikacji}}$=4,183, IF $_{\text{5 letni}}$=4,331., liczba cytowań 14.
   Mój udział w publikacji polegał na zaplanowaniu koncepcji badań i przeprowadzeniu wszystkich analiz ultrastrukturalnych zmian ściany komórkowej w obu typach interakcji roślina – wirus, a także na lokalizacji białek PR-2, CesA4 oraz HRGP z zastosowaniem mikroskopii elektronowej oraz fluorescencyjnej, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 80%.

5. **Otulak-Kozieł K.,** Kozieł E., Bujarski J.J, (**2018**) Spatiotemporal changes in xylan-1/xyloglucan and xyloglucan xyloglucosyl transferase (XTH-Xet5) as a step-in of ultrastructural cell wall remodelling in Potato–*Potato Virus Y* (PVY^{NTN}) Hypersensitive and Susceptible Reaction. *International Journal of Molecular Sciences* 19(8): 2287 DOI:10.3390/ijms19082287, ***artykuł na zaproszenie do numeru specjalnego: 'Plant Viruses and Virus-Induced Diseases',* Pkty MNiSW=30, *Pkty MNiSW= 140, IF $_{\text{w roku publikacji}}$=4,183, IF $_{\text{5 letni}}$= 4,331., liczba cytowań 4.**
   Mój udział w publikacji polegał na: zaplanowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz mikroskopowych dystrybucji ksylan-1/ksyloglukan oraz transferazy ksyloglukanu XTH-Xet5 na poziomie anatomicznym i ultrastrukturalnym, a także analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 80%.

6. **Otulak-Kozieł K**, Kozieł E., Valverde R.A. (**2019**) The Respiratory Burst Oxidase Homolog D (RbohD) Cell and Tissue Distribution in Potato-Potato Virus Y (PVY^{NTN})

Hypersensitive and Susceptible Reactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11): 2741. DOI: 10.3390/ijms20112741 ***artykuł na zaproszenie do numeru specjalnego: 'Plant Viruses and Virus-Induced Diseases'*, Pkty MNiSW =140, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **4,183, IF** $_{\text{5 letni}}$ **=4,331., liczba cytowań 4.**
Mój udział w publikacji polegał na: zaplanowaniu koncepcji badań, zapewnieniu środków na realizację badań w projekcie który otrzymałam, wykonaniu analiz ultrastrukturalnych dotyczących preferencji występowania cząstek wirusa, analiz dystrybucji RbohD na poziomie ultrastrukturalnym oraz anatomicznym, a także lokalizacji nadtlenku wodoru z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, następnie na analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 80%.

7. **Otulak-Kozieł K**, Kozieł E, Lockhart B, Bujarski J.J. (**2020**) The Expression of Potato Expansin A3 (*StEXPA3*) and Extensin4 (*StEXT4*) Genes with Distribution of StEXPAs and HRGPs-Extensin Changes as an Effect of Cell Wall Rebuilding in Two Types of PVY ^{NTN} -*Solanum tuberosum* Interactions. *Viruses*, 12(1), 66; DOI: 10.3390/v12010066. **artykuł w numerze specjalnym: *'The complexity of the Potyviral Interaction Network'*.**
Pkty MNiSW 100, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ **=3,811, IF** $_{\text{5 letni}}$ **=3,916., liczba cytowań 0.**
Mój udział w publikacji polegał na zaplanowaniu koncepcji badań, zapewnieniu środków w pozyskanym projekcie na realizację badań, wykonaniu analiz dystrybucji ekspansyn i ekstensyn z grupy HRGP w obu typach interakcji roślina-wirus na poziomie ultrastrukturalnym i anatomicznym oraz współdziałaniu w analizie ekspresji genów StEXPA3 oraz StEXT4, a następnie na analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Swój udział określam na 70%.

We wszystkich wskazanych pracach jestem pierwszym autorem oraz pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Sumaryczna ilość pkt MNiSW **w roku publikacji: 375 pkt**;

Sumaryczna ilość pkt MNiSW **wg obecnie obowiązującej punktacji: 760 pkt**

IF sumaryczny (w roku opublikowania): 21,446
IF sumaryczny (5 -letni): 22,418
Suma cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia *[wg Web of Science na dzień 04.06.2020]* : 47.

Pkty MNiSW- punktacja w roku publikacji wg. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego,
**Pkty MNiSW- aktualna, punktacja z 2019r wg. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego,*
Liczba cytowań wg bazy Web of Science

c) Wprowadzenie i cel naukowy ww. osiągnięcia naukowego i uzyskanych wyników

Wirus Y ziemniaka (ang. Potato virus Y, PVY), przedstawiciel rodzaju Potyvirus, rodziny Potyviridae, stanowiący 30% wszystkich wirusów roślinnych to jeden z pięciu najgroźniejszych patogenów wirusowych roślin na świecie (Robert, 2000). Najważniejszy pod względem ekonomicznym patogen ziemniaka, infekujący szeroką grupę roślin gospodarzy, w efekcie działania którego straty co do ilości i jakości surowców są szacowane w zakresie od 10 do 80% (Valkonen, 2007). Infekcją podlegają także inni przedstawiciele rodziny botanicznej *Solanaceae* jak tytoń, papryka, czy pomidor. W Polsce najbardziej rozpowszechnionymi zarazem najgroźniejszymi są szczepy nekrotyczne – wśród nich PVY^{N} (ang. *necrotic veinal necrosis*) powodujący ostrą nekrotyzację wiązek przewodzących zidentyfikowany na tytoniu (Chrzanowska, 1991), ze szczególnym uwzględnieniem szczepu $PVY^{N\text{-}Wi}$, po raz pierwszy stwierdzony na odmianie ziemniaka Wilga, bardziej wirulentny dla gospodarzy (Chrzanowska, 1984). Niezwykle istotna była identyfikacja szczepu PVY^{NTN} (ang. **n**ecrotic **t**uber **n**ecrosis) prowadzący do nekrotycznej choroby pierścieniowej bulw (PTNRD, ang. ***p**otato **t**uber **n**ecrosis **r**ingspot **d**isease*) oprócz nekroz na nadziemnych częściach roślin (LeRomance and Kerlan, 1991). Interakcje roślina-wirus to zjawisko kompleksowe i wielopłaszczyznowe, które może przebiegać według bardzo różnych mechanizmów, gdy wirus manipuluje komponentami komórek gospodarza do osiągnięcia wydajnej infekcji lub z drugiej strony, gdy roślina indukuje odpowiedź obronną (Bábler i wsp., 2020). Roślina jest w stanie aktywować wielopoziomową odpowiedź, będącą formą efektu równowagi pomiędzy środowiskiem, genotypem rośliny a biologią szczepu wirusa. Biorąc pod uwagę specyfikę, a także szybkość zaistniałej odpowiedzi możemy dokonać prostego podziału na interakcję zgodną lub niezgodną zachodzącą pomiędzy rośliną a wirusem (Garcia-Brugger i wsp., 2006). Gdy roślina nie rozpoznaje patogena lub ten proces przebiega zbyt wolno mamy do czynienia z reakcją zgodną, gdzie porażenie skutkuje infekcją systemiczną poprzez swobodne namnażanie wirusa i transport, co jest zjawiskiem bezpośrednio związanym z roślinami podatnymi (objawy lokalne i/lub systemiczne) lub co najmniej tolerancyjnymi (brak objawów lub ich przebieg jest bardzo łagodny). Jeśli roślina rozpoznaje patogena wirusowego i gwałtownie indukuje odpowiedź obronną to zapobiega dalszym procesom cyklu infekcyjnego i/lub rozprzestrzenianiu wirusa, mamy do czynienia z odpornością zachodzącą jako efekt interakcji niezgodnej. Formą odporności względem PVY może być zjawisko znane jako skrajna odporność, odpowiedź typu ER (ang. ***e**xtremely **r**esistance*) oraz zjawisko nadwrażliwości HR (ang. **h**ypersensitive **r**esponse) - objawiająca się lokalnymi zmianami nekrotycznymi (Valkonen, 2015). Reakcja nadwrażliwości jako forma programowanej śmierci komórki jest związana z aktywnym metabolizmem

komórki roślinnej, która jest zależna od aktywacji mechanizmów transkrypcyjnych rośliny, co różni je od nekrotycznej śmierci wywołanej bodźcami fizycznymi. Badania reakcji w stosunku do różnych grup patogenów koncentrują się w znakomitej większości na przemianach metabolicznych, fizjologicznych (Richael & Gilchrist, 1999). Rośliny ziemniaka różnych odmian posiadają zróżnicowane podłoże genetyczne odporności, kilka różnych genów odpowiedzialnych za reakcję HR w stosunku do wirusa PVY zostało wprowadzonych do roślin z ich dzikich odpowiedników, takie jak gen *Ny*, Nc czy *Nz* odpowiadających za odporność w stosunku do odpowiednich szczepów PVY^0, PVY^C i PVY^Z (Valkonen, 2015). Nowym wariantem genetycznej odporności są geny stwierdzone w stosunku do najbardziej agresywnych, rekombinacyjnych szczepów jakim jest PVY^{NTN}. Należą do nich takie geny jak *Ny-1* odmiany ziemniaka Rywal (Szajko i wsp., 2008), *Ny-2* odmiany Romula (Szajko i wsp., 2014) lub Ny_{Smira} dla odmiany Sárpo Mira (Tomczyńska i wsp.,2014). Ponadto wykazano, iż aktywacja genu *Ny-1* względem PVY^N i PVY^{NTN} dla odmiany Rywal zmapowanym na IX chromosomie jest procesem temperaturo-zależnym (Szajko i wsp., 2018). Badania prowadzone przeze mnie w Katedrze Botaniki SGGW wykazały, iż rośliny ziemniaka odmiany Rywal wykazują reakcję nadwrażliwości, której podstawą powinno być ograniczanie transportu tego patogena, ale transport wirusa poza obszar inokulacji w sposób bezobjawowy jest możliwy. Pierwsza charakterystyka cytologiczna reakcji nadwrażliwości wywołanej interakcją nekrotycznymi szczepami PVY wykazała, iż prawdopodobieństwo obserwacji cząstek PVY powyżej miejsca inokulacji było znacznie niższe niż w liściu inokulowanym (Otulak & Garbaczewska, 2010). Potwierdziły ten fakt także późniejsze, niezależne badania słoweńskiej grupy z Instytutu Biologii w Lublanie (Lukan i wsp.,2018). Co więcej wskazano, że przekazywanie sygnału w tej reakcji było związane z aktywacją sygnatury wapniowej w komórce roślinnej (Otulak & Garbaczewska, 2011).oraz silnej indukcji reaktywnych form tlenu, a zwłaszcza nadprodukcji nadtlenku wodoru (Otulak & Garbaczewska, 2010). Analizy dotyczące reakcji odporności na infekcję wirusem Y ziemniak skupiają się szczególnie na identyfikacji nowych genów odporności dotyczących konkretnych odmian roślin uprawnych, zwłaszcza ziemniaka oraz na próbach identyfikacji receptorów odpowiadających tym genom. Informacje dotyczące tego co dzieje się podczas tych interakcji na poziomie komórkowym są nadal niezwykle skromne.

Biorąc pod uwagę, że szczegółowe poznanie biologii interakcji roślina- wirus Y ziemniaka, zwłaszcza najgroźniejszych szczepów nekrotycznych, jest niezwykle istotne dla przyszłych hodowli odpornościowych wolnych od wirusów. Ponadto, rejestrując wyraźnie zauważalną lukę na temat tych informacji w literaturze

światowej, **do celów prowadzonych badań stanowiących prezentowane osiągnięcie należały:**

1. Identyfikacja i charakterystyka wpływu inokulacji szczepów nekrotycznych wirusa Y ziemniaka na zmiany na terenie symplastu komórki roślinnej podczas interakcji zgodnej i niezgodnej, ze szczególnym uwzględnieniem zaangażowania organelli komórkowych w organach wegetatywnych roślin z rodziny *Solanaceae*. (P1,P2)

Do analiz ultrastrukturalnych wraz z lokalizacją białka płaszcza wirusa PVY wykorzystano odpowiednio rośliny papryki odm. Monsun, tytoniu odm. Samsun oraz ziemniaka odm. Igor inokulowane szczepami nekrotycznymi PVY^{NTN} oraz $PVY^{N\text{-}Wi}$ *jako układ eksperymentalny obrazujący interakcję zgodną wirusa z powyższymi gospodarzami podatnymi. Jako układ eksperymentalny interakcji niezgodnej zastosowano rośliny ziemniaka odmiany ze zidentyfikowanym genem nadwrażliwości Ny-1 inokulowane mechanicznie szczepami nekrotycznymi.*

2. Określenie wpływu inokulacji wirusem PVY^{NTN} na potencjalne zmiany na terenie organów generatywnych oraz sprawdzenie zdolności przenoszenia wirusa wraz z gametofitami do nowego pokolenia roślin papryki. (P3)

Do analiz struktury, testów ELISA, lokalizacji wirusa z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej wraz z metodami kwantyfikacji wykorzystano część generatywne kwiatów (słupki i pylniki) oraz nasiona papryki odmiany Yolo Wonder (wykazującej recesywną homozygotyczność). Ponadto testowano części wegetatywne (liście) roślin nowego pokolenia wschodzące z zainfekowanych, kiełkujących nasion.

3. Wykazanie, czy fundamentalny enzym zaangażowany w produkcję reaktywnych form tlenu podczas interakcji roślina - mikroorganizm, jakim jest homolog D oksydazy wybuchu tlenowego NADPH (RbohD), jest zaangażowany podczas interakcji ziemniak-PVY^{NTN}. Określenie z jakimi zmianami na terenie symplastu i/lub apoplastu jest związany podczas reakcji nadwrażliwości i podatności. (P6)

Modelem eksperymentalnym do analiz dystrybucji i lokalizacji RbohD były trzy odmiany ziemniaka różniące się znacząco między sobą stopniem odporności względem PVY^{NTN} *inokulowane mechanicznie* PVY^{NTN}*. Dwie z nich to odmiany nadwrażliwe o różnym poziomie odporności (odmiana charakteryzująca się poziomem 6 w 9-stopniowej skali wg 'Potato Cultivated Database', odmiana Sárpo Mira na poziomie 9 w 9-stopniowej skali) ze zidentyfikowanymi genami nadwrażliwości w stosunku do szczepów nekrotycznych PVY oraz odmiana podatna Irys (5,5 w 9-stopniowej skali).*

4. Określenie zmian zachodzących na terenie apoplastu podczas interakcji zgodnej i niezgodnej PVY^{NTN}-ziemniak. Scharakteryzowanie mechanizmów przebudowy ściany komórkowej podczas tych interakcji. (P4, P5, P7)

Analizy struktury, dystrybucji wybranych białek i niecelulozowych składników ściany komórkowej, a także ekspresji genów kodujących dwie główne grupy białek ściany komórkowej przeprowadzono w układzie zmian w czasie podczas reakcji nadwrażliwości odmiana Sárpo Mira) oraz w przypadku interakcji zgodnej (odmiana Irys).

Wszystkie powyższe cele zostały zrealizowane, a wyniki badań pozwoliły wskazać kluczowe zmiany towarzyszące szczególnemu aspektowi odporności jakim jest reakcja nadwrażliwości na szczep nekrotyczny wirusa Y ziemniaka -PVY^{NTN}. Szczegółowy opis i wnioski płynące z poszczególnych siedmiu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przedstawiono poniżej.

P1. Otulak K.,Garbaczewska G., (2014) The participation of plant cell organelles in compatible and incompatible *Potato virus Y* – tobacco and –potato plant interaction, *Acta Physiologia Plantarum*, 36: 85-99. DOI: 10.1007/s11738-013-1389-4.

P2. Otulak, K.,Garbaczewska, G., (2012) Cytopathological *Potato virus Y* structures during *Solanaceous* plants infection, *Micron*, 43(7): 839-50.

Wirus Y ziemniaka jako przedstawiciel *Potyviridae* charakteryzuje się cząstkami filamentowymi, których (+)ssRNA koduje jedną poliproteinę, która poprzez endogenne proteazy ulega cięciu do pojedynczych białek wirusa (Chung i wsp., 2008, Urcugui-Inchima, 2001). Co do przebiegu procesu replikacji wiadomo jedynie, iż może być on związany ze strukturami błonowymi i przebiega głównie na terenie cytoplazmy (Kopek i wsp.,2007). Uważa się, iż struktury pęcherzykowe lub błonowe są miejscem zasocjowania kompleksu replikacyjnego potyvirus. Jedyne informacje będące powiązaniem odpowiedzi rośliny na infekcje grupy potyvirus na poziomie komórki roślinnej to doniesienia dotyczące związku indukcji objawów infekcji z procesem fotosyntezy (Rahoutei et al., 2000). W dwóch pracach wskazanych (P1 i P2) wykazano bezpośredni udział organelli komórkowych w procesie infekcyjnym wirusa w interakcji zgodnej jak również podczas reakcji nadwrażliwości. Zarówno cząstki wirusa jak i inkluzje cytoplazmatyczne stwierdzono w bezpośrednim związku z kompleksami porów jądrowych. Lokalizacje białka płaszcza (CP, ang. *capsid protein*) wirusa potwierdziły epitop na terenie jądra komórkowego jak i jąderka. Powyższe

obserwacje notowano zarówno w przypadku interakcji zgodnej dotyczącej roślin tytoniu i ziemniaka, jak i w przypadku odmiany cechującej się nadwrażliwością. W roku 1984 Edwardson i współautorzy zwrócili uwagę na morfologiczne zróżnicowanie cytoplazmatycznych struktur inkluzji wirusowych wprowadzając nomenklaturę wskazującą, iż mogę mieć one formę lamellarną, tabularną, rozetową typu „pinwheel", czy też rozetową typu „scrolls". Poza typowymi cytoplazmatycznymi inkluzjami potyvirus wyróżnić można także formy inkluzji jądrowych NI (ang. *nuclear inclusions*), czy też amorficznych AI (ang. *amorphic inclusions*). Podczas badań prowadzonych w Katedrze Botaniki SGGW stwierdziliśmy udział inkluzji jądrowych i amorficznych w przypadku interakcji zgodnej z udziałem gospodarzy, takich jak tytoń i ziemniak, lecz tego typu form nie obserwuje się w przypadku interakcji niezgodnej nekrotycznych szczepów PVY oraz w przypadku podatnych roślin papryki. Tym niemniej udowodniono, że forma i struktura inkluzji cytoplazmatycznych nie może stanowić cytologicznego kryterium rozróżniającego szczepy wirusa (np. PVY^{NTN} od PVY^{0}), ani nie zależy od typu interakcji czy poziomu odporności gospodarza. Co więcej, nasze badania po raz pierwszy w sposób powtarzalny udokumentowały występowanie cząstek wirusa PVY^{NTN} oraz lokalizację białka płaszcza wewnątrz mitochondriów w czasie interakcji zgodnej ziemniak (odm. Igor) – PVY^{NTN}, podczas gdy w przypadku reakcji nadwrażliwości stwierdziliśmy zarówno cząstki jak i lokalizację CP-PVY wewnątrz chloroplastów. Znaczne nagromadzenie cząstek PVY^{NTN} związane z błonami zewnętrznymi otoczek tych organelli wywoływało wzajemne połączenie tych organelli. Zjawiskom tym towarzyszyły silne zmiany w układzie lamelli chloroplastów i formowanie struktur egzosomalnych i elektrono-przeziernych obszarów w mitochondriach. Wskazane zmiany notowano w obu typach interakcji, lecz w innych punktach czasowych. Na terenie symplastu stwierdzono, także bardzo dużą dynamikę i zmienność cystern retikulum endoplazmatycznego (ER) w porównaniu z materiałem kontrolnym. Lamellarne inkluzje cytoplazmatyczne nadzwyczaj często zasocjowane były z powiększonymi cysternami ER. Struktury błonowe ER w obu typach interakcji wykazywały silne powiązanie z cząstkami wirusa, co potwierdziła dodatkowo lokalizacja CP-PVY na powierzchni oraz wewnątrz cystern. Powyższe dane i lokalizacje na poziomie ultrastrukturalnym wskazują, iż struktury pęcherzykowe pochodzące od ER biorą udział w syntezie i/lub białek wirusa takich jak CP i CI. Bardzo aktywne formowanie ciał pęcherzykowych pochodzących od ER jest formą reakcji komórki roślinnej na czynniki stresowe. Analizy ultrastrukturalne i lokalizacja CP-PVY po raz pierwszy potwierdziły zaangażowanie takich organelli jak chloroplasty, mitochondria oraz retikulum endoplazmatyczne w oddziaływanie z

PVY^{NTN}, które miały miejsce w obu typach interakcji. W przypadku interakcji niezgodnej dynamiczne zmiany struktury organelli komórkowych rozpoczynały się już od 1 dnia po inokulacji wirusem, w przypadku interakcji zgodnej były ściśle skorelowane z pojawieniem się symptomów infekcji systemicznej, czyli począwszy od 15 dnia po inokulacji nekrotycznymi szczepami PVY.

P6. Otulak-Kozieł K, Kozieł E., Valverde R.A. (2019) The Respiratory Burst Oxidase Homolog D (RbohD) Cell and Tissue Distribution in Potato-Potato Virus Y (PVY ^{NTN}) Hypersensitive and Susceptible Reactions. ***International Journal of Molecular Sciences , article invited to the special issue: Plant Viruses and Virus-Induced Disease, 2019, 20, 2741.***

Roślinne oksydazy NADPH, zwane homologami oksydazy wybuchu tlenowego RBOHs (ang. **r**espiratory **b**urst **o**xidases **h**omologs) są uważane za główne źródło reaktywnych form tlenu (ROS ang. *reactive oxygen species*) podczas interakcji roślina – mikroorganizm (Torres i wsp.,2002; Noirot i wsp.,2014). Centralną siłą przekazywania sygnałów związanych z reaktywnymi formami tlenu w komórce roślinnej jest najsilniej ulegający ekspresji podczas odpowiedzi na działanie patogena, homolog D oksydazy wybuchu tlenowego RbohD (Suzuki i wsp., 2011). Co więcej RbohD-zależne formy ROS wskazano jako potencjalnie zaangażowane w odpowiedź obronną związaną z reakcją nadwrażliwości w stosunku do innych patogenów niż wirusy (Torres i wsp., 2002; Kwak i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2007). Na podstawie powyższych przesłanek celem badań przeprowadzonych w powyższym artykule było sprawdzenie czy RbohD jako fundamentalny twórca ROS jest zaangażowany w interakcję ziemniak - PVY^{NTN}. W tym celu przeprowadzono analizę dystrybucji komórkowej i tkankowej RbohD i jej zmian w czasie w trzech układach eksperymentalnych z odmianami ziemniak różniącymi się poziomem odporności względem szczepu nekrotycznego PVY^{NTN}. Podczas prowadzenie analiz nawiązałam współpracę z Profesorem Rodrigo Valverde z Louisiana State University, ekspertem od identyfikacji i charakterystyki biologii wielu grup wirusów roślinnych. Analiza wyników jednoznacznie wskazała, iż RbohD jest w sposób istotny statystycznie indukowany w obu typach interakcji – zgodnej i niezgodnej w odpowiedzi na inokulację mechaniczną PVY^{NTN}. Analiza intensywności fluorescencji jak i lokalizacji białka na poziomie ultrastrukturalnym wykazały, że miejsca depozycji RbohD pomiędzy gospodarzami o różnym stopniu odporności w stosunku do PVY^{NTN} znaczącą różnią się. W przypadku odmiany ziemniaka z najwyższym stopniem

odporności 9 (w 9-stopniowej skali) w stosunku do PVY^{NTN} RbohD było związane ze ścianą komórkową i formowaniem ciał paramularnych (PMB, ang. paramular bodies) i struktur wielopęcherzykowych. W związku z tym silna depozycja RbohD w apoplaście komórek roślinnych liści inokulowanych w przypadku gospodarzy, gdzie cząstki wirusa są obserwowane tylko w obszarach inokulacji potwierdzało zaangażowanie w proces fortyfikowania/ wzmacniania ściany. Co z kolei bezpośrednio przekłada się na zjawisko ograniczania przedostania się wirusa poza obszar inokulacji w komórkach odmiany nadwrażliwej. Powyższe wnioskowania potwierdzone zostały poprzez analizę dystrybucji RbohD w roślinach nadwrażliwych, lecz z niższym stopniem odporności względem PVY^{NTN}. W przypadku tej odmiany poziom lokowania RbohD w ścianie komórkowej nie był istotny statystycznie, a podczas interakcji odmiany Rywal - PVY^{NTN} notowano cząstki wirusa poza obszarem (liściem) inokulowanym. Tak zależność pozwoliła stwierdzić, że im bardziej intensywna akumulacja RbohD, której towarzyszy nadprodukcja nadtlenku wodoru w apoplaście, tym bardziej skuteczna kontrola wirusa PVY^{NTN}. Co więcej, w przypadku reakcji nadwrażliwości, gdzie odmiana reagowała nieco niższym poziomem odporności w stosunku do odmiany Sárpo Mira wykazano, iż już jeden dzień po inokulacji PVY^{NTN} dystrybucja RbohD ulega zmianie, w porównaniu do komórek roślin kontrolnych, z wakuoli i systemu błonowego związanego z aparatem Golgiego (ang. *trans Golgi network*), w pęcherzykach ulega przekierowaniu do organelli komórkowych takich jak mitochondria, jądro komórkowe, czy chloroplasty. Gdy pojawiały się objawy reakcji nadwrażliwości w postaci lokalnych zmian nekrotycznych 3 dni po inokulacji wirusem, RbohD było lokowane głównie w chloroplastach i mitochondriach. Akumulacja RbohD i towarzyszący mu wzrost poziomu H_2O_2 w chloroplastach został stwierdzony zwłaszcza pomiędzy 1 a 3 dniem po inokulacji PVY^{NTN}, czyli wtedy gdy dochodzi do formowania nekroz lokalnych. W reakcji nadwrażliwości o niższym poziomie odporności RbohD było aktywniej indukowane w symplaście na terenie organelli komórkowych niż w apoplaście. Induckja depozycji RbohD była notowana także podczas interakcji zgodnej, w przypadku odmiany podatnej inokulowanej PVY^{NTN}. Jednak miejsca lokalizacji były ściśle skorelowane z tkanką przewodzącą i rozwijającymi się komórkami nekrotycznymi. Silne lokowanie RbohD wraz z nadtlenkiem wodoru w plazmodesmach wskazywało na fizyczną możliwość, że cytozolowy H_2O_2 generowany przez aktywację RbohD może dyfundować poprzez plazmodesmy. Inna możliwość to forma transportu długodystansowego poprzez struktury pęcherzykowe, korzystając zarówno z floemu jak i ksylemu.

Podsumowując, po raz pierwszy stwierdzono, iż w reakcji nadwrażliwości ziemniak - PVY^{NTN} o najwyższym stopniu odporności gospodarza limitowanie wirusa PVY^{NTN} było możliwe poprzez silne działanie RbohD na terenie apoplastu. W przeciwieństwie do reakcji nadwrażliwości o niższym poziomie odporności na działanie wirusa, gdzie rejestrowano niższy poziom depozycji RbohD wraz z nadtlenkiem wodoru na terenie ściany komórkowej. Taki poziom indukcji RbohD okazał się nie wystarczający by całkowicie ograniczyć wirusa. W tej sytuacji nieco wyższy poziom RbohD miał notowano na terenie organelli komórkowych (zwłaszcza w chloroplastach). Interesującym zjawiskiem było stwierdzenie indukcji RbohD w przypadku interakcji zgodnej (z odmianą podatną), a preferencyjnym miejscem depozycji były chloroplasty- istotne organellum w kontekście rozwoju systemicznej nekrotyzacji. Ważnym aspektem było także obserwowanie depozycji RbohD w tkankach przewodzących i plazmodesmach. Powyższe wnioski pozwoliły na stwierdzenie, że RbohD może uczestniczyć w różnych typach interakcji PVY^{NTN}-rośliny ziemniaka, ponadto RbohD wraz z H_2O_2 mogą być zaangażowane w systemiczne przekazywanie sygnału oksydacyjnego. Powyższe badania były prowadzone we współpracy dotyczącej bieżącej analizy wyników i konsultacji z Profesorem Rodrigo Valverde z Louisiana State University, były częściowo finansowane z projektu NCN Miniatura2 nr 2018/02/X/NZ9/00832. Dzięki zaproszeniu jakie otrzymałam od Profesora Miguela Arandy (University of ESpinardo, CEBAS-CSIS, Plant Pathology Group, w Hiszpanii) powyższe wyniki zostały opublikowane w specjalnym numerze pt. "*Plant Viruses and Virus-Induced Disease*" czasopisma *International Journal of Molecular Sciences.*

P3. Otulak K., Kozieł E., Lockhart B.E.L., Garbaczewska G., (2017) Ultrastructural effects of PVY^{NTN} infection of *Capsicum annum* L. cv. Yolo Wonder generative organs. *Phytopatologia Mediterranea* 56 (3): 379-391. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-20252.

W przypadku organów wegetatywnych roślin gospodarzy najważniejszymi formami przenoszenia wirusa Y ziemniaka jest transport poprzez wektory jakimi są mszyce oraz poprzez bezpośredni kontakt roślin i wykonywane zabiegi agrotechniczne (Quenonille i wsp.,2013). Szacuje się, że około 20% wirusów roślinnych może być także przenoszonych przez nasiona, a około 1/3 z nich może być przenoszona w ten sposób z udziałem choć jednego typu gospodarza (Johanssen i wsp., 1994). W przypadku potywirusów pewne informacje na ten temat pojawiły się w stosunku do dwóch przedstawicieli wirusa mozaiki grochu PsbMV (ang. ***P**ea **s**eed **b**orne **m**osaic **v**irus*) oraz wirusa mozaiki sałaty LMV (ang. ***L**ettuce **m**osaic **v**irus*).

Natomiast zaobserwowaliśmy ówcześnie brak informacji na ten temat w przypadku wirusa Y ziemniaka, a zwłaszcza PVY^{NTN}. Na drodze prowadzonych badań nad wpływem PVY na zmiany w organach wegetatywnych testowanych roślin zaobserwowaliśmy, iż inokulacja PVY^{NTN} wpływa na spadek liczby zawiązywania kwiatów, a co z tym związane również spadek formowania owoców w porównaniu do roślin kontrolnych. Główny gospodarz PVY, jakim jest ziemniak, w naszym kraju jest rozmnażany w sposób wegetatywny, zważywszy na to, w przypadku analiz części generatywnych roślin zdecydowaliśmy się na gospodarza jakim jest papryka- rozmnażana przez nasiona a ponadto roślina samopylna.

Celem badań było sprawdzenie jaki wpływ ma inokulacja mechaniczna PVY^{NTN} na biologię generatywnych części kwiatów papryki – odmiany Yolo Wonder (charakteryzującą się podatnością względem izolatów PVY, Arroyo i wsp., 1996). W związku z rozpoczętymi pracami nawiązałam współpracę z Profesorem Benhamem E.L. Lockhartem z University of Minnesota, naukowcem z dużym doświadczeniem badawczym odnośnie wirusów przenoszonych przez nasiona, a także ekspertem od identyfikacji serologicznych wirusów roślinnych. Już wstępne ilościowe analizy makroskopowe pozwoliły na wnioskowanie, iż rośliny inokulowane PVY^{NTN} formowały o 38% mniej kwiatów, jak również owoców w porównaniu do roślin zdrowych. Owoce roślin infekowanych wytwarzały 28% mniej nasion. Co więcej wykazano, że w przypadku 30% nasion wykryto cząstki wirusa PVY^{NTN}. Analiza ultrastrukturalna nasion papryki po raz pierwszy wykazała cząstki PVY^{NTN} na terenie cytoplazmy, także wokół i przyłączone do komórek parenchymy integumentów formujących łupinę nasienną. Cząstki deponowane były w postaci warstw w komórkach *endothelium*, zwykle w pobliżu ściany komórkowej, zaś inkluzje cytoplazmatyczne były obecne w zdegradowanym *endothelium*. Co istotne cząstki wirusa były także związane ze ścianą komórkową na powierzchni zarodka, a inkluzje wirusowe w zgniecionych warstwach komórek pomiędzy samym zarodkiem a komórkami endospermy. Kolejnym krokiem było zweryfikowanie w jaki sposób będą rozwijały się siewki z zainfekowanych nasion. Wykazano, że 66% nasion papryki odmiany Yolo Wonder zainfekowanych PVY^{NTN} formuje młodociane siewki. Dalsza analiza części wegetatywnych młodych roślin wskazała, że 30% analizowanych liści papryki była zainfekowana. Testy DAS-ELISA zweryfikowano także analizą immunofluorescencyjną, gdzie sygnał zielonej fluorescencji świadczący o obecności wirusa notowano w epidermie i wiązkach przewodzących (głównie we floemie). Cząstki wirusa i inkluzje cytoplazmatyczne obserwowano w mezofilu i floemie. Tym samym biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, udowodniono że wirus PVY^{NTN} w nasionach papryki jest w stanie przenosić się do następnego pokolenia z około 30%

skutecznością. Kolejnym weryfikowanym elementem było sprawdzenie w jaki sposób wirus dostał się bezpośrednio do nasion. W tym wypadku możliwe są dwie ścieżki. Pierwsza pośrednia poprzez infekcję gametofitów przed zapłodnieniem lub poprzez bezpośrednią infekcję zarodka po zapłodnieniu. Analizom ultrastrukturalnym oraz lokalizacjom wirusa wraz z kwantyfikację poddano zarówno zalążnie z zalążkami oraz pylniki papryki z roślin inokulowanych PVY^{NTN}. Wykazano, że cząstki i inkluzje były obecne na terenie tkanek zalążni (w ścianie zalążni a także w komórkach łożyska- często na terenie wakuol). Natomiast w zalążku obserwowane je w komórkach integumentów oraz w komórkach ośrodka, jednakże woreczek zalążkowy jak dotąd pozostawał wolny od śladów wirusa. Tak więc sam gametofit żeński papryki jak dotąd wykluczono jako źródło infekcji PVY^{NTN}. Analiza pylników i ziaren pyłku papryki pochodzących z bezpośrednio inokulowanych roślin wskazała, że cząstki PVY^{NTN} mogą być obecne wewnątrz ziaren pyłku, jak również zasocjowane na powierzchni egzyny. Immunolokalizacja wykazała epitopy PVY^{NTN} na terenie kiełkującej łagiewki pyłkowej. Co więcej stwierdzono obecność cząstek PVY^{NTN} oraz inkluzji wirusowych wewnątrz dojrzałych pylników papryki, a konkretnie wewnątrz różnicujących się komórek endotecjum oraz pośród pozostałości tapetum. Powyższe obserwacje wskazują jednoznacznie, że gametofit męski papryki może być źródłem infekcji w później formowanym nasieniu, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku roślin samopylnych do których papryka należy. Reasumując, udokumentowano pierwszy raport dotyczący potencjalnego wpływu PVY^{NTN} na zmiany w organach generatywnych roślin papryki. Wnioski płynące z przeprowadzonych analiz wskazują, że mogą być potencjalne dwie drogi źródeł PVY^{NTN} w nasionach na drodze podwójnego zapłodnienia. Bardziej prawdopodobna poprzez ziarna pyłku i/lub dotarcie przy pomocy łagiewki pyłkowej. Drugą opcją może być transfer poprzez integumenty przekształcające się do łupiny nasiennej. Powyższe wnioski są niezwykle istotne dla poznania pełnej epidemiologii patogena.

P4. Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Lockhart B.E.L., (2018) Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by *Potato virus Y* (PVY^{NTN}). *International Journal of Molecular Sciences* 19(3): 862 DOI:10.3390/ijms19030862, *article invited to the special issue: Plant Innate Immunity 2.0*.

P5. Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Bujarski J.J, (2018) Spatiotemporal changes in xylan-1/xyloglucan and xyloglucan xyloglucosyl transferase (XTH-Xet5) as a step-in of ultrastructural cell wall remodelling in Potato–*Potato Virus Y* (PVY^{NTN})

Hypersensitive and Susceptible Reaction. ***International Journal of Molecular Sciences*** **19(8): 2287, DOI:10.3390/ijms19082287,** ***article invited to the special issue: Plant Viruses and Virus-Induced Diseases.***

P7. Otulak-Kozieł K, Kozieł E, Lockhart B, Bujarski J.J. (2020) The Expression of Potato Expansin A3 (*StEXPA3*) and Extensin4 (*StEXT4*) Genes with Distribution of StEXPAs and HRGPs-Extensin Changes as an Effect of Cell Wall Rebuilding in Two Types of PVY ^{NTN} -*Solanum tuberosum* Interactions. ***Viruses*****, 12(1), 66; DOI: 10.3390/v12010066. Special issue '*The complexity of the Potyviral Interaction Network*'.**

Istotnym celem moich badań było wykazanie, że inokulacja wirusem PVY^{NTN} wpływa nie tylko na zmiany symplastu komórki roślinnej, ale także wpływa na dynamikę zmian zachodzących na terenie apoplastu ze szczególnym uwzględnieniem ściany komórkowej. Temu zagadnieniu poświęciłam trzy publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego. Podjęcie przez nas powyższego celu badań było podyktowane faktem, iż ściana komórkowa bezwzględnie zapewnia integralność komórce roślinnej, ale przede wszystkim spełnia rolę pierwszego punktu kontaktowego w przypadku stresów abiotycznych i biotycznych (Malinovsky i wsp., 2014). Stanowi element wymiany informacji i komunikacji ze środowiskiem zewnętrznym. Ściana komórkowa może pełnić rolę fizycznej bariery dla infekcji wirusowej, a także utrudniać potencjalny transport międzykomórkowy. Dane literaturowe dotyczące kompozycji i modyfikacji ściany komórkowej w sytuacji odpowiedzi obronnej podczas interakcji roślina-patogen są skoncentrowane głównie na mikroorganizmy, które są bezpośrednimi mechanicznymi destruktorami ściany, takie jak bakterie czy grzyby. Z uwagi na znikome informacje dotyczące wpływu infekcji wirusowej na modyfikację ściany podjęliśmy się porównania, czy w przypadku dwóch typów interakcji zgodnej i niezgodnej (reakcji nadwrażliwości) zachodzi przebudowa apoplastu i jakie jest podłoże tego procesu. Dzięki współpracy z Instytutem Hodowli Aklimatyzacji Roślin, Oddziałem w Boninie pozyskaliśmy materiał wyjściowy do badań wraz z certyfikowanym testem na obecność wirusa. Analiza ultrastrukturalna roślin ziemniaka inokulowanych PVY^{NTN} z wysokim poziomem odporności (odmiana Sárpo Mira) oraz roślin podatnych odmiany Irys była prowadzona we współpracy z Profesorem Benhamem E. Lockhartem z University of Minnesota i pozwoliła stwierdzić, iż w efekcie inokulacji PVY^{NTN} w obu typach interakcji indukowane są zjawiska związane ze zmianami struktury ściany, lecz różne dla tych dwóch typów interakcji **(P4).** W czasie interakcji zgodnej obserwowano fałdowania w przebiegu ściany komórkowej, jej struktura była nienaturalnie

rozluźniona. W obszarach gdzie wirusowe inkluzje cytoplazmatyczne były połączone z plazmolemmą, także w obszarze plazmodesm obserwowano silne zmiany struktury ścian komórkowych, którym towarzyszyło nagromadzenie ciał paramularnych i struktur błonowych. Reakcji nadwrażliwości towarzyszyły zaś inwaginacje ścian komórkowych. Materiał kalozowy deponowany był nie tylko w obszarze plazmodesm, czy też płytek sitowych na terenie floemu, ale również wzdłuż ścian komórek miękiszowych i pomiędzy ścianą a plazmolemmą. Częstym zjawiskiem było także odkładanie związków fenolowych, a na terenie wszystkich tkanek obserwowano dynamiczne formowanie struktur wielopęcherzykowych MVB (ang. *multivesicular bodies*) kierowanych do wakuoli.

Skoro podczas reakcji nadwrażliwości obserwowano nagromadzenie kalozy, kolejnym krokiem było sprawdzenie lokalizacji białka jednocześnie związanego z odpowiedzią na patogeny (z grupy ang. *pathogenesis-related protein*) PR-2 oraz z aktywnością β-1,3- glukanazy, odpowiedzialnej za hydrolizę kalozy [E.C.3.2.1.39]. Stwierdzono, że obie reakcje indukują depozycję PR-2, jednakże podczas interakcji zgodnej indukcja zachodzi na wyższym poziomie, a preferencyjnym miejscem lokowania jest ściana komórkowa. Podczas gdy w HR takim obszarem jest wakuola. Wykonano również lokalizację głównego enzymu/białka wpływającego na strukturę ściany komórkowej jaką jest katalityczna podjednostka syntazy celulozy CesaA4. Analiza intensywności fluorescencji oraz deponowania cząstek złota koloidalnego wraz z metodami kwantyfikacyjnymi na poziomie ultrastrukturalnym pozwoliły stwierdzić, iż inokulacja wirusem PVY^{NTN} spowodowała spadek CesA4 w stosunku do roślin kontrolnych, co więcej był on bardziej znaczący w przypadku HR niż w przypadku roślin podatnych. Plazmalemma, struktury błonowe i wakuola znacznie bardziej niż ściana komórkowa były miejscem preferencyjnym dla lokalizacji CesA4 niezależnie od poziomu odporności gospodarza. Lokalizacja wakuolarna może być efektem sekwestracji CesA4 do wakuol poprzez bardzo aktywny udział struktur wielo-pęcherzykowych i pęcherzyków pre-wakuolarnych – a proces ten szczególnie uwidocznia się w reakcji nadwrażliwości. Na podstawie powyższych danych trudno było jednoznacznie stwierdzić jakie mechanizmy zmian w ścianie komórkowej są charakterystyczne dla danego typu interakcji, ale bez wątpienia wskazywały na to, że na efekty zmian apoplastu wpływa aktywność dystrybucji komponentów ściany komórkowej zachodząca także na terenie symplastu komórki roślinnej zarówno podczas HR jak i interakcji zgodnej.

We współpracy z Profesorem J.J. Bujarskim z Uniwersytetu Northern Illinois kontynuowaliśmy badania koncentrujące się wokół czasoprzestrzennych zmian

ksylanów oraz podstawowego enzymu uczestniczącego w metabolizmie ksyloglukanów, jakim jest transferaza ksyloglukozylo-ksyloglukanu (XTH-Xet5), jako weryfikacja zmian w wybranych niecelulozowych polisacharydów ściany **(P5).** Dystrybucja *in situ* komponentów hemicelulozowych matiks ściany komórkowej wskazała, iż podczas interakcji zgodnej ziemniak odmiany Irys-PVY^{NTN} wzrosła depozycja ksylanów, podczas gdy w interakcji niezgodnej ziemniak odmiany Sárpo Mira- PVY^{NTN} poziom ksylanu/ksyloglukanu spadał. Co więcej, inokulacja PVY^{NTN} znacząco wpływa na przekierowanie depozycji XTH-Xet5 – niezależnie od typu interakcji, porównując z kontrolą. Lokalizacje na poziomie ultrastrukturalnym wskazują, iż XTH-Xet5 preferencyjnie lokowała się w ścianie komórkowej i pęcherzykach w roślinach podatnych zainfekowanych PVY^{NTN}, w odpornych wzrost poziomu XTH-Xet5 był obserwowany w cytoplazmie, ścianie, podjednostkach aparatu Golgiego. Ponadto stwierdzono, że reakcja nadwrażliwości aktywuje XTH-Xet5 w obszarze syntezy tego enzymu, następnie transferaza jest aktywnie transportowana do cytoplazmy, ściany i wakuoli. Podczas HR obserwowaliśmy stopniową i regularną indukcję poziomu XTH-Xet5. Enzym ten katalizuje *in vitro* formowanie połączeń kowalencyjnych pomiędzy ksyloglukanami oraz pomiędzy ksyloglukanami a substratami niecelulozowymi. Pozwala to wnioskować, iż w przypadku interakcji Sárpo Mira- PVY^{NTN} intensywność depozycji XTH-Xet5 ma związek ze wzmacnianiem ściany komórkowej. Jednakże, kolejnym postawionym celem było, aby jednoznacznie stwierdzić jaki mechanizm towarzyszy danej konkretnej interakcji.

W ramach realizacji otrzymanego przeze mnie projektu NCN Miniatura 2 (nr 2018/02/X/NZ9/00832) rozpoczęłam badania nad udziałem dwóch grup białek ściany komórkowej, wpływających na jej rearanżację i modyfikacje, nad ekstensynami i ekspansynami **(P7).** Współpracując i analizując dostępne dane sekwencyjne, między innymi w oparciu o informacje zawarte w '*Potato Genome Sequencing Consortium*' wraz z Profesorem Benhamem E.L. Lockhartem (Uniwersytet Minnesota) wytypowaliśmy geny, które będą poddane analizom ekspresji. We współpracy z Profesorem J.J. Bujarskim (Uniwersytet Northern Illinois) przeprowadziliśmy analizę qPCR ekspresji genów ekspansyny 3 oraz ekstensyny 4 ziemniaka podczas interakcji zgodnej i niezgodnej z PVY^{NTN}. Wyniki wykazały jednoznacznie stopniowy wzrost ekspresji ekspansyny 3 (*StEXPA3*) w przedziale 0-30 dni po inokulacji (dpi) PVY^{NTN}. Z kolei w przypadku genu ekstensyny 4 ziemniaka (*StExt4*) notowano stopniowy wzrost ekspresji w obu typach interakcji w przedziale 0-30 dpi PVY^{NTN}, jednakże wzrost w przypadku reakcji nadwrażliwości był w sposób istotny statystycznie większy, porównując z próbami z roślin podatnych. Wnioski odnośnie ekspresji genów zestawiliśmy z analizą lokalizacji białek. Do tego celu zaprojektowaliśmy przeciwciała

skierowane przeciw ekspansynie ziemniaka, analiza bioinformatyczna przeprowadzana wspólnie z Profesorem J.J. Bujarskim wskazała, iż wybierając najbardziej konserwatywny region C-końca ekspansyn ziemniaka jesteśmy w stanie wykryć StEXP3 ale także StEXP4,6 oraz 23. Lokalizacja immunofluorescencyjna jak i metoda immunozłotowa pozwoliły stwierdzić, iż interakcji zgodnej ziemniak odmiany Irys - PVY^{NTN} towarzyszy proces rozluźniania ściany komórkowej z zaangażowaniem ekspansyn ziemniaka, w przeciwieństwie do reakcji nadwrażliwości. W przypadku interakcji niezgodnej ziemniak odmiany Sárpo Mira ze zidentyfikowanym genem nadwrażliwości Ny_{Smira} - PVY^{NTN} stwierdzono silny wzrost lokalizacji ekstensyn z grupy HGRP, czyli glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę. Depozycja HRGP była w dużej mierze związana ze ścianą komórkową, ale stwierdzono obecność tej grupy glikoprotein także na terenie symplastu. Indukcja ekspresji *StExt4* oraz silny wzrost HRGP-ekstensyn w odpowiedzi na indukcję PVY^{NTN} jednoznacznie wskazują, że reakcji nadwrażliwości towarzyszy przebudowa ściany związana ze wzmacnianiem jej struktury. Co więcej, proces ten może być postrzegany jako jeden z elementów odpowiedzi obronnej roślin ziemniaka na działanie patogena. Zmiany wewnątrzkomórkowe i dystrybucja ekstensyn może podlegać regulacji w sposób zależny od typu interakcji.

Nasze analizy dotyczące interakcji ziemniak – PVY^{NTN} po raz pierwszy prezentują wnioski dotyczące charakteru i przebiegu zmian ściany komórkowej w interakcji z potywirusami, a także pogłębiają dane dotyczące zmian apoplastu w infekcji patogenami. Pozwalają wnioskować, iż im niższy udział ekspansyn, tym wyższy poziom odporności rośliny na działanie wirusa. Co niezwykle istotne rozwikłanie stawianych hipotez prowadzi do stawiania sobie nowych bardziej szczegółowych pytań. Co ciekawe i wymagające dalszych badań to obserwacja, iż StEXP podczas reakcji nadwrażliwości mogą lokalizować się w symplaście, w kontakcie z błonami oraz w cytoplazmie. W przeciwieństwie do roślin podatnych, gdzie dominuje lokowanie w ścianie komórkowej. Może to oznaczać, iż dystrybucja ekspansyn jest znacząco różna i ściśle zależna od typu interakcji ziemniak - PVY^{NTN}. Kolejny ciekawy wniosek, wymagający dalszego zgłębienia to udokumentowanie lokalizacji ekspansyn w plazmodesmach, zwłaszcza wtedy gdy ściana komórkowa jest zmieniona strukturalnie w ścisłym kontakcie z inkluzjami cytoplazmatycznymi wirusa.

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

1. Wykazano, że na terenie symplastu komórki roślinnej organów wegetatywnych w wyniku interakcji zgodnej i niezgodnej z wirusem PVY^{NTN} organella takie jak retikulum endoplazmatyczne, mitochondria, czy chloroplasty a nawet jądro komórkowe mogą być zaangażowane w proces rozwijającej się patogenezy lub reakcji obronnej rośliny. Ponadto, wykazano, że forma i struktura inkluzji cytoplazmatycznych wirusa nie może stanowić cytologicznego kryterium rozróżniającego szczepy wirusa (np. PVY^{NTN} od PVY^{0}), ani nie zależy w żaden sposób od typu interakcji czy poziomu odporności gospodarza.

2. Zmienna dystrybucja homologa D oksydazy wybuchu tlenowego (RbohD), jako główne źródło ROS podczas interakcji roślin, na terenie symplastu i apoplastu komórki roślinnej w efekcie inokulacji PVY^{NTN} jest zależna od typu interakcji. Zróżnicowanie dystrybucji RbohD jest efektem dualnej roli tego białka. W reakcji nadwrażliwości wpływa na ograniczenie wirusa tylko do miejsca inokulacji. W przypadku roślin podatnych może być aktywnym komponentem systemicznej transdukcji sygnałów, czemu towarzyszy systemiczna nekrotyzacja.

3. Stwierdzono wpływ infekcji PVY^{NTN} na zmiany w organach generatywnych roślin papryki, redukcję formowania kwiatów i spadek liczby zawiązywanych owoców. Po raz pierwszy wykazano, że PVY^{NTN} jest w stanie przenosić się poprzez nasiona papryki odmiany Yolo Wonder do następnego pokolenia. Ponadto, gametofit męski papryki może być potencjalnym źródłem dostania się cząstek wirusa do nasion w efekcie procesu podwójnego zapłodnienia. Obecność wirusa w nasionach może być także efektem transferu poprzez integumenty przekształcające się w łupinę nasienną.

4. Udowodniono, że podczas reakcji nadwrażliwości (HR) ziemniak- PVY^{NTN} zmiany zachodzące na terenie apoplastu komórek roślinnych prowadzą do procesu wzmacniania ściany komórkowej z udziałem ekstensyn z grupy HRGP. Zjawisku temu towarzyszy aktywacja transferazy ksyloglukanów XTH-Xet5, odpowiedzialnej za tworzenie połączeń kowalencyjnych pomiędzy niecelulozowymi składnikami ściany. Natomiast w przypadku interakcji podatnych roślin ziemniaka - PVY^{NTN} przebudowa ściany komórkowej prowadzi do rozluźniania jej struktury z zaangażowaniem ekspansyn, a zjawisko to jest dodatkowo wspomagane poprzez indukcję białka PR-2, odpowiadającego za hydrolizę kalozy i wskaźnik rozwijającej się infekcji.

Bibliografia:

Arroyo R., M.J. Soto, J.M. Martinez-Zapater and F. Ponz, (1996). Impared cell-to-cell movement of Potato virus Y in pepper plants carrying the ya (pr2) resistance gene. Molecular Plant Microbe Interactions 9, 314–318.

Baebler, Š.; Coll, A.; Gruden, K. Plant Molecular Responses to Potato Virus Y: (2020) A Continuum of Outcomes from Sensitivity and Tolerance to Resistance. Viruses 2020, 12, 217.
Chung BY, Miller WJ, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. Proc Natl Acad Sci USA 105:5897–5902.
Chrzanowska, M., (1994). Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. Phytopathol. Pol. 8, 15–20.
Chrzanowska M (1991) New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY N) found recently in Poland. Potato Res 34:179–182.
Edwardson, J.R., Christie, R.G., Ko, N.J., (1984). Potyvirus cylindrical inclusions subdivision-IV. Phytopathology 74, 1111–1114.
Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol Plant Microbe Interact. 19(7):711-24.
Johansen E., M.C. Edwards and R.O. Hampton, (1994). Seed transmission of viruses: current perspectives. Annual Review of Phytopathology 32, 363–386.
Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P (2007) Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. PLoS Biol 5:e220.
Kwak, J.M.; Mori, I.C.; Pei, Z.M.; Leonhardt, N.; Torres, M.A.; Dangl, J.L.; Bloom, R.E.; Bodde, S.; Jones, J.D.G.;Schroeder, J.I. (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. EMBO J. 2003, 22, 2623–2633.
LeRomancer, M., Kerlan, C., (1991). Superficial ringspot necrosis of potato tubers: a recent disease caused by potato virus Y. Agronomie 11, 889–900.
Lukan, T.; Baebler, Š.; Pompe-Novak, M.; Gucek, K.; Zagoršcak, M.; Coll, A.; Gruden, K. (2018) Cell Death Is Not Sufficient for the Restriction of Potato Virus Y Spread in Hypersensitive Response-Conferred Resistance in Potato. Front. Plant Sci. 2018, 9, 168.
Malinovsky, F.G.; Fangel, J.U.; Willats, W.G.T. (2014) The role of the cell wall in plant immunity. Front. Plant Sci. 5, 1–12.
Noirot, E.; Der, C.; Lherminier, J.; Robert, F.; Moricova, P.; Kiêu, K.; Leborgne-Castel, N.; Simon-Plas, F.; Bouhidel, K. (2014) Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. J. Exp. Bot., 65, 5011–5022.
Otulak K, Garbaczewska G (2010) Ultrastructural events during hypersensitive response of potato cv. Rywal infected with necrotic strains of potato virus Y. Acta Physiol Plantarum 32:635–644.
Otulak, K.; Garbaczewska, G. (2010) Localisation of hydrogen peroxide accumulation during Solanum tuberosum cv. Rywal hypersensitive response to Potato virus Y. Micron 2010, 41, 327–335.
Otulak, K.; Garbaczewska, G. (2011) Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to Potato virus Y. Micron 2011, 42, 381–392.
Quenouille J., N. Vassilakos and B. Moury, (2013). Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. Molecular Plant Pathology 14, 439–452.
Rahoutei, J.; García-Luque, I.; Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection effect on PSII structure and function. Physiol. Plant., 110, 286–292.
Richael, C. and Gilchrist, D. (1999). The hypersensitive response: a case of hold or fold? Physiol. Mol. Plant Path. 55:5-12.
Robert Y, Woodford JAT, Ducray-Bourdin DG (2000) Some epidemiological approaches to the control of aphid-borne virus diseases in seed potato crops in northern Europe. Virus Res 71:33–47.
Suzuki, N.; Miller, G.; Morales, J.; Shulaev, V.; Torres, M.A.; Mittler, R. (2011) Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. Curr. Opin. Plant Biol., 14, 691–699.
Szajko, K., Chrzanowska, M., Witek, K., Strzelczyk-Zyta, D., Zagórska, H., Gebhardt, C., Hennig, J., Marczewski, W., (2008). The novel gene Ny-1 on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to Potato virus Y and is an alternative to Ry genes in potato breeding for PVY resistance. Theor. Appl. Genet. 116, 297–303.
Szajko K, Strzeczyk-Zyta D, Marczewski W (2014) Ny-1 and Ny-2 genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. Mol Breed 34:267–271.
Szajko, K.; Yin, Z.; Marczewski,W. (2019) Accumulation of miRNA and mRNA Targets in Potato Leaves Displaying Temperature-Dependent Responses to Potato Virus Y. Potato Res. 2019, 62, 379–392.
Tomczyńska, I.; Jupe, F.; Hein, I.; Marczewski,W.; Śliwka, J. (2014) Hypersensitive response to Potato virus Y in potato cultivar Sárpo Mira is conferred by the Ny-Smira gene located on the long arm of chromosome IX. Mol. Breed. 34, 471–480.
Torres, M. A., Dangl, J. L. and Jones, J. D. G (2002). Arabidopsis gp91 phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:517-522.

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Res 74:157–175.
Valkonen JPT (2007) Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil D, Bradshaw J, Gebhardt C, Govers F, Taylor M, MacKerron D, Ross H (eds) Potato biology and biotechnology: advances and perspectives. Elsevier, Amsterdam, pp 619–641.
Valkonen JPT (2015) Elucidation of virus-host interactions to enhance resistance breeding for control of virus diseases in potato. Breed Sci 65:69–76.
Zhang, J.; Shao, F.; Li, Y.; Cui, H.; Chen, L.; Li, H.; Zou, Y.; Long, C.; Lan, L.; Chai, J.; et al. (2007) A Pseudomonas syringae elicitor inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. Cell Host Microbe 1, 175–185.

Pkt 5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej - dorobek dodatkowy

1. Przebieg pracy naukowo-badawczej prowadzonej przed uzyskaniem stopnia doktora

a) praca magisterska

Pod koniec studiów magisterskich zdobywałam doświadczenie laboratoryjno-badawcze w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie działając przez trzy lata (2001-2003) jako student-wolontariusz pracując w zespole zajmującym się unikalną rodziną białek wiążących fosfolipidy błonowe w sposób zależny od jonów wapnia, czyli aneksynami. Z tego względu **pracę magisterską wykonywałam w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, w Zakładzie Biochemii Komórki** w Pracowni Biochemii Lipidów pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. Sławomira Pikuły. W 2003 r. uzyskałam tytuł magistra inżyniera rolnictwa, specjalność: Biotechnologia rolnicza; Wydział Rolniczy SGGW w Warszawie na podstawie obrony z wyróżnieniem pracy pt. „**Charakterystyka strukturalno-funkcjonalna izoform aneksyny A6 ulegających ekspresji w komórkach ssaków".** Recenzentem pracy był Pan Profesor dr hab. Zdzisław Markiewicz (Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Zakład Mikrobiologii Stosowanej). **Badania do pracy powstawały w ramach 3-letniego projektu KBN 3P04A00722.** Głównym celem pracy było porównanie dwóch lizoform aneksyny A6, gdzie izoforma druga różni się delecją 18-par zasad, kodującego sekwencję VAAEIL w domenie 7 tego białka. Analiza porównawcza struktury izoform wykazała brak diametralnych różnic w strukturze II-rzędowej białka, ale izoforma II okazała się mniej podatna na proteolizę. Struktura izoformy II okazała się być bardziej sfałdowana, a migracja podczas elektroforezy natywnej zachodziła szybciej niż izoformy I. Zaobserwowano także niższe powinowactwo w stosunku do TNP-GTP i niższy transfer energii fluorescencji z ANXA6-2 na TNP-GTP. Zauważono ponadto, iż obie izoformy wiążą się z anionowymi liposomami (PS), ale izoforma druga wymaga znacznie wyższego stężenia jonów wapnia. Wnioski płynące z przeprowadzonych badań w ramach mojej pracy magisterskiej stały się częścią publikacji:

Strzelecka-Kiliszek A., Buszewska M.E., Podszywałow-Bartnicka P., Pikuła S., **Otulak K.,** Buchet R., Bandorowicz-Pikuła J., (**2008**) Calcium- and pH-dependent localization of annexin A6 isoforms in Balb/3T3 fibroblasts reflecting their potential participation in vesicular transport., *J Cell Biochem*., 104(2):418-34. **Pkty MNiSW 20 pkt**, *Pkty MNiSW**: 100pkt (Lista A z 2019 roku), IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=3,540, IF**$_{\text{5 letni}}$**=3,342.**

b) praca doktorska

Pracę doktorską pt.” Cytologiczna charakterystyka patogenezy roślin porażonych wirusem Y ziemniaka (PVY) różniących się szybkością pojawiania nekroz” **wykonywałam w Katedrze Botaniki, Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie** pod kierunkiem dr hab. G. Garbaczewskiej, prof. nadzw. SGGW. Recenzentami pracy byli: Prof. dr hab. Adam Woźny (UAM, Poznań) oraz prof. Dr hab. Władysław Golinowski (SGGW). Na podstawie obronionej z wyróżnieniem rozprawy doktorskiej, **30.10.2008r uzyskałam stopień doktora nauk rolniczych, specjalność: Biologiczne podstawy rolnictwa i ochrony środowiska; Wydział Rolnictwa i Biologii; SGGW w Warszawie.**

Praca doktorska dotyczyła cytologicznej analizy zmian różnych odmian roślin tytoniu (np. odm. Wiślica i Samsun) oraz różnych odmian roślin ziemniaka (np. Hermes, Igor, Red, Nicola, Niagara, Rywal, Jupitor, Impala) infekowanych dwoma szczepami nekrotycznymi wirusa Y ziemniaka. Praca była wykonywana we współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytutem Badawczym, oddziałem w Młochowie, a jej celem była analiza porównawcza, w jaki sposób różni się na poziomie morfologicznym, anatomicznym i cytologicznym przebieg patogenezy w dwóch kategoriach odmian – takich, które można zaliczyć do grupy o większym stopniu odporności lub odmian typowo podatnych. Stwierdzono, że rośliny odmian odpornych reagowały objawami nekroz lokalnych już trzy dni po inokulacji mechanicznej zarówno szczepem PVY $^{N\text{-}Wi}$ jak i PVY ^{NTN}, podczas gdy odmiany podatne piętnaście dni po infekcji. Cząstki wirusa w tkankach liści inokulowanych odmian odpornych były obserwowane począwszy od 10 godzin po inokulacji. W przypadku odmian odpornych cząstki wirusa były obserwowane głównie w liściach inokulowanych, jednakże pojedyncze skupienia cząstek można było zaobserwować także w liściach powyżej miejsca inokulacji. Zróżnicowanie w obrębie dwóch grup odmian dotyczyło także lokalizacji nadtlenku wodoru, jako elementu reaktywnych form tlenu uczestniczących w przekazywaniu informacji podczas interakcji roślina – patogen. Notowano także zmiany sygnatury wapniowej jako wtórnego przekaźnika szlaków sygnałowych w efekcie reakcji stresowej wraz ze zróżnicowaną immunolokalizacją domeny C roślinnej kalretikuliny (białka opiekuńczego, wiążącego wapń oraz związanego z plazmodesmami). Powyższe wnioski sugerowały zaangażowanie sygnału wapniowego podczas reakcji obronnej rośliny na infekcję wirusem Y ziemniaka.

W 2008 roku w wyniku współpracy trzech zespołów badawczych: Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Młochowie, Instytutu im. Maxa Plancka w Niemczech oraz Pracowni Patogenezy Roślin IBB PAN w Warszawie zmapowano gen nadwrażliwości indukujący odpowiedź nekrotyczną roślin ziemniaka (jednej badanej przeze mnie w pracy doktorskiej odmiany ziemniaka) Rywal. Ziemniak odm. Rywal był pierwszą komercyjną odmianą, dla której określono gen warunkujący odpowiedź w formie nadwrażliwości w stosunku do szczepów nekrotycznych wirusa (Szajko i wsp., 2008). W tym świetle wyniki przeprowadzonych przeze mnie wstępnych analiz zyskały również szerszą interpretację i znaczenie.

Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w postaci trzech artykułów, we wszystkich pracach byłam pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym:

Otulak K., Garbaczewska G., (**2010**) Ultrastructural events during hypersensitive response of potato cv. Rywal infected with necrotic strains of Potato virus Y., *Acta Physiologia Plantarum*, 32: 635–644. **Pkty MNiSW 20**, *Pkty MNiSW **obecnie: 70, IF** $_{\textbf{w roku publikacji}}$ **=1,344, IF**$_{\textbf{5 letni}}$**=1,927.**

Otulak K., Garbaczewska G., (**2010**) Localisation of hydrogen peroxide accumulation during Solanum tuberosum cv. Rywal hypersensitive response to Potato virus Y., *Micron*, 41: 327-335. **Pkty MNiSW 27**, *Pkty MNiSW **obecnie: 100, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=1,649, IF**$_{\text{5 letni}}$**=1,809**.

Otulak K., Garbaczewska G., (**2011**) Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to Potato virus Y., *Micron*, 42 (5): 381-391, DOI: 10.1016/j.micron.2010.11. **Pkty MNiSW 27**, *Pkty MNiSW **obecnie: 100, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=1,527, IF**$_{\text{5 letni}}$**=1,809.**

Ponadto w 2008 roku otrzymałam indywidualną nagrodę III stopnia JM Rektora SGGW za działalność naukową -rozprawę doktorską.

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorem dwóch prezentacji ustnych:

*Garbaczewska G., **Otulak K. (2006)** „Transport wirusów w roślinie". Wygłoszonej w ramach XXXIV Konferencji Grupy Wirusowych Chorób Roślin, Komitetu Ochrony Roślin PAN i XII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, referat, 14-15 wrzesień 2006 Warszawa,*

***Otulak K.,** Garbaczewska G. **(2007)** „Cytologiczna charakterystyka patogenezy roślin porażonych PVY o zróżnicowanym czasie odpowiedzi na infekcję"; XXXV Konferencja Grupy Roboczej Wirusowych Chorób Roślin, Komitetu Ochrony Roślin PAN i XIII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, SGGW w Warszawie, referat 11-12 wrzesień 2007.*

a także autorem dwóch prezentacji posterowych:

***Otulak K.,** Garbaczewska G. **(2007)** II Polsko- Ukraińska Konferencja Weiglowska Mikrobiologia w XXI wieku, Komitet Mikrobiologii PAN, SGGW, poster: "Cytological characteristic of plants infected with potato virus Y (PVY) in varied rapidity of necrosis appearance". 24-26 wrzesień 2007, Materiały konferencyjne s. 258.*

***Otulak K.,** Garbaczewska G. **(2008)** „Ultrastructural calreticulin and calcium ions localization during hypersensitive reaction of potato cultivar Rywal infected PVY NTN". Sympozjum Naukowe „Choroby roślin na tle zmian klimatycznych" oraz Walne Zgromadzenie członków Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, Uniwersytet Przyrodniczy Wrocław, poster 17-19 września 2008 materiały konferencyjne s. 44-45.*

Od grudnia 2008 roku pracowałam jako asystent, a następnie od grudnia 2010 roku jako adiunkt w Katedrze Botaniki, Wydziału Rolnictwa i Biologii; SGGW.

Różne typy interakcji roślina – patogen, ze szczególnym uwzględnieniem reakcji odporności roślin były i są zagadnieniem niezwykle interesującym a jednocześnie aktualnym oraz wciąż nie w pełni poznanym. Ponadto zagadnienia zapoczątkowane podczas mojej rozprawy doktorskiej wyraźnie wskazały na lukę w literaturze krajowej, a także międzynarodowej, dotyczącą zjawiska odpowiedzi rośliny na infekcję wirusową, szczególnie na poziomie ultrastrukturalnym. Zważywszy na fakt, iż wyniki i wnioski sformułowane po obronie rozprawy doktorskiej ułatwiły zwrócenie uwagi na to, jak wiele jest jeszcze niewiadomych dotyczących efektów działania wirusa Y ziemniaka, postanowiłam kontynuować prace dotyczące biologii interakcji roślin z różnymi grupami wirusów.

2. Badania prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 29 prac (w tym 7 prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) opublikowanych w czasopismach z JCR w latach 2010-2020, w tym 28 prac z listy A MNiSW oraz 1 praca z listy B MNiSW.

Jestem autorem 43 doniesień konferencyjnych: 12 doniesień konferencyjnych w postaci prezentacji ustnych oraz 31 w postaci prezentacji posterowych na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

(prowadzone badania i publikacje zostały powiązane w grupy tematyczne)

Otulak K., *Garbaczewska G., (**2011**) Cell-to-cell movement of three genera (+) ss RNA plant viruses., Acta Physiologia Plantarum, 33(2): 249-260, DOI: 10.1007/s11738-010-0538-2.*
Pkty MNiSW 20, *Pkty MNiSW obecnie:70, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =1,344, IF$_{\text{5 letni}}$=1,927

Po obronie rozprawy doktorskiej początkowo zajęłam się analizą porównawczą mechanizmów transportu krótkodystansowego i podsumowaniem najważniejszych danych w tym zakresie, związanych z trzema znaczącymi grupami wirusów roślinnych charakteryzujących się jednoniciowym genomem RNA: *Tobamovirus*, *Potyvirus* oraz *Potexvirus*. Praca przeglądowa dotyczyła przedstawienia najistotniejszych danych w zakresie strategii transportu międzykomórkowego z jakiego korzystają przedstawiciele trzech wspomnianych rodzajów wirusów wraz z zaproponowaniem graficznych schematów obrazujących te procesy w oparciu o najnowszą literaturę. W powyższej pracy dyskutowano udział i rolę determinantów transportu międzykomórkowego, zarówno ze strony rośliny gospodarza jak i samego patogena. **W powyższej pracy byłam pierwszym autorem, autorem zarówno koncepcji jak i manuskryptu artykułu, a także pełniłam rolę autora korespondencyjnego.**

W swojej pracy badawczej prowadzonej we współpracy z ośrodkami krajowymi oraz zagranicznymi koncentrowałam się przede wszystkim na biologii interakcji roślin z różnymi grupami wirusów. Prowadzone badania i publikacje zostały powiązane w grupy tematyczne

a) Badania dotyczące biologii interakcji roślin z wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (ang. *Tobacco rattle virus*, TRV) – w 3 z 4 prac byłam pierwszym autorem, w 4 pracach autorem korespondencyjnym oraz osobą przygotowującą manuskrypt.

Otulak K., *Chouda M., Chrzanowska M., Garbaczewska G., (**2012**) Ultrastructural effects of infection caused by Tobacco rattle virus transmitted by Trichodorus primitivus presents in potato and tobacco tissues, Canadian Journal of Plant Pathology, 34 (1): 126-138.*
Pkty MNiSW *25*, *Pkty MNiSW *obecnie: 70pkt, IF $_{\text{w roku publikacji}}$=1,115, IF$_{\text{5 letni}}$=1,197.*

Jednym z istotnych przyczyn infekcji roślin wirusem nekrotycznej kędzierzawki tytoniu TRV jest przenoszenie tego patogena przez wektory jakim są nicienie z grupy *Trichodorus*, ektopasożyty. Celem publikacji było poznanie zakresu zmian cytopatologicznych na poziomie ultrastrukturalnym i anatomicznym wywołanych TRV który dostał się do badanych roślin poprzez infekcje nicieniami glebowymi, a więc pierwszym miejscem kontaktu z patogenem i jego wektorem był system korzeniowy roślin ziemniaka i tytoniu. Badania wykonywane były we współpracy z Profesor Mirosławą Chrzanowską z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB, oddziałem w Młochowie. Rośliny z moim udziałem były wysadzane do gleb zawierających nicienie w szklarniach oddziału IHAR w Młochowie, a następnie analizowane pod względem symptomów infekcji TRV i poddawane testom DAS-ELISA. Rośliny-gospodarze (ziemniak odmiana Glada oraz tytoń odmiany Samsun) z efektem pozytywnym testów były przeze mnie pobierane i zarówno korzenie jak i części nadziemne poddawane preparatyce do transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz analizie ultrastrukturalnej. Wykazano, iż nicienie poprzez żerowanie z uszkodzeniami włośników i ryzodermy wprowadzają cząstki wirusa do korzeni. Wirus jest aktywnie transportowany to wszystkich tkanek korzenia, a jego wnikanie do wiązek przewodzących skutkuje infekcją systemiczną całej rośliny po około 4 tygodniach po żerowaniu wektora. Zarówno w częściach podziemnych rośliny jak i łodygach i liściach udokumentowano cząstki dwóch długości L i S typowe dla TRV. Wykazano, że szlakiem transportu systemicznego wirusa w przypadku infekcji poprzez wektora był głównie floem, ale cząstki wirusa zaobserwowano również na terenie miękiszu ksylemowego. **We wskazanej pracy byłam autorem koncepcji badań, pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, a także osobą która przeprowadziła analizy ultrastrukturalne i przygotowującą cały manuskrypt.** Wnioski płynące z powyższej publikacji stały się punktem wyjścia do dalszych badań nad TRV, koncentrujących się tym razem na transporcie lokalnym oraz systemicznym wirusa.

Garbaczewska G., ***Otulak K.,*** *Chouda M., Chrzanowska M.* ***(2012)*** *Ultrastructural studies of plasmodesmatal and vascular translocation of Tobacco rattle virus (TRV) in tobacco and potato, Acta Physiologia Plantarum, 34(3): 1229-1238, DOI: 10.1007/s11738-012-0960-8.* **Pkty MNiSW 25, *Pkty MNiSW obecnie: 70, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =1,305, IF$_{\text{5 letni}}$=1,927**

Również we współpracy z Panią Profesor Mirosławą Chrzanowską analizie poddano rośliny tytoniu oraz ziemniaka infekowane tym razem mechanicznie. Efektem powyższej publikacji było udowodnienie, iż cząstki TRV PSG są transportowane systemicznie zarówno w postaci całkowicie opłaszczonej jak i nie w pełni opłaszczonej. TRV w formie cząstek nie w pełni opłaszczonych znacznie częściej był transportowany międzykomórkowo przez plazmodesmy niż systemicznie. W obu tych formach cząstki TRV tworzą zwarte inkluzje nie tylko w tkance miękiszowej ale również na terenie wiązek przewodzących. Co więcej wykazano, iż TRV może być transportowany systemicznie z udziałem zarówno floemu jak i ksylemu. W prowadzonych analizach wirus TRV znacznie częściej dokumentowany był na terenie ksylemu, łącznie z elementami trachealnymi ksylemu. **W powyższej pracy mój udział polegał na analizie wyników zmian anatomicznych i ultrastrukturalnych oraz przygotowaniu całego manuskryptu, byłam też autorem korespondencyjnym.**

Otulak K., *Chouda M., Bujarski J., Garbaczewska G., (**2015**) The evidence of Tobacco rattle virus impact on host plant organelles ultrastructure., Micron, 70: 7-20, DOI: 10.1016/j.micron.2010.11.* **Pkty MNiSW 30, *Pkty MNiSW obecnie 100, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=1,305, IF**$_{5\ \text{letni}}$**=1,927.**

Celem powyższej pracy było zbadanie zaangażowania organelli komórkowych w proces infekcyjny wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu. **W powyższej pracy byłam autorem koncepcji badań, przeprowadziłam większość badań ultrastrukturalnych i lokalizacje techniką ang. *immunogold labelling*, a wyniki analizowałam i konsultowałam we współpracy z profesorem Józefem J. Bujarskim (*Uniwersytet Illinois*)**. W powyższej pracy wykazaliśmy, iż nie tylko cytoplazma jest miejscem replikacji i składania cząstek TRV. W zależności od poziomu zaawansowania proces infekcyjny podatnych gospodarzy TRV zachodzi z udziałem organelli komórki roślinnej. Po raz pierwszy udokumentowano obie formy cząstek TRV w jądrze komórkowym wraz z lokalizacją białka płaszcza wirusa w kariolimfie, a nawet na terenie jąderka. Jak udało się ustalić, efektem procesu infekcyjnego TRV są bardzo silne zmiany mitochondriów, po raz pierwszy zwrócono uwagę ma możliwość formowania struktur pęcherzykowych w formie egzosomów mitochondrialnych- zawierających cząstki wirusa, uwalniających się do cytoplazmy komórki roślinnej. Udowodniono także silną dezorganizację chloroplastów jako wynik infekcji TRV, a wewnątrz tych organelli notowano cząstki wirusa obu długości oraz lokalizowano białko kapsydu tego wirusa. **W powyższej pracy przygotowałam manuskrypt do publikacji oraz byłam autorem korespondencyjnym.**

Otulak K., *Kozieł E., Garbaczewska G., (**2016**) Ultrastructural impact of tobacco rattle virus on tobacco and pepper ovary and anther tissues. Journal of Phytopatology, 164: 226-241, DOI: 10.1111/jph.12450.* **Pkty MNiSW *20,* *Pkty MNiSW *obecnie 40, IF*** $_{\text{w roku publikacji}}$***=0,945, IF***$_{5\ \text{letni}}$***=1,017.***

Celem powyższej pracy było ustalenie jaki wpływ ma infekcja TRV na strukturę organów generatywnych roślin tytoniu i papryki. Ponadto, cel stanowiło również sprawdzenie czy szczep TRV-PSG może być przenoszony przez nasiona (co było potencjalnie prawdopodobne porównując z innymi testowanymi przedstawicielami *Tobravirus*). Ustalono, że infekcja TRV wpływa redukująco na ilość formowanych kwiatów i zawiązywanych owoców, a także na liczbę nasion w owocni, zarówno w przypadku papryki jak i tytoniu. Udowodniono, że cząstki wirusa obu typów są obecne na terenie komórek ścian zalążni oraz wiązek przewodzących zalążni. Po raz pierwszy lokalizacje immunofluorescencyjne oraz na poziomie ultrastrukturalnym pozwoliły stwierdzić, że wirus był obecny wewnątrz i na powierzchni ziaren pyłku, co więcej niezwykle istotnym był fakt, że w sposób powtarzalny notowano jego obecność w nasionach w komórkach *endothelium* i na powierzchni zarodka. Powyższe wyniki pozwoliły udowodnić, iż zarówno ziarna pyłku jak i zalążnia wraz z zalążkami mogą stanowić źródło wirusa przekazywane do następnego pokolenia. **Mój udział w publikacji polegał na organizacji koncepcji badań, przeprowadzeniu wszystkich analiz ultrastrukturalnych i lokalizacji białka kapsydu wirusa z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej oraz na napisaniu i organizacji manuskryptu. Jestem także autorem korespondencyjnym powyższej pracy.**

b) Badania dotyczące biologii interakcji roślin z wirusem karłowatości śliwy (ang. *Prune dwarf virus,* PDV) – w 3 z 5 prac byłam autorem korespondencyjnym, współautorem manuskryptu.

Kozieł E., ***Otulak K.****, Garbaczewska G.* ***(2015)*** *Phylogenetic analysis of PDV movement protein compared to Bromoviridae members as justification of possible intercellular movement. Acta biologica Cracoviensia. Series Botanica 572(2):1-9 DOI: 10.1515/abcsb-2015-0019.* **Pkty MNiSW 20,*Pkty MNiSW obecnie 40, IF $_{\text{w roku publikacji}}$=0,625, IF$_{\text{5 letni}}$=1,00.**

W przypadku wirusa karłowatości śliwy (*ang. Prune dwarf virus*, PDV) w literaturze światowej dominowało zawężenie tematyki badań tylko do doskonalenia metod wykrywania wirusa. Pozostawiono ogromną lukę w wiedzy o PDV, doprowadziło to do całkowitego pominięcia kluczowych dla zrozumienia interakcji wirus-roślina, cyklu zmian patologicznych w różnych roślinach gospodarzach oraz mechanizmu transportu międzykomórkowego i systemicznego tego wirusa. Wyjaśnienie tej problematyki stało się tematem pracy doktorskiej mgr Edmunda Kozieła, którego byłam promotorem pomocniczym. Wstępem do tej pracy była analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych (*ang. movement protein*, MP) dostępnych w bazie NCBI dla izolatów/szczepów PDV oraz wirusów należących do tej samej rodziny *Bromoviridae* ale o poznanym mechanizmie transportu międzykomórkowego. Celem tej publikacji było przedstawienie zmienności sekwencji MP izolatów PDV (*wszystkich dostępnych w bazie NCBI w roku 2015*) w zależności od pochodzenie geograficznego, a przede wszystkim podobieństwa całej sekwencji tego białka i domeny funkcjonalnej wiążącej RNA (ang. RNA binding domain, RBD) do przedstawicieli rodziny *Bromoviridae, czyli takich wirusów* o poznanym mechanizmie transportu jak: wirus mozaiki stokłosy (*ang. Brome mosaic virus*, BMV), wirusa mozaiki lucerny (ang. *Alfalfa mosaic virus*, AMV) oraz wirus chlorotycznej plamistości wspięgi (ang. *Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV). Był to niezbędny etap w pracy, ponieważ w rodzinie *Bromoviridae* występują prawie wszystkie typy transportu międzykomórkowego, charakterystyczne dla wirusów roślinnych zależne w dużej mierze od sekwencji MP oraz domeny funkcjonalnej wiążącej RNA (*RNA binding domain*, RBD). Wyniki analiz pozwoliły wyróżnić 3 wyraźne grupy izolatów PDV: 2 składające się tylko z polskich izolatów, a 1 mieszana składająca się głównie z izolatów amerykańskich i włoskich. Pozwoliło to na potwierdzenie częściowej zależności między zmiennością sekwencji MP a pochodzeniem geograficznym izolatu. Co ważniejsze, wykonane analizy porównawcze pomiędzy izolatami PDV, AMV, BMV, CMV i CCMV pozwoliły na ustalenie homologii sekwencji aminokwasowej, która wyniosła od 16 do 34%. Wyniki wskazały, że izolaty PDV mają największe podobieństwo do izolatów AMV na poziomie 34% uwzględniając pełną długość sekwencji MP. Podobieństwo to wzrosło do 40%, gdy porównano domeny funkcjonalne wiążące RNA obu wirusów. Wskazało to na potencjalne podobieństwo mechanizmów transportu AMV i PDV i pozwoliło wybrać metodykę do dalszych pogłębionych analiz mechanizmów transportu. **Moją rolą w publikacji była analiza wyników i opracowanie tychże analiz oraz opisanie części wyników i dyskusji w powyższej publikacji.**

Kozieł E., ***Otulak K.****, Lockhart B.E.L., Garbaczewska G.,**(2017)**. Subcelullar localization of proteins associated with Prune dwarf virus replication. European Journal of Plant Pathology 149:653–668, DOI: 10.1007/s10658-017-1215-8,* **Pkty MNiSW 30, *Pkty MNiSW obecnie: 100, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =1,466, IF$_{\text{5 letni}}$=1,754.**

Celem publikacji było poznanie tkankowej i subkomórkowej dystrybucji dwóch białek wirusa PDV zaangażowanych, w jak dotąd, niescharakteryzowany proces replikacji PDV, to jest: białka płaszcza (ang. coat protein, CP)-odpowiedzialnego za proces aktywacji genomu wirusowego oraz białka P1 (*ang. P1 protein*), które współtworzy kompleks replikacyjny wirusa oraz potrafi zakotwiczać wirusowe RNA (*ang. viral RNA*, vRNA) w strukturach błonowych komórki gospodarza. Analizy przeprowadzono na zainfekowanych wirusem roślinach testowych tytoniu (*Nicotiana tabacum*, odmiany Samsun). Z pomocą możliwości jakie dają metody immunoznakowania (fluorescencyjnego na poziomie tkanek i metodą immunozłotową złotowego na poziomie struktur komórkowych) ustalono, że CP oraz białko P1 lokalizują się w strukturach błonowych, takich jak retikulum endoplazmatyczne i tonoplast, ale także w generowanych tylko podczas infekcji PDV specjalnych błonowych sferulach (ang. *spherules*). Dodatkowo analizy ultrastrukturalne pozwoliły poznać charakterystyczne zmiany w obrębie systemu błon wewnętrznych komórki związane z obecnością wirusa, które stworzyły bazę dla rozpoznawania infekcji PDV generowanych na innych gospodarzach. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że oba białka są związane z różnymi strukturami komórkowymi, a ich lokalizacja/depozycja determinują przebieg procesu replikacji PDV w komórkach gospodarza. Co więcej dane dotyczące miejsc występowania białka P1 zrodziły pytania o możliwości występowania potencjalnych regionów w strukturze białka pozwalających na interakcje/kotwiczenie w błonach gospodarza. By odpowiedzieć na to pytanie w niniejszej publikacji przeprowadzono dodatkowo analizy bioinformatyczne w oparciu o programy TMHMM oraz ΔG Prediction Server, by ustalić istnienie domen transbłonowych. Wyniki tych analiz pokazały, że białko P1 posiada potencjalnie taką domenę. Jej występowanie potwierdziły analizy wykonane w programie AIDA, który pozwolił na stworzenie struktury 3D białka i potwierdzenie, że wytypowany fragment ma odpowiednią budowę przestrzenną by tworzyć domenę transbłonową a jego otoczenie przestrzenne stabilizuje taką strukturę. Publikacja wraz z częścią badań eksperymentalnych została wykonana w ścisłej współpracy z Profesorem Benhamem E.L. Lockhartem z Department of Plant Pathology, University of Minnesota w USA. **Moja rola w publikacji polegała na: opracowaniu modyfikacji metodyki lokalizacji, działającej w kontekście białka P1 na tytoniu i przeprowadzenie lokalizacji z zastosowaniem mikroskopii elektronowej i fluorescencyjnej. Ponadto, analiza wyników lokalizacji i pochodzących z TMHMM oraz ΔG Prediction Server i opis części wyników publikacji oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów.**

Kozieł E*., Bujarski J.J., **Otulak K***. (**2017**) Molecular biology of *Prune dwarf virus*—a lesser known member of the *Bromoviridae* but a vital component in the dynamic virus–host cell interaction network. *International Journal of Molecular Sciences, 18(12)*: 2733,

doi:10.3390/ijms18122733, **Pkty MNiSW 30 *Pkty MNiSW obecnie: 140, IF w roku publikacji =3,687, IF5 letni=4,331.**

Publikacja miała charakter pracy przeglądowej napisanej na specjalne zaproszenie, które otrzymałam od Prof. dr. Marcello Iriti-ego do specjalnego numeru: '*Plant Innate Immunity 2.0'* opublikowanego w *International Journal of Molecular Sciences*, której celem było przedstawienie kolejnych etapów cyklu infekcyjnego PDV, w kontekście aktualnej wiedzy na temat rodziny *Bromoviridae,* z uwzględnieniem doniesień opublikowanych w naszych pracach w roku 2015 (*Acta biologica Cracoviensia. Series Botanica*) oraz w 2017 (*European Journal of Plant Pathology*). Praca została rozszerzona o propozycję modelu transportu PDV oraz trójwymiarowy model kotwiczenia i składania całego kompleksu replikacyjnego PDV w błonie tonoplastu. Model 3D został wykonany dzięki analizom wyników i konsultacjom z Profesorem J.J. Bujarskim w Department of Biological Sciences w Northern Illinois University w USA. **Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na: opisaniu mechanizmów transportu obecnych w rodzinie *Bromoviridae* oraz stworzenie wraz z Profesorem Bujarskim modelu 3D. Dodatkowo byłam w tym artykule także drugim autorem korespondencyjnym i odpowiadałam za odniesienie się do uwag recenzentów.**

Kozieł E., **Otulak-Kozieł K*,** Bujarski J.J. (**2018**) Ultrastructural analysis of Prune dwarf virus intercellular transport and pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, *19(9)*: 2733, doi:10.3390/ijms18122733, **Pkty MNiSW 30, *Pkty MNiSW obecnie: 140, IF w roku publikacji =4,183, IF5 letni=4,331.**

Publikacja powstała na zaproszenie, które otrzymałam od Prof. dr. Miguela A. Arandy do specjalnego numeru: '*Plant Viruses and Virus-Induced Diseases'* opublikowanego w *International Journal of Molecular Sciences*. Celem badań była analiza zmian ultrastrukturalnych generowanych przez PDV w roślinach testowych ogórka oraz zweryfikowanie modelu transportu międzykomórkowego zaproponowanego w roku 2017 (*w publikacji „Molecular biology of Prune dwarf virus—a lesser known member of the Bromoviridae but a vital component in the dynamic virus–host cell interaction Network")*. Celem opisania zmian i mechanizmu translokacji wirusa wykorzystano możliwości mikroskopii elektronowej, fluorescencyjnej, znakowań immunozłotowych oraz analiz porównawczych struktur 3D MP należącego do PDV oraz AMV. Wyniki analiz ultrastrukturalnych pokazały generowanie zmian w obrębie organelli takich jak chloroplasty, mitochondria oraz indukowanie struktur wielopęcherzykowych i sferul (miejsc replikacji) w obrębie wakuoli, ale przede wszystkim generowanie struktur tubularnych wypełnionych cząstkami PDV, przechodzących przez plazmodesmy o rozszerzonym SEL (ang. *size exclusion limit*). Ta ostatnia obserwacja potwierdzała, że PDV jest transportowany w formie cząstek przez plazmodesmy podobnie jak AMV. Porównanie struktury 3D MP PDV i AMV także wykazały duże podobieństwo między sobą, zwłaszcza w strukturze domeny funkcjonalnej wiążącej RNA (*ang. RNA binding domain*, RBD). Ostatnim elementem potwierdzającym przebieg transportu była podwójna lokalizacja dwóch białek zaangażowanych w transport PDV czyli CP-

budującego cząstki wirusowe oraz MP- odpowiadającego za indukcję powstawania struktur tubularnych. Wyniki lokalizacji zweryfikowano i potwierdzono za pomocą kwantyfikacji podwójnej lokalizacji metodą koincydencji. Praca powstała we współpracy z Profesorem Józefem Julianem Bujarskim z *Department of Biological Sciences* w Northern Illinois University w USA.
Moja rola w publikacji polegała na: wyborze najbardziej antygenicznego fragmentu (poprzez analizy bioinformatyczne) MP do wytworzenia przeciwciał skierowanych na to białko, opracowaniu metodyki podwójnej lokalizacji CP oraz MP oraz analiza wyników kwantyfikacji .Współpraca z Profesorem Bujarskim nad analizą porównawczą modelu 3D MP PDV oraz AMV. Odpowiadałam także za opis części wynikowej dotyczącej metod immunolokalizacji. Byłam osobą, która otrzymała zaproszenie przygotowania powyższego manuskryptu i byłam w tym artykule autorem korespondencyjnym.

Kozieł E*., **Otulak-Kozieł K*,** Bujarski J.J. **(2020)** Modifications in tissue and cell ultrastructure as elements of immunity-like reaction in *Chenopodium quinoa* against *Prune dwarf virus* (PDV). *Cells, 19(9)*: 2733, doi:10.3390/ijms18122733, ***Pkty MNiSW obecnie 140, $IF_{w\ roku\ publikacji}$=5,656.**

Dotychczas nie ma doniesień literaturowych opisujących rośliny wykazujące odporność na PDV. Dlatego celem publikacji było sprawdzenie reakcji rośliny komosy ryżowej, uważanej w literaturze jako nieadekwatnej do namnażania dla PDV, ale idealnej do namnażania właściwie wszystkich przedstawicieli rodziny *Bromoviridae*. Analizy mikroskopowe i molekularne wykazały, że komosa ryżowa charakteryzują się reakcją podobną do odporności na wirusa. Rośliny po inokulacji PDV generowały liczne nekrozy, które miały na celu ograniczenie transportu międzykomórkowego w liściach by zablokować transport systemiczny rośliny odkładały w sposób gwałtowny związki fenolowe w obrębie naczyń ksylemu (transport w tej tkance został potwierdzony w naszych publikacjach w 2017 i 2018 roku) oraz liczne nekrozy komórek towarzyszących we floemie. Zmiany w tkankach przewodzących zwizualizowano metodą 3D w mikroskopie elektronowym. Taka dość szybka reakcja rośliny powodowała zatrzymanie wirusa w liściach inokulowanych, które były eliminowane z rośliny. Dodatkowo metodami biologii molekularnej (ekspresja genu MP PDV) oraz DAS-ELISA potwierdzono spadek ilości wirusa w liściach zainfekowanych w czasie trwania porażenia oraz brak efektu przedostania się wirusa z liści zainfekowanych do organów ponad punktem inokulacji. Obniżenie intensywności replikacji oceniono także z pomocą analizy statystycznej CTFC (*ang. corrected total cell fluorescence*) dla immunoflurescencyjnej lokalizacji białka P1. Co więcej, reakcji towarzyszyło gwałtowne generowanie H_2O_2, co uzasadniało pojawienie się zmian nekrotycznych. Wzrost poziomu oceniono metodą CTED (*ang. corrected total electron density*) na podstawie gęstości precypitatów chlorku ceru oraz metodą wg *Velikowe-j* (Velikowa i wsp., 2000). Praca powstała we współpracy z Profesorem J.J. Bujarskim (Department of Biological Sciences w Northern Illinois University w USA) ze szczególnym uwzględnieniem analizy ekspresji genu MP PDV i współdziałaniem w zakresie interpretacji i dyskusji wyników.
Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na: przeprowadzeniu analizy wyników ekspresji genu MP PDV, która była wykonywana w Department of Biological

Sciences w Northern Illinois University w USA we współpracy z Prof. J.J. Bujarskim. Stworzenie 3D wizualizacji zmian zachodzących w tkankach przewodzących - które znalazły się finalnie w tzw. *„graphical abstract"* niniejszej pracy. Przeprowadzenie i analiza lokalizacji H_2O_2 *in situ* z wykorzystaniem metody z zastosowaniem chlorku ceru.

c) Badania dotyczące biologii interakcji roślin z wirusem Y ziemniaka (nieujęte w osiągnięciu habilitacyjnym)

Felczak P., Garbaczewska G., **Otulak K.,** (**2010**) Necrosis in *Solanum tuberosum* stems infected with Potato virus Y by grafting method., *Acta Biologica Cracoviensa series Botanica* 52(1):61-66. **Pkty MNiSW 13, *Pkty MNiSW obecnie: 40, IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =0,586 IF$_{5\ \text{letni}}$=1,00**

W powyższym artykule pełniłam rolę autora korespondencyjnego, a mój udział polegał na analizie wyników i redakcji manuskryptu. Celem powyższych badań było testowanie reakcji roślin – wykazujących odporność odmiana *Ania*, posiadających zidentyfikowany gen *Rysto* oraz podatnych odmiana *Glada*- w efekcie infekcji poprzez szczepienie wirusem PVY $^{N\text{-}Wi}$. Rozwój nekrotyzacji w tkankach, zwłaszcza przewodzących, był efektem wprowadzenia wirusa poprzez szczepienie do obu odmian ziemniaka. Jednakże w przypadku odmiany odpornej celem nekrotyzacji było blokowanie rozwoju procesu infekcyjnego w odmianie wykazującej gen *Rysto*, co było manifestowane poprzez brak cząstek wirusa oraz inkluzji cytoplazmatycznych. W odmianie podatnej zaś nekrotyzacji była jedynie efektem systemicznej infekcji i aktywnego transportu wirusa obecnego we wszystkich tkankach.

Grupa A*., **Otulak-Kozieł K**., Syller J. (**2018**) Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of *Potato virus Y* (PVY). *Plant Pathology, 67(9)*:1997-2012, doi: 10.1111/ppa.12892, **Pkty MNiSW 35, *Pkty MNiSW obecnie: 140 , IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =2,493, IF$_{5\ \text{letni}}$=2,563.**

Punktem wyjścia do analiz był brak w literaturze światowej doniesień na temat oceny molekularnej i ultrastrukturalnej wzajemnej interakcji różnych szczepów wirusa Y ziemniaka (*ang. Potato virus Y,* PVY) zróżnicowanych genetycznie ale i serotypowo podczas infekcji mieszanych. Celem niniejszej publikacji było więc zbadanie/określenie charakteru oddziaływań pomiędzy szczepami PVY (PVY^{O}, PVYN$^{N\text{-}Wi}$/PVY$^{N:O}$ oraz PVY^{NTN}) na dwóch podatnych gospodarzach roślinnych (ziemniak i tytoń). Analizy molekularne wraz z wykorzystaniem testów DAS-ELISA wskazały na wyraźną redukcję poziomu wirusa szczepów PVY$^{N:O}$ lub PVY$^{N\text{-}Wi}$ w roślinach ziemniaka i tytoniu infekowanych wcześniej lub równocześnie z tymi izolatami szczepem PVY^{NTN}. Uzyskane wyniki wyraźnie pokazały, że obecność PVY^{NTN} (szczep powodujący największe spustoszenie w roślinach zainfekowanych) działa antagonistycznie (interferencyjne) na inne łagodniejsze izolaty wirusa. Co więcej, analizy mikroskopowe przeprowadzone w oparciu o lokalizację immunofluorescencyjną białek wirusowych wskazały, że różne izolaty PVY wykazują tendencje to tak zwanej „separacji tkankowej" (lokalizowania się w innych/różnych typach tkanek) podczas infekcji mieszanych. Publikacja była efektem projektu pt." Interakcje między izolatami wirusa Y ziemniaka (Potato virus Y, PVY) w infekcjach mieszanych i ich wpływ na rozmieszczenie przestrzenne i dynamikę subpopulacji wirusa w tkankach roślin gospodarzy" **OPUS 5: UMO-**

2013/09/B/NZ9/02421 (przyznanego przez NCN) dla IHAR-PIB, oddział w Młochowie (kierownik: Prof. dr hab. Jerzy Syller), w którym **byłam głównym wykonawcą wszystkich analiz mikroskopowych**. **Moja rola w tej publikacji polegała na opracowaniu metodyki podwójnej lokalizacji immunofluorescencyjnej różnych szczepów wirusa PVY, przeprowadzeniu analiz ultrastrukturalnych i zmian lokalizacji białek wirusa, a także pełne opracowanie wyników i metodyki analiz mikroskopowych w powyższej publikacji.**

Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska A., Przewodowski W. **Otulak K**. (**2015**) Ion-exchange membrane chromatography as an alternative method of separation of Potato virus Y. *Plant Breeding and Seed Science*, *72*:55-67, doi: 10.1515/plass-2015-0031, **Pkty MNiSW 11pkt (lista B wg wykazu ujednoliconego 2013-2016), *Pkty MNiSW 20.**

Publikacja miała charakter metodyczny powstała we współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR-PIB) oddział w Boninie. Jej celem było opracowanie zasad postępowania i sprawdzenie możliwości wykorzystania chromatografii jonowo-wymiennej jako nowej, niestosowanej dotąd metody, którą można wykorzystać w separacji cząstek PVY z soku rośliny zainfekowanej dla przyszłej produkcji lepszej jakości przeciwciał diagnostycznych skierowanych na tego wirusa (uzyskanie jak najczystszego źródła antygenu). W ramach tej publikacji opracowano szczegółową metodykę oczyszczania PVY oraz kontroli stopnia oczyszczania z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Badania były realizowane **w ramach projektu NCN NN310728540** otrzymanego przez dr A. Przewodowską. **Moja rola w tej publikacji polegała na opracowaniu metodyki w IHAR, oddział w Boninie pozyskiwania cząstek wirusa z filtrowanych roztworów pochodzących z analizy chromatograficznej oraz ich wizualizacja w TEM.**

d) biologia interakcji roślin z wirusem mozaiki pepino *(ang. Pepino mosaic virus,* PepMV)

Minicka J., **Otulak K**., Garbaczewska G., Pospieszny H., Hasiów-Jaroszewska B (**2015**) Ultrastructural insights into tomato infections caused by three different pathotypes of *Pepino mosaic virus* and immunolocalization of viral coat proteins. *Micron*, *79*: 84-92, doi: 10.1016/j.micron.2015.08.006, **Pkty MNiSW 30**, ***Pkty MNiSW obecnie: 100, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=1,838, IF**$_{\text{5 letni}}$**=1,809**.

Celem publikacji było dokonanie po raz pierwszy analizy ultrastrukturalnej roślin pomidora zainfekowanych różnymi patotypami wirusa mozaiki pepino *(ang. Pepino mosaic virus,* PepMV): Chilean 2 (CH2), łagodnym (PepMV-P22), nekrotycznym (PepMV-P19) oraz powodującym żółknięcie liści (PepMV-P5-IY) w powiązaniu z immunolokalizacją białka płaszcza tego wirusa (*ang. coat protein*, CP). Analizy w mikroskopie elektronowym pozwoliły na dokładnie porównanie zmian w komórkach gospodarza charakterystycznych dla poszczególnych izolatów oraz stworzenie bazy informacji o patogenezie tego wirusa. Uzyskane wyniki pokazały, że patotyp PepMV-P19 powodował najbardziej zawansowane zmiany ultrastruturalne. Dystrybucja CP wskazała, że epitop tego białka najbardziej lokalizował się w obrębie tkanek przewodzących, co zwróciło uwagę na potencjalny mechanizm transportu systemicznego. Publikacja powstała w ścisłej współpracy z Instytutem Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy (IOR-PIB) w Poznaniu oraz w ramach projektu 2011/01/D/NZ9/00279 Sonata1, NCN, pt" Molekularna ewolucja wirusa mozaiki pepino

(Pepino mosaic virus) i jej wpływ na wirulencję wirusa" przyznanego dr hab. Beacie Hasiów-Jaroszewskiej. Przy okazji prac nad wirusem PepMV sprawowałam opiekę nad doktorantką mgr Julią Minicką (dziś już Panią Doktor), która w katedrze Botaniki SGGW pod moim nadzorem uczyła się preparatyki przygotowania tkanek roślinnych do transmisyjnego mikroskopu elektronowego ze szczególnym uwzględnieniem techniki krojenia makro i ultra-cienkich skrawków. **Moja rola w tej publikacji polegała na opracowaniu metodyki lokalizacji białka kapsydu - CP tego wirusa, przeprowadzeniu analizy mikroskopowej zmian ultrastrukturalnych wraz z mgr Julią Minicką oraz opisania wyników i redagowania odpowiedzi na uwagi recenzentów.**

Badania będą kontynuowane w temacie wzajemnej interakcji różnych szczepów/patotypów PepMV w aktualnie złożonym projekcie, którego będę wykonawcą, jeżeli otrzyma rekomendację NCN do finansowania.

e) badania dotyczące biologii kiełkowania nasion i wzrostu siewek jabłoni i pomidora

Krasuska U., Dębska K., **Otulak K**., Bogatek R., Gniazdowska A. (**2015**) Switch from heterotrophy to autotrophy of apple cotyledons depends on NO signal. *Planta* , *242*:1221-1236, doi: 10.1007/s00425-015-2361-x, **Pkty MNiSW 40**, ***Pkty MNiSW obecnie: 100, IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=3,239, IF**$_{\text{5 letni}}$**=3,408**.

Celem publikacji było poznanie roli tlenku azotu (NO) w zmianach zachodzących w liścieniach siewek jabłoni z wykorzystaniem możliwości analiz fizjologicznych i mikroskopii elektronowej. Przeprowadzone analizy wykazały, że tlenek azotu (nie zależnie od użytego donoru) przyspiesza i umożliwia zmianę stanu skiełkowanych zarodków jabłoni z stanu heterotrofii do autotrofii przez stymulację dojrzewania chloroplastów, a obserwowanej reakcji towarzyszy wzrost zawartości małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1-5-bisfosforanu (*ang. ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, RuBisCO) i wzrost parametrów fluorescencji chlorofilu a. **Moja rola w tej publikacji polegała na przygotowaniu materiału i przeprowadzeniu analizy mikroskopowej zmian w obrębie plastydów i opracowanie wyników tej analizy.** Publikacja powstała we współpracy z Katedrą Fizjologii Roślin, obecnie Instytutu Biologii, SGGW w Warszawie w zespole Profesor dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej.

Ciąćka K*., Krasuska U., **Otulak-Kozieł K**., Gniazdowska A. (**2019**) Dormancy removal by cold stratification increases glutathione and S-nitrosoglutathione content in apple seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138:112-120, doi: 10.1016/j.plaphy.2019.02.026, ***Pkty MNiSW 70 pkt**, **IF** $_{\text{w roku publikacji}}$ **=3,404, IF**$_{\text{5 letni}}$**=3,607**.

Celem powyższych badań oraz publikacji była weryfikacja różnic w poziomie s-nitrozoglutationu (ang. *s-nitrosoglutathione*, GSNO) oraz aktywności reduktazy s-nitrozoglutationu (ang. *s-nitrosoglutathione reductase*, GSNOR – E.C. 1.2.1.46) w osiach zarodkowych jabłoni po zainicjowaniu procesu kiełkowania (24h imbibicją) w zarodkach kontrolnych i poddanych 90-dniowej chłodnej stratyfikacji. Analizy molekularne, fizjologiczne i mikroskopowe pozwoliły ustalić, że zjawisku przełamywania spoczynku nasion jabłoni towarzyszy zwiększenie zarówno zawartości jak i indukcji tkankowej lokalizacji GSNO oraz spadek aktywności GSNOR. Badania oraz publikacja powstały w ramach projektu Preludium 5 pt „Metabolizm nitrozotioli podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni (Malus domestica Borkh.)" otrzymanego przez dr Katarzynę Ciąćkę, 2013/09/N/NZ9/01619.

Moja rola w tej publikacji polegała na przygotowaniu metodyki lokalizacji immunofluorescencyjnej s-nitrozoglutationu w osiach zarodkowych jabłoni, przeprowadzeniu analizy mikroskopowej, a także przeprowadzenie analizy kwantyfikacyjnej sygnału fluorescencyjnego metodą CTCF wraz z analizą tej części wyników. Publikacja powstała we współpracy z Katedrą Fizjologii Roślin, obecnie Instytutu Biologii, SGGW w Warszawie w zespole Profesor dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej.

Staszek P*., Krasuska U., **Otulak-Kozieł K**., Fettke J., Gniazdowska A. (**2019**) Canavanine-induced decrease in nitric oxide synthesis alters activity of antioxidant system but does not impact s-nitrosoglutathione catabolism in tomato roots. *Frontiers in Plant Science*, *10*:1077, doi: 10.3389/fpls.2019.01077, ***Pkty MNiSW 100**, **IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =4,298, IF$_{\text{5 letni}}$=4,855**.

Celem badań oraz publikacji było zbadanie wpływu tlenku azotu generowanego w wyniku podawania niebiałkowego aminokwasu kanawaniny (*ang. canavanine*, CAN), na komórkowy system antyoksydacyjny i metabolizm GSNO w korzeniach siewek pomidora. Analizy na poziomie molekularnym, fizjologicznym i mikroskopowym wskazały, iż traktowanie korzeni CAN powoduje znaczne zahamowanie ich wzrostu. Redukcji wzrostu towarzyszyło ograniczenie aktywności arginino-zależnej aktywności „NOS-like" oraz aktywności katalazy (*ang.* catalase, CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (*ang. superoxide dismutase*, SOD). Co więcej, zahamowanie aktywności "NOS-like" przez CAN doprowadziło do mniejszej akumulacji GSNO w wierzchołkach korzenia pomidora, co udało się wykazać dzięki immunofluorescencyjnej lokalizacji i kwantyfikacji GSNO. Publikacja powstała we współpracy z Katedrą Fizjologii Roślin, Instytutu Biologii, SGGW w Warszawie w ramach projektu Opus 7: 2014/13/B/NZ9/02074 (NCN) przyznanego Profesor dr hab. Agnieszce Gniazdowskiej. **Mój wkład w powstanie powyższej publikacji polegał na: przygotowaniu metodyki lokalizacji immunofluorescencyjnej s-nitrozoglutationu w korzeniach pomidora, przeprowadzeniu analizy mikroskopowej, a także przeprowadzenie analizy kwantyfikacyjnej sygnału fluorescencyjnego metodą CTCF, oraz opracowanie wyników tej analizy do publikacji.**

f) badania mikrobiologiczne

Bojarska A., Janas K., Pejsak Z., **Otulak-Kozieł K**., Garbaczewska G., Hrynkiewicz W., Sadowy E*. **(2020)** Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus. *Veterinary Microbiology*, *240*: 108534, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108534, ***Pkty MNiSW 100**, **IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =2,791, IF$_{\text{5 letni}}$=2,834**.

Polska jest jednym z czołowych producentów trzody chlewnej, ponadto w Unii Europejskiej konieczna jest kontrolna sanitarna zwierząt. Od roku 2016 obserwuje się wzrost zachowani świń i ich dzikich odpowiedników na choroby powodowane przez bakterię *Streptococcus suis* (*S.suis*). Co gorsza *S.suis* łatwo infekuje też ludzi powodując liczne infekcje oskrzeli, płuc a nawet zapalenie opon mózgowych. Dlatego też celem publikacji stało się przedstawienie szczegółowej i precyzyjnej charakterystyki serotypów, czynników wirulencji tych bakterii oraz zależności genetycznej szczepów powszechnie występujących i nowo-wykrytych na terenie Polski i Białorusi. Analizy molekularne/sekwencyjne 16S rRNA serotypów *S.*suis wraz z porównywaniem morfologii i grubości otoczek przy użyciu mikroskopu elektronowego pozwoliło na scharakteryzowanie szczepów o największej

wirulentności (odporności na antybiotyki). Uzyskane wyniki wskazały, że szczep CC1/serotyp 2 występuje najczęściej na terytorium obu krajów, a ponadto, że jest odpowiedzialny za najbardziej inwazyjne infekcje u ludzi. Badania i publikacja były realizowane we współpracy z Narodowym Instytutem Leków w Warszawie (Zakład Mikrobiologii Molekularnej oraz Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej) oraz z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym w Puławach (Zakład Chorób Świń). **Moja rola w tej publikacji polegała na przygotowaniu bezpiecznej dla zdrowia metodyki zatapiania bakterii *Streptococcus suis, a także* na analizie mikroskopowej pozyskiwanych prób, dokonaniu pomiarów otoczek bakteryjnych. Całości dopełniała analiza statystyczna wyników pomiarów.** Badania będą kontynuowane i będą dotyczyły charakteryzowania innych dotąd niezbadanych grup i/lub serotypów *Streptococcus suis*.

g) badania nad efektami obecności endornawirusów w tkankach roślin- gospodarzy

Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Escalante C., Valverde R. **(2020)** Ultrastructural analysis of cells from bell pepper (*Capsicum annuum*) infected with bell pepper endornavirus. Front. Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2020.00491. ***Pkty MNiSW 100**, **IF $_{\text{w roku publikacji}}$ =4,298, IF$_{\text{5 letni}}$=4,855**.

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie czy występowanie endornavirusa BPEV (*Bell pepper endornavirus),* potwierdzone metodami molekularnymi, generuje w tkankach dwóch wyprowadzonych izogenicznych linii papryki odmiany Marengo zmiany na poziomie ultrastrukturalnym. Zarówno linia wolna od BPEV jak i zainfekowana BPEV nie wykazują objawów obecności wirusa, pomimo wykrywania jego obecności testami RT-PCR. Porównawcze analizy ultrastrukturalne wykazały zaangażowanie mitochondriów oraz chloroplastów w proces infekcyjny BPEV. Obserwowano także indukcję struktur pęcherzykowych w liniach z obecnością endornawirusa. Powyższe obserwacje nad liniami papryki odmiany Marengo wykazały podobieństwo do zmian indukowanych przez wirusy i wiroidy roślinne, co pozwala przypuszczać, iż w przypadku endornawirusów nie mamy do czynienia z interakcją typu mutualizm. Badania były realizowane we współpracy z Uniwersytetem Stanowym w Louisianie (Department of Plant Pathology and Crop Plant Physiology, Baton Rouge, LSU USA) z Profesorem Rodrigo A. Valverde. **Moja rola w tej publikacji polegała na przeprowadzeniu analiz w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym, analizie wyników, współpracy w przygotowaniu manuskryptu. Byłam w tym artykule pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.**

Moja działalność naukowa została dostrzeżona przez władze uczelni – trzykrotnie otrzymałam nagrodę zespołową II stopnia JM Rektora SGGW za działalność naukową, w październiku 2012, 2016 oraz 2018 roku.

<u>Współpraca z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi:</u>

Od 2015 roku prowadzę aktywną współpracę z Profesorem Józefem J. Bujarskim z Uniwersytetu w Illinois (Departament of Biological Science, Dakalb, USA) dotyczącą interakcji roślina-wirus. Współpraca koncentruje się na analizach molekularnych, a także bioinformatycznych oraz niejednokrotnie konsultacji analizy wyników. W efekcie tego współdziałania byłam opiekunem wizyty naukowej Profesora w lipcu 2015 roku w SGGW w Warszawie, gdzie min. wygłosił seminarium dotyczące „Transcription, replication and

recombination in *Brome mosaic virus* as a model system". Ponadto, w efekcie współpracy w 2016 roku Profesor J.J. Bujarski był także recenzentem rozprawy doktorskiej dotyczącej patogenezy wirusa PDV, której byłam promotorem pomocniczym. W efekcie tej owocnej współpracy powstało dotychczas 6 wspólnych publikacji

Od 2017 roku prowadzę także aktywną współpracę z Profesorem Benhamem E.L. Lockhartem z Uniwersytetu w Minnesocie (Department of Plant Pathology). Współpraca dotyczy szczególnie oceny diagnostycznej roślin infekowanych wirusami w kontekście metod serologicznych, przenoszenia wirusów przez nasiona i w jej efekcie powstały 4 wspólne prace. Szczególnie miło jest wspomnieć, że także dzięki naszym wspólnym publikacjom Profesor otrzymał rekomendację na realizację projektu firmy *Pepsico Inc.* dotyczący kontroli wirusów ziemniaka, nazwany: '*Potato Virus Screening'*.

We współpracy z Profesorem Rodrigo A. Valverde z Uniwersytetu Stanowego w Louisianie (Department of Plant Pathology and Crop Plant Physiology, Baton Rouge, LSU USA) od 2018 roku prowadzę badania nad grupą przedstawicieli rodzaju *Endornavirus* – nowo- i mało-poznanej grupy wirusów roślinnych. Prace koncentrują się na analizach ultrastrukturalnych i molekularnych, charakteryzujących ich zachowania w obrębie komórek roślinnych, a także próba odpowiedzi na pytanie, czy są one patogenami roślin, czy też organizmami inicjującymi mutualizm. Nasze współdziałanie rozwijamy także w kontekście infekcja wirusowa jako czynnik stresowy a generowanie reaktywnych form tlenu, co stało się tematem naszej pierwszej wspólnej publikacji w 2018 roku. W ramach badań wraz z grupą badawczą z LSU USA podejmujemy próbę odpowiedzi na pytanie o pochodzenie ewolucyjne endornawirus jako nowych „patogenów" roślin. W ramach współpracy w maju 2019 roku byłam opiekunem profesora podczas wizyty naukowej w katedrze Botaniki SGGW w Warszawie, podczas której zorganizowałam spotkania seminaryjno-wykładowe zarówno z pracownikami jak i studentami kierunku Biologia Wydziału Rolnictwa i Biologii. Efekty prac badawczych w postaci wstępnych wyników, koncentrujących się na endornawirusach (np. BPEV, ang *Bell pepper endornavirus*) na wyprowadzonych liniach izogenicznych papryki (*odmiany Marengo*) stały się tematem drugiej, wspólnej publikacji we *Frontiers in Plant Science*. We wspomnianym manuskrypcie jestem pierwszym i zarazem autorem korespondencyjnym. W ramach programu Erasmus+ pod koniec 2020 roku planowane jest podobne spotkanie badawcze. Badania będą kontynuowane min. w kontekście przenoszenia endornawirusów przez nasiona oraz możliwości translokacji na drodze infekcji grzybowych.

Od początku studiów doktoranckich prowadzę współdziałanie z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- PIB, Oddziałem w Młochowie z Zakładem Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, Pracownią Fitopatologii. Początkowo współpracowałam z Panią Profesor Mirosławą Chrzanowską, a działania dotyczyły analiz przenoszenia wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu - TRV przez nicienie oraz transportu tego wirusa w roślinie, a także testów diagnostycznych roślin na obecność TRV oraz wirusa PVY, czy też wspólny dobór roślinnego materiału wyjściowego do badań. W efekcie tego współdziałania powstały dwie wspólne publikacje.

Następnie współpracowałam z Panem Profesorem Jerzym Syllerem i Panią Doktor Anną Grupą-Urbańską (IHAR-PIB, Oddział Młochów) prowadząc badania wstępne dotyczące analizy konkurencji szczepów wirusa Y ziemniaka w infekcjach mieszanych. Wnioski z badań wstępnych zaowocowały złożeniem wspólnego projektu Opus w NCN, który otrzymał rekomendację do finansowania. Projekt pt. „Interakcje między izolatami wirusa Y ziemniaka (Potato virus Y, PVY) w infekcjach mieszanych i ich wpływ na rozmieszczenie przestrzenne i dynamikę subpopulacji wirusa w tkankach roślin gospodarzy" **UMO-2013/09/B/NZ9/02421** w ramach konkursu **OPUS 5** był realizowany w latach 2014-2017. W projekcie **byłam głównym**

wykonawcą odpowiadającym za wszystkie analizy mikroskopowe z zastosowaniem metod lokalizacji fluorescencyjnych i ultrastrukturalnych w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. W efekcie realizacji projektu powstała wspólna publikacja: Grupa A*., **Otulak-Kozieł K**., Syller J. (2018) Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of *Potato virus Y* (PVY). *Plant Pathology* (**2018**), *67(9)*:1997-2012, doi: 10.1111/ppa.12892,

Od 2014 roku prowadzę współpracę także z IHAR-PIB, Oddziałem w Boninie, z Pracownią Diagnostyki Molekularnej i Biochemii oraz Pracownią Zasobów Genowych i Kultur *in vitro,* z Panią Doktor Agnieszką Przewodowską oraz Doktorem habilitowanym Włodzimierzem Przewodowskim. Jednym z etapów wspólnych prac było sprawdzenie możliwości stosowania chromatografii jonowymiennej jako metody, którą można wykorzystać w izolacji cząstek PVY z soku rośliny zainfekowanej, celem produkcji doskonalszych diagnostycznie przeciwciał skierowanych na tego wirusa (tj. uzyskanie jak najczystszego źródła antygenu). Opracowano szczegółową metodykę oczyszczania PVY oraz kontroli stopnia oczyszczania z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. W efekcie czego powstała wspólna publikacja:
Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska A., Przewodowski W., **Otulak K**. (2015). Ion-exchange membrane chromatography as an alternative method of separation of potato Y virus. Plant Breeding and Seed Science 72: 56-67.
Obecnie współpracuję także z Panem dr hab. Krzysztofem Trederem (IHAR-PIB, Oddz. Bonin) nad zróżnicowanym poziomem ekspresji szczepów wirusa Y ziemniaka w warunkach różnych typów interakcji zgodnej i niezgodnej.
Wspólnie z dr hab. W. Przewodowskim współdziałam w kwestii pozyskiwania i testowania certyfikowanego materiału roślinnego do dalszych badań na interakcjami z PVY. Współuczestniczę także w badaniach nad wpływem nanocząstek metali (srebra, złota, platyny i miedzi) na porażenie *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* roślin z kultur *in vitro,* a konkretnie wpływu nanocząstek na blokowanie wnikania infekcji bakteryjnych. Publikacje są w przygotowaniu.
W efekcie współpracy z IHAR-PIB w 2019 r. zostałam zaproszona do wygłoszenia referatów na konferencji Dni Młodego Naukowca w listopadzie 2019. W efekcie czego wygłoszone zostały dwie prezentacje:
•**Otulak-Kozieł K.,** Kozieł E., (**2019**) Dynamika zmian apoplastu w efekcie interakcji zgodnej i niezgodnej PVY NTN- *Solanum tuberosum* Dni Młodego Naukowca, 7-8 listopada, IHAR-Radzików;
•Kozieł E., **Otulak-Kozieł K**., (**2019**) Analiza ultrastrukturalna transportu międzykomórkowego i patogenezy wirusa karłowatości śliwy *Prunus dwarf virus (PDV).* Dni Młodego Naukowca, 7-8 listopada, IHAR-Radzików.

Od 2010 roku współpracuję z Instytutem Ochrony Roślin-PIB w Poznaniu, z Zakładem Wirusologii i Bakteriologii. Współpraca dotyczy patogenezy wirusa mozaiki pepino. W ramach tej współpracy byłam zapraszana do wzięcia udziału w spotkaniach Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego i Grupy Roboczej Wirusów Roślin Komitetu Ochrony Roślin PAN, gdzie wygłaszałam referaty w 2010 oraz w 2019roku:

Otulak. K., Garbaczewska G. (**2010)**. Ultrastruktura organelli komórkowych podczas stresu wywołanego infekcją PVY. Referat. 9-10 wrzesień 2010 IOR-PIB Poznań, XV Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego i XXXVII Konferencja Grupy Roboczej Wirusów Roślin Komitetu Ochrony Roślin PAN, Materiały konferencyjne str. 40-41.

Otulak-Kozieł K., Kozieł E., (**2019**) Dynamika zmian apoplastu w efekcie interakcji zgodnej i niezgodnej PVY ^{NTN}- *Solanum tuberosum*.. XVIII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, 4 wrzesień Poznań;

Kozieł E., **Otulak-Kozieł K**., (**2019**) Analiza ultrastrukturalna transportu międzykomórkowego i patogenezy wirusa karłowatości śliwy *Prunus dwarf virus (PDV).* XVIII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, 4 wrzesień Poznań;

W ramach tego współdziałania sprawowałam opiekę naukową nad doktorantką mgr Julią Minicką, która odbyła pod moim kierunkiem szkolenie stażowe dotyczące preparatyki do transmisyjnego mikroskopu elektronowego w katedrze Botaniki SGGW. W efekcie współpracy powstała wspólna publikacja: Minicka J., **Otulak K**., Garbaczewska G., Pośpieszny H., Hasiów-Jaroszewska B*. Ultrastructural insights into tomato infections caused by three different pathotypes of *Pepino mosaic virus* and immunolocalization of viral coat proteins. *Micron* (**2015**), *79*: 84-92, doi: 10.1016/j.micron.2015.08.006. Obecnie badania z dr Julią Minicką będą kontynuowane w kwestiach konkurencji szczepów PMV (*Pepino mosaic virus*) w infekcjach mieszanych, zwłaszcza jeżeli projekt złożony do NCN otrzyma rekomendację do finansowania.

W 2019 roku rozpoczęłam współpracę z Panią Profesor Ewą Sadowy z Pracowni Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. Badania dotyczą charakterystyki serotypów, czynników wirulencji bakterii *Streptococcus suis* oraz zależności genetycznej szczepów powszechnie występujących i nowo wykrytych na terenie Polski i Białorusi. Prowadzone są analizy molekularne/sekwencyjne 16S rRNA serotypów *S.*suis wraz z porównywaniem wyglądu i grubości otoczek przy użyciu mikroskopu elektronowego. Wspomniane działania pozwoliły na scharakteryzowanie szczepów o największej wirulentności, a pierwsze efekty zaowocowały wspólną publikacją: Bojarska A., Janas K., Pejsak Z., **Otulak-Kozieł K**., Garbaczewska G., Hrynkiewicz W., Sadowy E*. Diversity of serotypes and new cps loci variants among *Streptococcus suis* isolates from pigs in Poland and Belarus. *Veterinary Microbiology* (**2020**), *240*: 108534, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108534. Badania będą kontynuowane w zakresie szerszej, niescharakteryzowanej jak dotąd w pełni grupie szczepów.

Lista publikacji, które powstały w wyniku współpracy z ośrodkami naukowymi w kraju oraz za granicą:

- **Współpraca z ośrodkami w kraju:**

Strzelecka-Kiliszek A., Buszewska M.E., Podszywałow-Bartnicka P., Pikuła S., **Otulak K.,** Buchet R., Bandorowicz-Pikuła J., (**2008**) Calcium- and pH-dependent localization of annexin A6 isoforms in Balb/3T3 fibroblasts reflecting their potential participation in vesicular transport., J Cell Biochem., 104(2):418-34**. (przed uzyskaniem stopnia doktora)**

Otulak K., Chouda M., Chrzanowska M., Garbaczewska G., (**2012**) Ultrastructural effects of infection caused by Tobacco rattle virus transmitted by Trichodorus primitivus presents in potato and tobacco tissues, Canadian Journal of Plant Pathology, 34 (1): 126-138.

Garbaczewska G., **Otulak K.,** Chouda M., Chrzanowska M. (**2012**) Ultrastructural studies of plasmodesmatal and vascular translocation of Tobacco rattle virus (TRV) in tobacco and potato, Acta Physiologia Plantarum, 34(3): 1229-1238, DOI: 10.1007/s11738-012-0960-8.

Minicka J., **Otulak K.,** Garbaczewska G., Pośpieszny H., Hasiów-Jaroszewska B*. (**2015**) Ultrastructural insights into tomato infections caused by three different pathotypes of Pepino mosaic virus and immunolocalization of viral coat proteins. Micron, 79: 84-92, doi: 10.1016/j.micron.2015.08.006.

Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska A., Przewodowski W., **Otulak K**. (**2015**). Ion-exchange membrane chromatography as an alternative method of separation of potato Y virus. Plant Breeding and Seed Science 72: 56-67.

Grupa A*., **Otulak-Kozieł K.,** Syller J. (**2018**) Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of Potato virus Y (PVY). Plant Pathology (2018), 67(9):1997-2012, doi: 10.1111/ppa.12892,

Bojarska A., Janas K., Pejsak Z., **Otulak-Kozieł K**., Garbaczewska G., Hrynkiewicz W., Sadowy E*. (**2020**) Diversity of serotypes and new cps loci variants among Streptococcus suis isolates from pigs in Poland and Belarus. Veterinary Microbiology, 240: 108534, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108534.

- **Współpraca z ośrodkami za granicą:**

Otulak K., Chouda M., Bujarski J., Garbaczewska G., (**2015**) The evidence of Tobacco rattle virus impact on host plant organelles ultrastructure., Micron, 70: 7-20, DOI: 10.1016/j.micron.2010.11.

Kozieł E., **Otulak K**., Lockhart B.E.L., Garbaczewska G.,(**2017**). Subcelullar localization of proteins associated with Prune dwarf virus replication. European Journal of Plant Pathology 149:653–668, DOI: 10.1007/s10658-017-1215-8.

Kozieł E., Bujarski J.J., **Otulak K***. (**2017**) Molecular biology of Prune dwarf virus—a lesser known member of the Bromoviridae but a vital component in the dynamic virus–host cell interaction network. International Journal of Molecular Sciences, 18(12): 2733, doi:10.3390/ijms18122733.

Otulak K., Kozieł E., Lockhart B.E.L., Garbaczewska G., (**2017**) Ultrastructural effects of PVY^{NTN} infection of Capsicum annum L. cv. Yolo Wonder generative organs. Phytopatologia Mediterranea 56 (3): 379-391. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-20252.

Kozieł E., **Otulak-Kozieł K*,** Bujarski J.J. (**2018**) Ultrastructural analysis of Prune dwarf virus intercellular transport and pathogenesis. International Journal of Molecular Sciences 2018, 19(9): 2733, doi:10.3390/ijms18122733.

Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Lockhart B.E.L., (**2018**) Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by Potato virus Y (PVY^{NTN}). International Journal of Molecular Sciences 19(3): 862 DOI:10.3390/ijms19030862.

Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Bujarski J.J, (**2018**) Spatiotemporal changes in xylan-1/xyloglucan and xyloglucan xyloglucosyl transferase (XTH-Xet5) as a step-in of ultrastructural cell wall remodelling in Potato–Potato Virus Y (PVY^{NTN}) Hypersensitive and Susceptible Reaction. International Journal of Molecular Sciences 19(8): 2287, DOI:10.3390/ijms19082287.

Otulak-Kozieł K, Kozieł E., Valverde R.A. (**2019**) The Respiratory Burst Oxidase Homolog D (RbohD) Cell and Tissue Distribution in Potato-Potato Virus Y (PVY ^{NTN}) Hypersensitive and Susceptible Reactions. *International Journal of Molecular Sciences , article invited to the special issue: Plant Viruses and Virus-Induced Disease, 2019, 20, 2741.*

Kozieł E., **Otulak-Kozieł K*,** Bujarski J.J. **(2020)** Modifications in tissue and cell ultrastructure as elements of immunity-like reaction in *Chenopodium quinoa* against *Prune dwarf virus* (PDV). *Cells, 19(9)*: 2733, doi:10.3390/ijms18122733.

Otulak-Kozieł K, Kozieł E, Lockhart B, Bujarski J.J. (**2020**) The Expression of Potato Expansin A3 (*StEXPA3*) and Extensin4 (*StEXT4*) Genes with Distribution of StEXPAs and HRGPs-Extensin Changes as an Effect of Cell Wall Rebuilding in Two Types of PVY ^{NTN} - *Solanum tuberosum* Interactions. *Viruses*, 12(1), 66; DOI: 10.3390/v12010066.

Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Escalante C., Valverde R. **(2020)** Ultrastructural analysis of cells from bell pepper (*Capsicum annuum*) infected with bell pepper endornavirus. Front. Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2020.00491.

Po uzyskaniu stopnia doktora zdobywałam <u>doświadczenie naukowe za granicą</u> oraz w kraju uczestnicząc w workshopach i szkoleniach zagranicznych zdobywając nie tylko teoretyczną wiedzę, ale także praktyczne umiejętności, które wykorzystywałam w swoich badaniach. W tym <u>'workshopy' i kursy stażowe poświęcone technikom mikroskopowym:</u>

•**2011r.** Toruń- Uniwersytet Mikołaja Kopernika- Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Zakład Biologii Komórki, Pracownia Biologii Rozwoju-kurs 'Techniki immunocytochemiczne lokalizacji molekuł *in situ* na poziomie mikroskopu elektronowego, świetnego i konfokalnego', wrzesień 2011;
•**2014r.** Czechy- IFSM- School of Microscopy w Instytucie Genetyki Molekularnej Czeskiej Akademii Nauk , 6-12 wrzesień 2014 wraz z "The 18th International Microscopy Congres" in Prague (Czechy); gdzie otrzymałam stypendium IMC „European Scholarship for Young scientist"
•**2014r.** Czechy, Praga- TESCAN and Leica Microsystems - kurs Cryo FIB-SEM in Life Sciences: *From Sample Preparation to 3D Volume Rendering*, 10 wrzesień 2014;
•**2019r.** Czechy 10-20 czerwiec**,** kursu stażowego w ramach programu EMBO Practical Course (*European Molecular Biology Organisation*) České Budějovice - "Advanced methods of electron microscopy in cell biology".

Oraz <u>*workshopy i kursy poświęcone interakcjom roślin z mikroorganizmami, czy też podnoszeniu kwalifikacji z zakresu biologii molekularnej*</u>:

•**2013r.**, Francja, 7-11wrzesień, Workshop European Molecular Biology Organization (EMBO) "Green viruses- from gene to landscape", Hyères-les-Palmiers, France;

•**2014r.**, Francja, 24-29 sierpień, Workshop European Molecular Biology Organization (EMBO): 'Intercellular communication in plant development and disease' in Bishoffsheim (Francja);
•**2017r.**, Niemcy, 10-15 lipiec, Workshop European Molecular Biology Organization (EMBO) 'Intercellular communication in development and disease'. w Berlinie;
•EU FP7 project REGPOT-2-11-1"WULS Plant Health - Warsaw Plant Health Initiative, workshop: "Real-time PCR Technique for the detection of the Plant Viruses: Classical and molecular approaches in plant pathogen taxonomy, WULS PLANT HEALTH, wrzesień 2013;

•**2016r** Współczesne metody analizy ekspresji genów - we współpracy z Muzeum i Instytutem Zoologii, Polskiej Akademii Nauk. Szkolenie w Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk, wrzesień 2016;
•**2017r** Profilowanie ekspresji genów metodą qPCR - we współpracy z Muzeum i Instytutem Zoologii Polskiej Akademii Nauk. Szkolenie w Instytucie Zoologii, Polskiej Akademii Nauk, marzec 2017;

Jestem także aktywnym recenzentem w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy A JCR. Wykonałam około 33 recenzje w czasopismach takich jak :

Biomolecules, Protoplasma, Plants, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Phytopathology, Archives of Agronomy and Soil Science, European Journal of Plant Pathology, Plant Pathology, Microorganisms, Phytopathologia Mediteranea, Photosynthetica, Pathogens, Journal of Plant Pathology.

Pełnię rolę edytora w czasopiśmie *Processes* (MDPI), Pkty MNiSW=70, IF=1,963 (koniec czerwca 2020 wzrost IF do 2,7), oraz 'guest-edytora' **specjalnego numeru "*Modeling, Control and Pathogenesis Process in Virus Infection*";**

Pełnię rolę recenzenta sekcji 'Molecular Microbiology' w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* Pkty MNiSW=140, IF=4,183 (MDPI);

Pełnię rolę edytora recenzującego w sekcji 'Virology' w czasopismach: *Frontiers in Plant Sciences & Frontiers in Microbiology*, Pkty MNiSW=100, IF=4,298.

Plany naukowe:

Obecnie współuczestniczę w pracach prowadzonych w ramach realizacji pojedynczego zadania badawczego NCN Miniatura3 pt „Modelowanie lokalizacji i dystrybucji wybranych wirusowych komponentów kompleksu replikacyjnego PVY^{NTN} oraz roślinnych białek regulujących proces replikacji tego wirusa w reakcji zgodnej i niezgodnej". Głównym celem badań jest określenie poziomu ekspresji genów kodujących białka poliproteiny *Potyvirus* uczestniczące w tworzeniu kompleksu replikacyjnego w dwóch typach interakcji oraz poznanie jak zmienia się dystrybucja składników kompleksu wraz z komponentami ze strony rośliny uczestniczącymi w tym procesie. Wyniki uzyskane na podstawie zadania badawczego Miniatura3 będą punktem wyjścia do aplikowania o przyszły projekt Opus (NCN).

Kontynuacja współpracy z Profesorem Rodrigo A. Valverde z Uniwersytetu Stanowego w Louisianie (LSU USA) w prowadzeniu badań nad grupą przedstawicieli rodzaju *Endornavirus* –mało-poznanej grupy wirusów roślinnych. Prace koncentrują się na analizach molekularnych, ultrastrukturalnych i bioinformatycznych, które mają na celu pełniejszą charakterystykę endornawirusów i ich zachowania w obrębie komórek roślinnych i grzybowych, a także próba odpowiedzi na pytanie, o pochodzenie ewolucyjne tych nowych „patogenów" roślin. W ramach tej współpracy planuję wyjazdy stażowe np. w ramach programu Erasmus + pomiędzy partnerami oraz aplikowanie o wspólny międzynarodowy projekt badawczy.

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

Od 2003 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne w postaci ćwiczeń laboratoryjnych i/lub mikroskopowych z przedmiotów:

Botanika (dla kierunku Biologia oraz Inżynieria Ekologiczna); **Botanika dla biotechnologów** (dla kierunku Biotechnologia); **Botanika-organografia/**obecnie pod nazwą **Podstawy botaniki** (dla kierunku Ogrodnictwo); **Cytologia i anatomia roślin** (dla kierunku Rolnictwo); **Systematyka i generatywne rozmnażanie roślin** (dla kierunku Rolnictwo); **Ogrody botaniczne i zoologiczne** (dla kierunku Biologia).

W formie wykładów z przedmiotów**: Botanika-wybrane zagadnienia** (dla kierunku Ochrona zdrowia roślin); **Biologia oddziaływań roślina- patogen** (kierunek Biotechnologia, kierunek Biologia); **Biologia roślin** (dla kierunku Architektura Krajobrazu); oraz przedmioty fakultatywne dla kierunku Biologia – '**Fitoterapia-czyli rośliny w farmacji i kosmetologii**' oraz '**Molekularne aspekty interakcji roślina-wirus'**.

Jestem koordynatorem i autorem programu dla przedmiotów:

•Biologia roślin' (kierunek Architektura Krajobrazu);

•'Botanika-wybrane zagadnienia' (kierunek: Ochrona Zdrowia Roślin);

•'Ogrody botaniczne i zoologiczne' (kierunek Biologia);

•przedmiotów fakultatywnych 'Fitoterapia – rośliny w farmacji i kosmetologii' (kierunek Biologia, studia I i II stopnia); oraz autorem programu i prowadzącym przedmiot fakultatywny 'Molekularne aspekty interakcji roślina-wirus' (kierunek Biologia, studia I i II stopnia).

W latach 2009-2016 oraz 2017-2020 byłam członkiem wydziałowej komisji egzaminacyjnej egzaminu z praktyk studenckich **dla kierunku Biologia** - w załączniku powołanie przez Dziekana WRiB do komisji egzaminacyjnej.

W ramach funkcji wychowawczo-organizacyjnych byłam:

•**Opiekunem roku na kierunku Rolnictwo**, studia stacjonarne I stopnia rozpoczynające się w październiku 2009 r.

•**Opiekunem roku kierunku Biologia**, rocznik rozpoczynający studia stacjonarne pierwszego stopnia w październiku 2013r.

•**Opiekunem roku na kierunku Biologia**- studenci rozpoczynający studia stacjonarne pierwszego stopnia w październiku 2015r.

Byłam promotorem trzech zakończonych prac licencjackich na kierunku biologia i jednej pracy inżynierskiej na kierunku rolnictwo, obecnie jestem promotorem trzech aktualnie realizowanych prac licencjackich na kierunki biologia.

Byłam opiekunem jednej pracy magisterskiej pt. „Cytologiczna charakterystyka tkanek liści *Nicotiana tabacum* cv. Samsun i *Gomphrena globosa* -roślin porażonych kolumbijskim wirusem bielunia (CDV)" oraz opiekunem dwóch prac doktorskich (jedna obroniona w wyróżnieniem w grudniu 2010 r. pt."Patogeneza roślin porażonych kolumbijskim wirusem

bielunia – ang. *Columbian Datura virus* CDV"), oraz drugiej dotyczącej patogenezy organów generatywnych kukurydzy porażonej wirusem mozaiki trzciny cukrowej (ang. *Sugarcaine mosaic virus,* ScMV), których promotorem była Pani dr hab. G. Garbaczewska, prof. SGGW).

Byłam promotorem pomocniczym jednej rozprawy doktorskiej obronionej z wyróżnieniem w kwietniu 2016 roku pt. "Patogeneza organów wegetatywnych śliwy i roślin testowych porażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV)".

W latach 2013 i 2014 byłam członkiem Wydziałowej Komisji do przeprowadzenia "Konkursu na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich WRiB".

Ponadto w 2014-2015 r. byłam członkiem zespołu promocji w ramach zespołu organizacji obchodów 200-lecia SGGW na Wydziale Rolnictwa i Biologii.

W ramach działań dydaktycznych i jednocześnie popularyzujących naukę **w 2015 r. byłam wykonawcą w ramach zadań** realizacji Projektu nr umowy UDA-POK.04.01.01-00-110/14-00 pt. Przygotowanie do kariery studentów Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, 2007-2013, priorytet IV „Szkolnictwo wyższe i nauka", działanie 4.1 Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy, poddziałanie 4.1.1. **współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego**. Odpowiadałam za organizację aktywności stażowej i rekrutację studentów/magistrantów kierunku biologia na staże do jednostek naukowych poza uczelnią.

W ramach popularyzacji nauki jestem **współautorem rozdziałów monografii popularyzujących:**

*Paduch-Cichal Elżbieta, **Otulak Katarzyna**, Wesołowska Aleksandra (**2010**): „Wstępne wyniki badań dotyczących wykrywania i identyfikacji wirusów borówki wysokiej na plantacjach w Polsce", opublikowane w: ' Intensyfikacja uprawy krzewów jagodowych przez wdrażanie najnowszych wyników badań' :uprawa borówki wysokiej, Skierniewice, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniążka, ss. 48-53, Komitet Nauk Ogrodniczych PAN, ISBN – 9788360573419.

***Byłam autorem koncepcji i autorem korespondencyjnym rozdziału w monografii uwzględniającej aspekt edukacyjny wraz z naukowym: •Otulak K.,** Kozieł E., Garbaczewska G., (**2014**) "Seeing is beliving". The use of light, fluorescent and transmission electron microscopy in the observation of pathological changes during different plant-virus interactions, In: **Microscopy: advances in scientific research and education**, 6(1):367-376, ISBN:978-84-942134--3-4.

Ponadto do działalności popularyzującej naukę mogę zaliczyć dwa zdarzenia:

- Moje prace (P2 z osiągnięcia oraz praca przeglądowa z dorobku dodatkowego) posłużyły do stworzenia trzech podrozdziałów w 5wydaniu 2014r podręcznika '**Plant Virology' pod**

redakcją Prof. Rogera Hulla, wydawnictwo Elsevier [APS American Phytopathology SocietyAcademic Press] - rozdział 10 'Movement of viruses within plants' str.562 oraz str.551 i str.559.
•Wykonałam figury ze zdjęciami obrazującymi objawy, zmiany anatomiczne oraz efekty zmian ultrastrukturalnych wywołanych infekcją wirusową, które zostały zamieszczone i wydane w podręczniku '**Reakcje komórek roślin na czynniki stresowe'**, **tom2**, pod redakcją prof. A. Woźnego i Prof. A. Goździckiej -Józefiak, wydawnictwo naukowe UAM, ISBN-13,978-83-232-2198-2.

W 2019r byłam członkiem komisji w ramach ogólnouczelnianego przeglądu dorobku kół naukowych SGGW.

W 2019 r. pełniłam rolę przewodniczącego komisji weryfikacji prac dyplomowych na kierunku Biologia, Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW.

W latach 2016-2019 byłam członkiem Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW, jako przedstawiciel adiunktów.

W latach 2016-2019 byłam członkiem Wydziałowej Komisji do Spraw Jakości Kształcenia na Wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW.

Od października 2020r jestem członkiem Rady Programowej dyscypliny nauki biologiczne na wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW oraz członkiem komisji ds. hospitacji zajęć dydaktycznych w dyscyplinie Biologia na Wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW.

Podsumowanie dorobku naukowego (zamieszczono w tabeli poniżej):

[orcid.org/0000-0001-9424-1662]

***Wg bazy Web of Science* Indeks Hirscha: 7**

Liczba wszystkich cytowań: 146 (wg Web of Science); 154 (wg bazy Scopus)

Liczba wszystkich cytowań bez autocytowań: 80 (wg Web of Science); 85 (wg bazy Scopus).

Publikacje	Liczba publikacji z JCR	Pkty MNiSW w roku opublikowania	*Pkty MNiSW obecnie w 2019 roku	Sumaryczny IF w roku opublikowania	Sumaryczny IF 5letni
(A) Osiągnięcie Naukowe	7	375	760	21,446	22,418
Publikacje niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego: - przed uzyskaniem stopnia doktora	1	20	100	3,540	3,342
Publikacje niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego - po uzyskaniu stopnia doktora – *{publikacje powstałe z doktoratu}*	3	74	270	4,520	5,545
Publikacje niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego - po uzyskaniu stopnia doktora – pozostałe publikacje	19	869	1680	44,578	44,342
(B) Suma dla publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego	23	963	2050	52,638	53,229
Suma wszystkich publikacji (A+B):	30	1338	2810	74,084	75,647
Komunikaty prezentowane na konferencjach: •krajowych •międzynarodowych	15 28				
SUMA (publikacje + doniesienia konferencyjne)	72	1338	2810	74,084	75,647

Katarzyna Otulak-Kozieł

.....

(Podpis wnioskodawcy)