
POSTĘPOWANIE HABILITACYJNE

dr Agata Kućko

**Katedra Fizjologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**

WARSZAWA, 2020

SPIS TREŚCI

1. Wniosek w języku polskim	2
2. Wniosek w języku angielskim	3
3. Dane wnioskodawcy w języku polskim (<i>Załącznik nr 1a</i>)	4
4. Dane wnioskodawcy w języku angielskim (<i>Załącznik nr 1b</i>)	6
5. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora (<i>Załącznik nr 2</i>)	8
6. Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w języku polskim (<i>Załącznik nr 3a</i>)	10
7. Kserokopie dokumentów potwierdzających osiągnięcia powstałe w wyniku prowadzenia badań w więcej niż jednej jednostce naukowej	34
8. Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w języku angielskim (<i>Załącznik nr 3b</i>)	50
9. Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny w języku polskim (<i>Załącznik nr 4a</i>)	73
10. Analiza parametryczna.....	88
11. Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny w języku angielskim (<i>Załącznik nr 4b</i>)	105
12. Oświadczenia współautorów (<i>Załącznik nr 5</i>)	120
13. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (<i>Załącznik nr 6</i>)	131

Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
budynek 37
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

AGATA KUĆKO

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii

Wniosek

z dnia 8 czerwca 2020 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie **nauk ścisłych i przyrodniczych** w dyscyplinie **nauk biologicznych**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Egzogenne i endogenne czynniki determinujące funkcjonowanie strefy odcinania kwiatów lubinu żółtego

Wnoszę – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **jawnym**.

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Agata Kućko

Załączniki:

1. Dane kontaktowe w języku polskim (a) i angielskim (b).
2. Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora.
3. Autoreferat w języku polskim (a) i angielskim (b) oraz kserokopie dokumentów potwierdzających aktywność naukową realizowaną w więcej niż jednej jednostce naukowej.
4. Wykaz osiągnięć naukowych w języku polskim (a) i angielskim (b).
5. Oświadczenia współautorów.
6. Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.
7. Wersja elektroniczna wniosków i załączników (2 nośniki danych).

Institute of Biology
Warsaw University of Life Sciences – SGGW
(WULS-SGGW)
Nowoursynowska 159
building 37
02-776 Warsaw
through:
The Council of Scientific Excellence
pl. Defilad 1
00-901 Warsaw
(Palace of Science and Culture, 24th floor,
room 2401)

AGATA KUĆKO
Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW)
Department of Plant Physiology, Institute of Biology

Application

dated June 8, 2020

re.: commencement of the procedure for the conferment of the post-doctoral degree of doctor habilitated in the field of **natural sciences** in the following discipline **biological sciences**.
Scientific achievement which entitles the applicant to commence the procedure for the conferment of the post-doctoral degree of doctor habilitated:

Exogenous and endogenous factors which determine the functioning of floral abscission zone in yellow lupine

Pursuant to art. 221 para 10 of the Higher Education and Science Act dated 20 July 2018 (Polish Journal of Laws of 2018 item 1668, as amended) I hereby kindly request that the habilitation commission pass a resolution on the conferment of the post-doctoral degree of doctor habilitated in **open** voting.

I was advised of the following:

The President of the Scientific Council of Excellence with its registered office in Warsaw (pl. Defilad 1, 24th floor, 00-901 Warsaw) is the Administrator of personal data collected under the procedure for the conferment of the post-doctoral degree of doctor habilitated.

Contact us via e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, phone 22 656 60 98 or personally at our office. Personal data shall be processed pursuant to art. 6 para 1 letter c) Regulation (EU) 2016/679 dated 27 April 2016 in connection with art. 220-221 and art. 232-240 of the Higher Education and Science Act dated 20 July 2018, for the purposes of the procedure for the conferment of the post-doctoral degree of doctor habilitated and in order to exercise the rights and obligations as well as the right to appeal in this procedure.

For detailed information on processing personal data in the procedure see www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodz.html

Agata Kucko

Attachments:

1. Personal data in Polish (a) and English (b).
2. Doctoral degree diploma.
3. Summary of professional accomplishments in Polish (a) and English (b) and copies of documents confirming scientific activity carried out in more than one scientific unit.
4. List of scientific achievements in Polish (a) and English (b).
5. Statements of co-authorship.
6. Copies of publications representing scientific achievement.
7. Electronic version of applications and attachments (2 pendrives).

ZAŁĄCZNIK NR 2

**Kopia dokumentu potwierdzającego
posiadanie stopnia doktora**



ODPIS

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

DYPLOM

wydany w Rzeczypospolitej Polskiej

Agata Kućko

15 października 1987 r.

data urodzenia

Mława

miejsce urodzenia

na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej
**Charakterystyka strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)
oraz udział kwasu abscysynowego i etylenu w jej funkcjonowaniu**

oraz po złożeniu wymaganych egzaminów uzyskała stopień naukowy

DOKTORA

nauk biologicznych w zakresie biologii

nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 17 listopada 2017 r.

Promotor w przewodzie doktorskim:	dr hab. Jacek Kęsy
Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim:	dr hab. Emilia Wilmowicz
Kopromotor w przewodzie doktorskim:	dr Juan de Dios Alché Ramírez
Recenzenci w przewodzie doktorskim:	prof. dr hab. Franciszek Dubert
	dr hab. Marta Kobłowska

PROMOTORZY

J. Kęsy
E. Wilmowicz

REKTOR

prof. dr hab. Andrzej Tretyn

DZIEKAN

prof. dr hab. Werner Ulrich

nr dyplomu 4740

m.p.

Toruń, 19 lutego 2018 r.



Kwalifikacja pełna na poziomie
ósmym Polskiej Ramy Kwalifikacji

ZAŁĄCZNIK NR 3a

Autoreferat
przedstawiający opis dorobku
i osiągnięć naukowych

1. Imię i Nazwisko

Agata Kućko

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2017 - stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych - Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Tytuł rozprawy: „Charakterystyka strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) oraz udział kwasu abscysynowego i etylenu w jej funkcjonowaniu”. Praca wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii, UMK w Toruniu. Promotor: dr hab. Jacek Kęsy, prof. UMK, kopromotor: dr Juan de Dios Alché Ramírez (Estación Experimental del Zaidín, EEZ-CSIC, Granada, Hiszpania), promotor pomocniczy: dr hab. Emilia Wilmowicz, prof. UMK; recenzenci: prof. dr hab. Franciszek Dubert (Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie), dr hab. Marta Koblowska, prof. UW (Uniwersytet Warszawski).

2011 - tytuł magistra biologii - Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Tytuł pracy: „Zmiany aktywności transkrypcyjnej genu *InOPR3* w wybranych procesach wzrostowo-rozwojowych wilca wielkokwiatowego *Ipomoea nil*”. Praca wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii, UMK w Toruniu. Promotor: prof. dr hab. Jan Kopcewicz; recenzent: prof. dr hab. Andrzej Tretyn.

2009 - licencjat z biologii - Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Tytuł pracy: „Mechanizmy regulacji wzrostu i rozwoju roślin przez gibereliny”. Praca wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin. Promotor: dr hab. Jacek Kęsy, prof. UMK; recenzent: prof. dr hab. Jan Kopcewicz.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.11.2018 - obecnie - asystent naukowy (*Post-doc*, umowa o pracę), Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

19.02.2018 - 31.10.2018 - adiunkt naukowo-dydaktyczny (umowa o pracę na zastępstwo), Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Gdański.

1.04.2017 - 15.10.2017 - biolog (umowa o pracę), Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

27.09.2011 - 30.09.2012 - jeden z głównych wykonawców projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (umowa o dzieło), Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Egzogenne i endogenne czynniki determinujące funkcjonowanie strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego

4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

- 4.2.1. Wilmowicz E.*, **Kućko A.***, Ostrowski M., Panek K. (2018) *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-like* is an abscission associated and phytohormone-regulated gene in flower separation of *Lupinus luteus*. *Plant Growth Regulation* 85: 91-100. (IF₂₀₁₉: 2.473; punktacja MNiSW: 30).

Mój wkład polegał na uczestnictwie w powstawaniu koncepcji badań oraz ich planowaniu, wykonaniu traktowań roślin hormonami i ich inhibitorami, zebraniu materiału roślinnego, zatopieniu go w żywicy i przygotowaniu do obserwacji metodami mikroskopii świetlnej oraz elektronowej. Wykonałam analizę histologiczną struktury komórek aktywnej i nieaktywnej AZ oraz AZ traktowanej hormonami i inhibitorami ich biosyntezy lub działania. Odpowiadałam za przedstawienie graficzne uzyskanych wyników. Zidentyfikowałam pełną sekwencję cDNA genu LIIDL (izolacja RNA, synteza cDNA, reakcje PCR, klonowanie molekularne, analiza wyników sekwencjonowania i weryfikacja poprawności sekwencji) oraz optymalizowałam warunki reakcji qPCR. Współuczestniczyłam w badaniach ultrastruktury komórek. Interpretowałam uzyskane wyniki i przygotowałam je do publikacji. Byłam autorem do korespondencji, współuczestniczyłam w pisaniu manuskryptu, jego redagowaniu oraz stworzeniu jego ostatecznej wersji po uwzględnieniu uwag recenzentów. Współuczestniczyłam w pozyskaniu środków finansowych na przeprowadzenie eksperymentów. Mój wkład w powstanie pracy jest równy udziałowi pani dr hab. Emilii Wilmowicz ().*

- 4.2.2. **Kućko A.**, Wilmowicz E., Ostrowski M. (2019) Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *Journal of Plant Physiology* 236: 51-60. (IF₂₀₁₉: 2.825; punktacja MNiSW: 100).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji i planowaniu badań, traktowaniu roślin hormonami, przeprowadzeniu eksperymentu dotyczącego aktywowania strefy odcinania kwiatów, zbiorze materiału roślinnego do analiz molekularnych i chromatograficznych. Wykonałam oznaczenia poziomu ACC (izolacja, oczyszczanie, analiza GC-MS). Wykonałam reakcję immunolokalizacji IAA w strefie odcinania po aplikacji ET oraz dokonałam detekcji ACC po traktowaniu IAA (zbiór materiału, utrwalanie, zatapianie w żywicy, reakcje z przeciwciałami, obserwacje mikroskopowe). Zbadałam ekspresję genów biosyntezy ET, tj. LIACS, LIACO (izolacja RNA, synteza cDNA, qPCR). Współuczestniczyłam w interpretacji uzyskanych wyników, ich graficznej prezentacji, pisaniu i korekcie wszystkich wersji manuskryptu.

- 4.2.3. **Kućko A.**, Smoliński D.J., Wilmowicz E., Florkiewicz A., Alché J. (2019) Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* 256: 1173-1183. (IF₂₀₁₉: 2.633; punktacja MNiSW: 70).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji badań nad udziałem LIBOP w procesie odcinania kwiatów, pomocy w zbiorze materiału roślinnego

do analiz mikroskopowych i molekularnych, przygotowaniu, zatapianiu w żywicy i utrwalaniu fragmentów tkanek przeznaczonych do wykonania preparatów użytych w reakcji immunolokalizacji LIBOP, poly(A) mRNA oraz U2 snRNA. Wykonałam detekcję reaktywnych form tlenu w strefie odcinania. Współuczestniczyłam w analizach z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego i interpretacji uzyskanych wyników. Wykonałam ich graficzną prezentację. Współuczestniczyłam w pozyskaniu środków finansowych na przeprowadzenie eksperymentów oraz redagowaniu wszystkich wersji manuskryptu.

- 4.2.4. Wilmowicz E.*, **Kućko A.***, Burchardt S., Przywieczerski T. (2019) Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 3731. (IF₂₀₁₉: 4.183; punktacja MNiSW: 140).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji i planu badań. Uczestniczyłam w zbiorze materiału do analiz molekularnych, mikroskopowych i instrumentalnych. Wykonałam reakcje immunolokalizacji MPK6 i katalazy (utrwalanie i zatapianie w żywicy materiału roślinnego, wykonanie reakcji z przeciwciałami i obserwacje mikroskopowe), określiłam aktywność katalazy i poziom H₂O₂ (analizy spektrofotometryczne). Zidentyfikowałam pełne sekwencje cDNA genów LIZEP, LIHSL, LIMP6 (izolacja RNA, synteza cDNA, reakcje PCR, klonowanie molekularne, analiza wyników sekwencjonowania i weryfikacja poprawności sekwencji). Zoptymalizowałam warunki reakcji qPCR i zbadalam ekspresję genów LIIDL, LIHSL, LIMP6, LIZEP, LIACS, LIACO (izolacja RNA, synteza cDNA, qPCR). Interpretowałam uzyskane wyniki, wykonałam ich graficzną prezentację oraz analizę statystyczną. Współuczestniczyłam w interpretowaniu wszystkich otrzymanych rezultatów, pisaniu, redagowaniu manuskryptu i korekcie autorskiej. Mój wkład w powstanie pracy jest równy udziałowi pani dr hab. Emilii Wilmowicz (*).

- 4.2.5. **Kućko A.**, Wilmowicz E., Pokora W., Alché J. (2020) Disruption of auxin gradient in abscission zone area evokes asymmetrical changes leading to flower separation in yellow lupine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 3815. (IF₂₀₁₉: 4.183; punktacja MNiSW: 140).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji i zaplanowaniu wszystkich badań. Analizowałam wpływ inhibitora transportu auksyn na odcinanie kwiatów (doświadczenie fizjologiczne) oraz strukturę komórek AZ (zbiór, zatapianie w żywicy i utrwalanie materiału oraz jego analiza histologiczna). Uczestniczyłam w zbiorze materiału do wszystkich zaplanowanych eksperymentów. Analizowałam lokalizację IAA, ABA, ACC, CAT i APX w strefie odcinania (zbiór, zatapianie oraz utrwalanie materiału, reakcje z właściwymi przeciwciałami, obserwacje mikroskopowe i dokumentacja wyników). Oznaczałam ekspresję genów biosyntezy ET, tj. LIACS i LIACO (izolacja RNA, synteza cDNA, qPCR) oraz lokalizację CAT (analiza spektrofotometryczna). Interpretowałam uzyskane wyniki, wykonałam ich analizę statystyczną oraz graficzną prezentację. Uczestniczyłam w analizie wszystkich otrzymanych wyników, ich przedstawieniu, pisaniu manuskryptu i redagowaniu późniejszych wersji po uwzględnieniu uwag recenzentów.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cytowania prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały podkreślone i pogrubione

UZASADNIENIE WYBORU TEMATYKI BADAWCZEJ

Odcinanie organów od rośliny jest zjawiskiem fizjologicznym, które jest wpisane w realizację jej programu rozwojowego. Proces ten może być również stymulowany przez egzogenne czynniki, takie jak susza czy atak patogenów i wówczas ma na celu usunięcie zbędnych lub zainfekowanych organów (Roberts i in., 2000). W przypadku gatunków o ważnym znaczeniu gospodarczym, takich jak rośliny strączkowe (*Fabaceae* L.), przedwczesne i nadmierne odcinanie kwiatów uniemożliwia zawiązanie strąków i w konsekwencji wytworzenie nasion, które są cennym źródłem białka (Kambal i in., 1969; Fakir i in., 2011; Couzigou i in., 2016). W naszej szerokości geograficznej u łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) na I piętrze kwiatostanu opada do 60%, na drugim niemal 90%, a na wyższych piętrach wszystkie zawiązane kwiaty (Prusiński i Borowska, 2002). To niekorzystne zjawisko bezpośrednio wiąże się z obniżeniem plonowania roślin i powoduje ogromne straty ekonomiczne w sektorze rolniczym. Od wielu lat pomiędzy środowiskiem rządowym, naukowcami i rolnikami dyskutowane są możliwości zwiększenia wykorzystania do produkcji pasz rodzimych i niedocenianych gatunków roślin wysokobiałkowych, takich jak łubin. Ograniczyłoby to, a nawet z czasem pozwoliło na zastąpienie importowanych surowców i zagwarantowało tzw. bezpieczeństwo białkowe kraju oraz jego niezależność gospodarczą. Dlatego wszelkie działania badawcze dostarczające nowych informacji z zakresu mechanizmów regulujących odcinanie organów generatywnych u roślin strączkowych mogą przyczynić się do opracowania konkretnych zabiegów agrotechnicznych podnoszących współczynnik ich plonowania oraz zwiększenia zainteresowania rolników uprawą zapomnianych, jednak obiecujących gatunków i uzyskania wymiernych efektów w żywieniu zwierząt gospodarskich.

WPROWADZENIE

Odrzucenie organu od rośliny macierzystej zachodzi dzięki aktywności unikatowej struktury - strefy odcinania (AZ, ang. *abscission zone*). Czas i miejsce jej powstawania jest determinowane genetycznie (Addicott, 1982; Sexton i Roberts, 1982). Istotny jest fakt, że w pełni wykształcona AZ nie gwarantuje separacji, musi dojść do jej aktywacji. Efektem tych przemian jest przerwanie ciągłości tkanek, a procesy te są ściśle kontrolowane zarówno przez czynniki genetyczne, jak i hormonalne (Estornell i in., 2013).

Z uwagi na łatwość uzyskania roślin transgenicznych oraz dostępność mutantów insercyjnych większość dotychczasowych badań mających na celu poznanie molekularnych przemian zachodzących w AZ prowadzona jest na roślinie modelowej - rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*) (Niederhuth i in., 2013). Na podstawie uzyskanych wyników opracowano model odcinania organów (Figura 1) (Estornell i in., 2013; Kim, 2014).

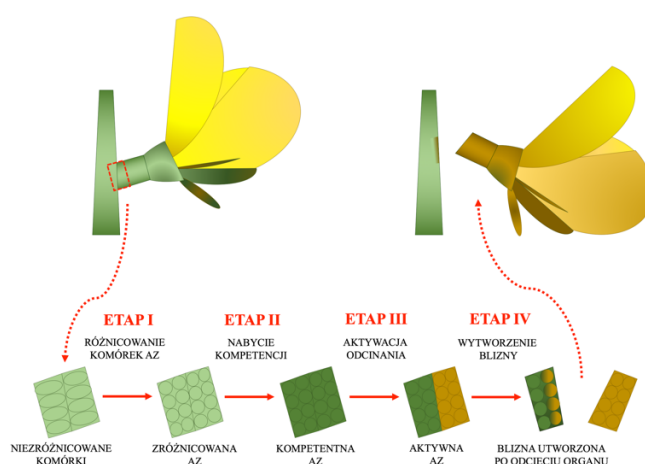


Figura 1. Uproszczony schemat opisujący kolejne etapy separacji organu zachodzącej na poziomie strefy odcinania (na podstawie Estornell i in., 2013, zmodyfikowane).

Wyróżniono w nim cztery podstawowe etapy odcinania organów, które, jak się później okazało, mogą być uniwersalne także dla innych gatunków roślin. Pierwszy etap stanowi wytworzenie AZ, które jest koordynowane przez czynniki transkrypcyjne, takie jak JOINTLESS czy BLADE ON PETIOLE (BOP). Komórki AZ nabywają wówczas kompetencji do odbierania sygnałów aktywujących odcinanie, m.in. fitohormonów. Następnie zaczynają działać enzymy hydrolityczne, dochodzi do reorganizacji struktury błon i ścian komórkowych, rozpuszczenia blaszki środkowej i przerwania ciągłości tkanek. Procesy te mogą być spowodowane włączaniem mechanizmów programowanej śmierci komórki, które są związane ze zmieniającym się poziomem reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Tuż po separacji powstaje tkanka zabezpieczająca powstałą bliznę (Addicott, 1982; Sexton i Roberts, 1982; Estornell i in., 2013).

Eksperymenty prowadzone nie tylko u *A. thaliana*, ale także u nielicznych gatunków roślin uprawnych, pozwoliły na zidentyfikowanie białek regulujących odcinanie organów, wśród których najważniejszym jest INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA). Pełni ono funkcję liganda kinaz receptorowych HAESA/HAESA-like (HAE/HSL) (Butenko i in., 2003; Stø i in., 2015). Na C-końcu IDA posiada konserwatywną domenę EPIP, która warunkuje aktywność białka oraz odpowiada za jego wiązanie z receptorem. Z kolei N-końiec zawiera peptyd sygnałowy kierujący IDA do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie łączy się z zakotwiczonym w błonie białkiem HAE/HSL, co uruchamia w cytoplazmie komórek AZ kaskadę kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*) (Stenvik i in., 2008). Kompleks IDA-HAE/HSL uwalnia czynnik transkrypcyjny KNAT1 (ang. *knotted-like from Arabidopsis thaliana 1*) będący represorem ekspresji KNAT2/KNAT6, przez co podnosi ich aktywność transkrypcyjną, a to z kolei aktywuje geny kodujące enzymy hydrolityczne (Cho i in., 2008; Shi i in., 2011; Butenko i in., 2012). **Szlak sygnałowy uruchamiany przez IDA, w którym pośredniczy HAE/HSL, funkcjonuje u różnych grup filogenetycznych roślin wyższych, jednak nadal nie wiadomo w jaki sposób jego poszczególne elementy są regulowane u określonych gatunków, zwłaszcza uprawnych. W tym kontekście nasuwają się kolejne pytania, szczególnie dotyczące powiązań z innymi szlakami transdukcji sygnału prowadzącymi do separacji organu, m.in. fitohormonalnymi** (Tranberger i in., 2017).

Dotychczasowe analizy prowadzone u łubinu żółtego wykazały, że AZ kwiatów jest zlokalizowana u podstawy ich szypulek i budują ją małe, izodiametryczne komórki wyraźnie różniące się od tych występujących poniżej (w części proksymalnej) i powyżej (w części dystalnej) (Frankowski i in., 2015b). U tego gatunku proces separacji kwiatów jest związany ze zmieniającą się aktywnością genu *LIBOP* kodującego czynnik transkrypcyjny, którego ekspresja jest dodatkowo regulowana przez fitohormony (Frankowski i in., 2015a, b). Wyniki pionierskich eksperymentów prowadzących w latach 60. ubiegłego stulecia w kontekście hormonalnej regulacji odcinania organów sugerowały, że najistotniejszym stymulatorem tego procesu jest kwas abscysynowy (ABA, ang. *abscisic acid*) (Ohkuma i in., 1963; Addicott i in., 1968). Późniejsze analizy zweryfikowały to przekonanie, gdyż wykazały, że jego udział jest często pośredni. ABA wpływa na biosyntezę etylenu (ET), będącego głównym efektem odcinania, który stymuluje aktywność enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę składników błon i ścian komórkowych (del Campillo i Bennett, 1996; Kalaitzis i in., 1997; Bonghi i in., 1992; Roongsattham i in., 2012). Podobną zależność stwierdzono u łubinu żółtego, u którego jednoczesna aplikacja ABA i inhibitora działania ET - norbornadienu (NBD), skutkowałą utrzymaniem kwiatów na roślinach. Okazało się, że ABA stymulując ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę ET i prowadząc do akumulacji jego prekursora - kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC, ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*) w AZ aktywuje ją, czego efektem jest separacja kwiatów (Wilmowicz i in., 2016). Równie ważny jak ABA i ET w odcinaniu organów jest wzajemny stosunek ilości kwasu indolilo-3-octowego (IAA, ang. *indole-3-acetic acid*) i ET po obu stronach AZ. Wykazano, że utrzymanie wysokiego poziomu IAA powyżej i niskiego poniżej AZ zapobiega odrzucaniu organu, natomiast zaburzenie polarnego transportu auksyny zwiększa wrażliwość komórek AZ na ET (Addicott i in., 1955; Sexton i Roberts, 1982;

Estornell i in., 2013). Z drugiej strony, auksyny mogą stymulować produkcję ET i powodować odcinanie organów, tak jak ma to miejsce u bawełny (*Gossypium hirsutum*) i goździka ogrodowego (*Dianthus caryophyllus*) (Morgan i Hall, 1964; Jones i Woodson, 1999). **Z uwagi na złożoność interakcji IAA i ET oraz brak informacji dotyczących ich udziału w regulacji odcinania organów, zwłaszcza na poziomie AZ, istniała uzasadniona potrzeba wyjaśnienia tego zagadnienia.**

Aktywacja AZ, a co za tym idzie odrzucenie organu, mogą być wywołane przez niekorzystne warunki środowiskowe, które w znacznym stopniu decydują o wielkości i jakości plonu roślin uprawnych. W dobie globalnych zmian klimatycznych i coraz częściej występujących skrajnych warunków pogodowych, czynnikiem w największym stopniu wpływającym na niekontrolowane odcinanie organów generatywnych jest niedobór wody w glebie. Zgodnie z raportem Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy (IUNG-PIB, raport 08, okres: 1.06-31.08.2019 r.) susza dotknęła w Polsce wszystkie województwa i wszystkie monitorowane uprawy, przyczyniając się do znacznych strat, a w skrajnych przypadkach doprowadziła do całkowitej utraty plonów. **Choć często badano mechanizmy reakcji roślin na niedobór wody w glebie, wciąż w literaturze naukowej brak jest informacji dotyczących wpływu tego czynnika abiotycznego na przemiany zachodzące w AZ organów generatywnych, które są kluczowe dla ich utrzymywania.** Uzyskane do tej pory wyniki badań na temat odcinania liści u *A. thaliana* w warunkach suszy wykazały, że odbiór bodźca stresowego uruchamia kaskadę kinaz MAP, w których sygnałem przekazującym informację są m.in. ROS i fitohormony (Patharkar i Walker, 2016). Dane literaturowe wskazują ponadto, że kinazy MAP w odpowiedzi na czynniki środowiskowe, np. suszę, wpływają na szlaki sygnałowe hormonów roślinnych (Zhang i in., 2016; Jagodzick i in., 2018). **Pogłębienie dotychczasowej wiedzy z zakresu zależnych od ROS i fitohormonów modyfikacji AZ towarzyszących indukowanemu suszą odcinaniu kwiatów może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów warunkujących tolerancję roślin na niesprzyjające warunki środowiska, które determinują plonowanie roślin ważnych gospodarczo.**

Zestawiając wyniki danych literaturowych sformułowany został cel badań stanowiących podstawę zgłaszanego osiągnięcia naukowego, tzn. **wytypowanie molekularnych, biochemicznych i hormonalnych elementów szlaku regulującego wczesne etapy indukcji strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego oraz określenie wpływu suszy glebowej na ich funkcjonowanie.**

WYNIKI I DYSKUSJA

Aktywacja strefy odcinania kwiatów

Kluczową kwestią podczas opracowania metodyki zbioru materiału do badań dotyczących odcinania kwiatów łubinu żółtego, było precyzyjne określenie lokalizacji AZ oraz dobór materiału niezbędnego do analiz dotyczących dwóch odmiennych procesów (1) powstawania AZ oraz (2) jej aktywacji. Samo wytworzenie AZ nie gwarantuje odcięcia kwiatu, pomimo, że struktura ta jest już w nich w pełni wykształcona. Musi pojawić się odpowiedni czynnik, który aktywuje ten proces. Jako kontrolę w moich badaniach stosowałam nieaktywną AZ zbieraną z fragmentów tkanek pochodzących z dolnych piętrowości kwiatostanu, czyli tych, które nie odcinają kwiatów, co zostało już wcześniej opracowane i opisane w pracy Frankowski i in. (2015b). Dodatkowo, występowanie w pełni rozwiniętej AZ i brak jej aktywacji potwierdzałam analizami mikroskopowymi, które umożliwiały wykluczenie włączenia mechanizmów indukujących separację. Selekcji fragmentów AZ przeznaczonych do analizy jej funkcjonowania dokonywałam po wstępnej, wizualnej ocenie tkanki, a obecność aktywnej AZ potwierdzałam badając strukturę jej komórek. Jednak kwestią nastroczającą największych trudności było uchwycenie momentu włączenia mechanizmów odcinania, które są kluczowe w kontekście badań dotyczących czynników inicjujących separację organów. Dlatego w celu lepszego poznania przebiegu wczesnych etapów separacji,

w laboratoriach na całym świecie stosuje się procedurę sztucznej aktywacji AZ, która polega na odcięciu organu skalpelem u jego nasady, co aktywuje tę strukturę w pozostałej wówczas na roślinie szypułce. Opisana metodyka była już wykorzystywana w badaniach prowadzonych u pomidora (*Solanum lycopersicum*), wilczomleczka nadobnego (*Euphorbia pulcherrima*), a także łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) (Roberts i in., 1984; Lee i in., 2008; Meir i in., 2010; Bar-Dror i in., 2011; Wilmowicz i in., 2016; Frankowski i in., 2017). Odcięcie kwiatów, będących źródłem endogennej auksyny, powoduje zaburzenie polarnego transportu tego fitohormonu, co jest dla rośliny sygnałem do aktywacji AZ i odrzucenia szypułek.

Wyniki badań wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego wskazują, że sztuczna aktywacja AZ kwiatów łubinu żółtego prowadzi na poziomie komórkowym do zmian podobnych do tych, które występują w naturalnie aktywnej AZ, m.in. intensywne podziały komórek zawierających duże jądra, ziarnistości, pęcherzyki, drobne agregaty komórkowe oraz liczne plasmodesmy (**publikacja 4.2.1.**). Przemiany te wskazują na wysoką aktywność metaboliczną komórek oraz syntezę i transport cząsteczek, które zapewniają komunikację komórkową w AZ i są zaangażowane w mechanizmy uruchamiane podczas wczesnych etapów separacji (Taylor i in., 1991). Obraz mikroskopowy preparatów aktywnej AZ kwiatów łubinu był diametralnie odmienny od nieaktywnej strefy, której komórki były grubościennie, niedzielące się i luźno ułożone (**publikacja 4.2.1.**). **Otrzymane wyniki potwierdziły, że zabieg sztucznej aktywacji może być z powodzeniem stosowany do badania zmian zachodzących w AZ w początkowych stadiach odcinania kwiatów łubinu żółtego.**

Elementy molekularnego szlaku regulującego funkcjonowanie strefy odcinania kwiatów

Geny *BOP* kodują czynniki transkrypcyjne należące do rodziny białek NPR1 (ang. *NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED*) pojawiających się w roślinach w odpowiedzi na czynniki stresowe (Ha i in., 2004). Dotychczas zostały one zidentyfikowane u *A. thaliana*, tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*), lucerny (*Medicago sativa*), lotosu japońskiego (*Lotus japonicus*), grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*), a także łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) (McKim i in., 2008; Wu i in., 2012; Couzigou i in., 2012, 2016; Frankowski i in., 2015a). Geny *BOP* ulegając ekspresji u podstawy organów stymulują powstawanie specyficznych komórek AZ, natomiast mutacje *bop1 bop2* uniemożliwiają wytworzenie AZ, np. u *A. thaliana* (McKim i in., 2008). W ostatnich latach badania na temat udziału *BOP* w regulacji odcinania organów dotyczyły ich roli jedynie w formowaniu AZ. Nie zweryfikowano jednak czy mogą one funkcjonować podczas późniejszych etapów związanych z jej aktywacją. Jedyna wzmianka dotycząca tego zagadnienia pojawiła się w pracy McKim i in. (2008). Dodatkowo, nasze wcześniejsze analizy wykazały różnice w ekspresji genu *LIBOP* pomiędzy wytworzoną, lecz nieaktywną AZ a naturalnie aktywną strukturą, w której wykazano ponad 2 razy więcej transkryptu. Pozwalało to przypuszczać, że gen ten jest zaangażowany, nie tylko w powstawanie, ale także funkcjonowanie AZ (Frankowski i in., 2015b). Aby rozstrzygnąć tę kwestię przeprowadzono u łubinu żółtego serię eksperymentów z zastosowaniem techniki *in situ*, dzięki której po raz pierwszy precyzyjnie określono lokalizację transkryptu *BOP* w komórkach AZ kwiatów podczas jej aktywacji. Wyniki te zostały potwierdzone metodą qPCR. Co więcej, prześledzono aktywność metaboliczną komórek AZ na różnych etapach jej funkcjonowania określając przestrzenną organizację poli(A) mRNA oraz bogatych w urydnę, małych jądrowych RNA (U2 snRNA), będących ważnym elementem spliceosomu (**publikacja 4.2.3.**). W pełni wykształconej, jednak nieaktywnej AZ transkrypt *LIBOP* zlokalizowany był w cytoplazmie i jądrach, a także w zewnątrzkomórkowych przestrzeniach. Występował w naczyniach drewna i komórkach parenchymy. Podczas sztucznej aktywacji AZ dochodziło do dynamicznych zmian w przestrzennej lokalizacji transkryptu *LIBOP*, które znalazły odzwierciedlenie w wynikach analiz ilościowych. Odcięcie kwiatu u jego nasady spowodowało stopniowy wzrost aktywności transkrypcyjnej badanego genu w AZ, który osiągał maksymalną wartość w 8 i 16 h po indukcji, gdzie było go niemal pięć razy więcej niż w nieaktywnej kontroli. W 2 h po

aktywacji, na poziomie komórkowym, transkrypt lokalizowano w cytoplazmie, na terenie jądra oraz plazmodesm łączących sąsiadujące komórki. Podobny wzorec jego rozmieszczenia obserwowano w 8 h, zwłaszcza w wiązkach przewodzących oraz blisko położonych komórkach, jednak w tym wariantie czasowym sygnał był silniejszy. W naturalnie aktywnej AZ dochodziło do znacznej akumulacji mRNA *LIBOP* w pobliżu wiązek przewodzących, głównie ksylemu. Wówczas transkrypt lokalizowano w przestrzeniach międzykomórkowych na obszarze AZ. Powyższe wyniki wskazują, że ***LIBOP* jest zaangażowany w procesy odcinania kwiatów zarówno we wczesnych, jak i późnych etapach funkcjonowania AZ.** Co więcej, zmieniający się wzorec przestrzennego rozmieszczenia tego transkryptu w elementach przewodzących oraz jego pojawianie się w sieci wytworzonych plazmodesm sugeruje, że *LIBOP* może być syntetyzowany w wiązkach i/lub być transportowany z innych tkanek do komórek AZ (**publikacja 4.2.3.**). Obecność plazmodesm jest związana z rozwojem danej tkanki lub specyfikacją tworzących ją komórek (Burch-Smith i in., 2011). Zapewniają one komunikację i kierunkowy przepływ czynników transkrypcyjnych oraz innych regulatorowych cząsteczek, np. RNA. Zatem plazmodesmy mogą synchronizować przekazywanie sygnałów poprzez tworzenie symplastowej sieci połączeń w rejonie AZ (Sager i Lee, 2014), a ich występowanie świadczy o wysokiej aktywności komórek. **Kumulacja składników spliceosomu U2 snRNA oraz poli(A) mRNA podczas wczesnych i późnych etapów aktywacji AZ kwiatów łubinu żółtego przemawia za bezpośrednim połączeniem procesu odcinania ze wzrostem całkowitej transkrypcyjnej aktywności komórek.** Czasowy i przestrzenny wzorec lokalizacji transkryptów podczas separacji wskazuje na to, że nowo powstałe w jądrach cząsteczki mRNA prawdopodobnie ulegają translacji na terenie cytozolu, gdzie powstają białka kluczowe dla przemian towarzyszących odcinaniu, np. enzymy hydrolityczne czy czynniki transkrypcyjne. Kolokalizacja U2 snRNA i poli(A) mRNA sugeruje z kolei, że powstałe transkrypty przechodzą procesy dojrzewania w spliceosomach (**publikacja 4.2.3.**). Wysoki poziom syntetyzowanych białek może być związany z powstawaniem *de novo* wspomnianych wyżej enzymów. Za słusznością takiego poglądu przemawiają wyniki badań prowadzonych u pelargonii pasiastej (*Pelargonium hortorum*) i *Oenanthе stolonifera*, u których aplikacja inhibitora biosyntezy białek (cykloheksamidu) hamowała odcinanie odpowiednio płatków i owoców (Evensen i in., 1993; Eo i Lee, 2009).

Inicjatorem przemian molekularnych zachodzących podczas odcinania organów jest ligand IDA, dlatego w kolejnym etapie badań mających na celu opisanie mechanizmu aktywującego ten proces zidentyfikowano u łubinu żółtego homolog genu *IDA* (*LIIDL*) (**publikacja 4.2.1.**). Uzyskana na podstawie sekwencji nukleotydowej *LIIDL* przewidywana sekwencja aminokwasowa zawiera domeny i motywy charakterystyczne dla innych roślinnych IDA/IDL, a wśród nich C-kończową, konserwatywną, 22-aminokwasową domenę EPIP warunkującą aktywność białka IDA. W jej obrębie znajduje się reszta proliny, która jak wskazują badania prowadzone u innych gatunków roślin, jest kluczowa dla interakcji i wiązania z receptorem HAE/HSL (Stenvik i in., 2008; Santiago i in. 2016). Analiza bioinformatyczna potwierdziła także występowanie N-końcowej domeny, dzięki której IDA kierowana jest do przestrzeni międzykomórkowej. Podczas sztucznej aktywacji AZ kwiatów łubinu żółtego dochodzi do stopniowej akumulacji transkryptu *LIIDL*. Co więcej, w naturalnie aktywnej AZ jest ponad dziesięć razy więcej mRNA genu *LIIDL* niż w nieaktywnej strefie (**publikacja 4.2.1.**). Wyniki te wskazują, że **gen *LIIDL* jest zaangażowany w funkcjonowanie AZ, zarówno na wczesnych, jak i późnych etapach jej aktywacji.**

Analiza qPCR jest sposobem na weryfikację aktywności genów, jednak ustalenie na tej podstawie czy kodowane przez nie produkty białkowe biorą udział w regulacji badanego procesu pozostaje hipotetyczne. Zastosowanie inżynierii genetycznej pozwoliłoby na uzyskanie pełniejszych informacji, jednak trudności metodyczne upraw łubinu w warunkach *in vitro* uniemożliwiają otrzymanie roślin transgeniczných. Dlatego aby kontynuować badania nad udziałem *LIIDL* w separacji kwiatów do analiz zastosowano syntetyczny peptyd EPIP (**publikacja 4.2.1.**). Jego wybór podyktowany był faktem, że ma on kluczowe znaczenie dla aktywności IDA (Stenvik i in., 2008). Jak wykazały eksperymenty fizjologiczne, **egzogenny**

EPIP aplikowany na nieaktywną AZ zwiększa stopień aborcji kwiatów łubinu, co wskazuje, że ten krótki fragment LIIDL jest wystarczający do zapoczątkowania odcinania (publikacja 4.2.1.).

Inicjowane na poziomie molekularnym przemiany zachodzące w AZ wymagają skoordynowanego działania wielu czynników endogennych, w tym fitohormonów. Do najważniejszych hormonalnych stymulatorów odcinania kwiatów u łubinu żółtego należą ET i ABA (Frankowski i in., 2017; Wilmowicz i in., 2016). Wyniki wcześniejszych analiz wykonanych u innych gatunków roślin sugerują, że mogą funkcjonować dwa szlaki odcinania: zależny i niezależny od ET (Meir i in., 2019). U *A. thaliana* separacja organów w szlaku aktywowanym przez IDA odbywa się niezależnie od ET, a także od ABA (Butenko i in., 2006; Patterson i Bleeker, 2004; Patharkar i Walker, 2016). Natomiast u *S. lycopersicum* ET jest niezbędny do przeprowadzenia tego procesu (Lanahan i in., 1994; Payton i in., 1996). Fitohormon ten stymuluje ekspresję homologa *IDA* (*LcIDL1*) u liczi chińskiego (*Litchi chinensis*) (Ying i in., 2016). Wyniki badań opublikowanych w pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego wskazują, że u łubinu ***LIIDL*, z uwagi na zróżnicowaną wrażliwość na ET i ABA, funkcjonuje w szlaku zależnym od fitohormonów (publikacja 4.2.1.)**. Etylen podnosi aktywność transkrypcyjną tego genu w 8, 16 i 24 h po aplikacji, podczas gdy ABA wywołuje taki efekt w pierwszych godzinach po traktowaniu. Chociaż odpowiedź na ET jest późniejsza niż na ABA, to pierwszy z nich działa silniej. Może to oznaczać, że tak jak wcześniej sugerowano, ABA działa pośrednio przez ET stymulując szlak jego biosyntezy (Wilmowicz i in., 2016).

Indukowana stresem suszy aktywacja strefy odcinania

Jednym z najbardziej destrukcyjnych czynników abiotycznych mogących aktywować AZ jest deficyt wody w glebie (Agusti i in., 2012; Patharkar i Walker, 2016). U łubinu żółtego stresor ten zmniejsza ilość, powierzchnię i wilgotność wytworzonych liści. Istotnie zmienia poziom makroelementów (Fe, Zn, Cu, S, K, Na) oraz zaburza aktywność fotosyntetyczną. Susza glebowa negatywnie wpływa także na wilgotność AZ, a na poziomie komórkowym powoduje w niej przemiany przypominające te, które występują w naturalnie aktywnej strukturze (publikacja 4.2.4.). Utrata integralności i przerwanie ciągłości tkanek prowadzą do odcięcia kwiatów, a stopień ich aborcji jest wyższy o 30% w porównaniu do kontroli. Separacja organów jest jednym z elementów mechanizmu obronnego roślin regulowanego m.in. przez geny odpowiedzialne za aktywację AZ. U *A. thaliana* deficyt wody podnosi ekspresję *IDA*, *HAE* *MPK4/5* w AZ liści i w konsekwencji prowadzi do ich odcinania (Patharkar i Walker, 2016). W wykonanych przeze mnie analizach stres suszy glebowej silnie stymulował aktywność genu *LIIDL*, uznanego wcześniej za kluczowy w procesie odcinania kwiatów. Co więcej, stresor ten podnosił poziom mRNA nowo zidentyfikowanego genu *LIHSL*. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej *LIHSL* uzyskanej na podstawie sekwencji nukleotydowej wskazuje, że cDNA *LIHSL* koduje serynowo-treoninową kinazę receptorową zlokalizowaną w błonie komórkowej. W jej obrębie występuje bogaty w powtórzenia leucynowe motyw LRR-RLK (ang. *RECEPTOR-LIKE KINASE PROTEINS WITH LEUCINE-RICH REPEAT*) (publikacja 4.2.4.), który warunkuje oddziaływania typu białko-białko, które są istotne dla jego interakcji z ligandem (Stenvik i in., 2008). Zakładając, że u łubinu żółtego kompleks *LIIDL-LIHSL* uruchamia szlak prowadzący do odcinania kwiatów, powinien on aktywować kinazę MAP. W wyniku analiz transkryptomicznych przeprowadzonych w ramach wieloletniego programu białkowego (2011-2015, załącznik 4a, punkt 3.1.) wyselekcjonowano *LIMPK6*, który ulegał różnicowej ekspresji w naturalnie aktywnej i nieaktywnej AZ. Kontynuacja tych badań wykazała, że susza glebowa silnie stymuluje ekspresję *LIMPK6* w AZ kwiatów. Dodatkowe analizy immunocytochemiczne potwierdziły, że ten czynnik stresowy prowadzi do akumulacji kinazy MPK6 w komórkach AZ oraz wiązkach przewodzących szypułki. Uzyskane dane wskazują, że **zidentyfikowane geny *LIIDL*, *LIHSL* i *LIMPK6* mogą kodować kolejne elementy szlaku regulującego czas**

separacji kwiatów u łubinu (publikacja 4.2.4.) i jednocześnie potwierdzać funkcjonowanie mechanizmu uznawanego za konserwatywny w królestwie roślin (Butenko i in., 2003, 2006).

Jak wykazano w **publikacji 4.2.3.** wczesnym etapom aktywacji odcinania oraz naturalnej separacji kwiatów łubinu żółtego towarzyszy stan stresu oksydacyjnego przejawiający się intensywną akumulacją ROS w obszarze AZ. Mogą one brać udział w przekształceniach struktury ścian komórkowych, kluczowych dla przeprowadzenia separacji organu. Z jednej strony ROS uczestniczą we wzmacnianiu i stabilizacji, jednak z drugiej strony prowadzą do jej rozluźnienia (Wojtaszek i in., 2012). W odpowiedzi na czynniki stresowe, ROS są intensywniej akumulowane, a zjawisko to określane jest terminem „wybuchu oksydacyjnego” (ang. *oxidative burst*). Wykazano, że **indukowanemu stresem suszy odcinaniu kwiatów łubinu towarzyszą istotne modyfikacje gospodarki redoks w komórkach AZ, czego przejawem był wzrost poziomu H_2O_2 i w konsekwencji wzmocniona aktywność katalazy odpowiedzialnej za dysmutację tego związku (publikacja 4.2.4.)**. Należy zaznaczyć, że CAT nagromadzona była specyficznie nie tylko w obszarze AZ, ale także elementach wiązek przewodzących szypułki.

Jedną z najwcześniejszych odpowiedzi roślin na zmiany potencjału osmotycznego komórek, wywołane np. stresem suszy, jest wzrost poziomu endogennego ABA (Audran i in., 1998; Thompson i in., 2000). Może on być wynikiem wzmocnionej aktywności transkrypcyjnej genów kodujących enzymy zaangażowane w jego biosyntezę, m.in. *ZEP* (epoksydaza zeaksantyny, ang. *zeaxanthin epoxidase*). Sekwencję kodującą *ZEP* zidentyfikowano u łubinu żółtego i wykazano, że **wzrastającej aktywności transkrypcyjnej *LIZEP* w AZ kwiatów uprawianych w warunkach niedoboru wody towarzyszył niemal trzykrotnie wyższy poziom ABA**, czego dowiodły wyniki analiz chromatograficznych. Co więcej, przeprowadzone reakcje immunolokalizacji potwierdziły, że fitohormon ten jest silnie akumulowany w cytozolu komórek AZ poddanych stresowi oraz wiązkach przewodzących, podczas gdy bardzo słaby sygnał odnotowano w kontroli (**publikacja 4.2.4.**). Podobne jak podczas stresu suszy modyfikacje metabolizmu ABA obserwowano w naturalnie aktywnej AZ (Wilmowicz i in., 2016). Pozytywną korelację pomiędzy wzrastającą ekspresją *ZEP* a poziomem ABA wywołanym stresem suszy odnotowano również u *Nicotiana plumbaginifolia* i *S. lycopersicum* (Audran i in., 1998; Thompson i in., 2000).

Kontynuacją analiz dotyczących hormonalnych zmian indukowanych deficytem wody u łubinu żółtego było wykazanie pozytywnego wpływu tego czynnika na szlak biosyntezy ET (**publikacja 4.2.4.**). Wyniki analiz qPCR wykazały, że stres suszy powoduje wzrost aktywności transkrypcyjnej genu kodującego syntazę ACC (*LIACS*). Podnosi on także poziom prekursora ET - ACC, który był specyficznie lokalizowany w AZ. Towarzysząca temu wzmocniona ekspresja oksydazy ACC (*LIACO*) może sugerować, że prekursor utleniany jest do ET - głównego efektoru odcinania. Pozytywny wpływ suszy glebowej na ekspresję *ACS* i *ACO* oraz produkcję ACC i ET wykazano wcześniej u *Cleopatra mandarin* (Tudela i Primo-Millo, 1992). Jednak wyniki prezentowane w pracy wchodzącej w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego są pionierskie ze względu na zastosowany układ badawczy (**publikacja 4.2.4.**). Umożliwił on opisanie zmian zachodzących wyłącznie w AZ, a nie, jak wcześniej prezentowano u innych gatunków roślin, w całych organach wraz z szypułkami, a nawet na poziomie systemicznym (Botton i in., 2011; Nomura i in., 2013; Eccher i in., 2013). Zgodnie z pojawiającym się trendem, nie tylko ET, ale także ACC może pełnić rolę cząsteczki sygnałowej generującej odpowiedź fizjologiczną rośliny (Xu i in., 2008; Tsang i in., 2011; Tsuchisaka i in., 2009). W związku z tym istnieje inna możliwa interpretacja wyników uzyskanych w **publikacji 4.2.4.** Według niej ACC działa niezależnie od ET i bezpośrednio wywołuje reakcję na deficyt wody. **Uzyskane rezultaty dostarczyły zupełnie nowych informacji z zakresu identyfikacji potencjalnych markerów wczesnej odpowiedzi na deficyt wody w komórkach AZ**, co może być w przyszłości wykorzystane do wyselekcjonowania odmian łubinu charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na stres suszy, a tym samym wyższym współczynnikiem plonowania.

Rozmieszczenie auksyny w obszarze strefy odcinania czynnikiem determinującym czas separacji kwiatów

Pomimo wielu lat badań nad rolą auksyn w regulacji odcinania organów wciąż nie znano precyzyjnego rozmieszczenia tego fitohormonu w obszarze AZ. Ustalenie zmian lokalizacji IAA było konieczne dla opisanego jego udziału w procesach separacji. Dlatego w kolejnej pracy wchodzącej w skład niniejszego osiągnięcia naukowego po raz pierwszy monitorowano przy użyciu specyficznych przeciwciał rozmieszczenie IAA we wczesnych i późnych etapach aktywacji AZ (**publikacja 4.2.2.**). Hormon ten był akumulowany w naturalnie aktywnej AZ, podczas gdy w kontroli było go znacznie mniej. Wykazano, że gradient IAA po obu stronach sztucznie aktywowanej AZ zmieniał się w czasie, jednak wzrastał zarówno w części dystalnej, jak i proksymalnej, co zostało potwierdzone wynikami analiz ilościowych (GC-MS).

Aktywacja AZ i w konsekwencji separacja organu wymaga dynamicznych interakcji hormonalnych. Zarówno fizjologiczne, jak i molekularne analizy wskazują, że czas odcinania organów zależy od antagonistycznego działania ET i auksyn (Taylor i Whitelaw, 2001). Zahamowanie polarnego transportu auksyny lub usunięcie kwiatu stymuluje odcinanie szypułek, podczas gdy efekt ten może być odwrócony poprzez egzogeny inhibitor działania ET (Meir i in., 2010). Zaproponowano, że wrażliwość komórek AZ na ET jest związana z modyfikacją ekspresji genów regulowanych przez auksyny (Meir i in., 2010). Biorąc pod uwagę fakt, że ET jest głównym stymulatorem odcinania kwiatów łubinu żółtego (Wilmowicz i in., 2016) oraz to, że IAA może bezpośrednio regulować jego biosyntezę w wielu procesach (Frankowski i in., 2009; Wilmowicz i in., 2013), w kolejnym etapie prowadzonych przez mnie badań określono wpływ IAA na elementy szlaku powstawania ET w komórkach AZ (**publikacja 4.2.2.**). **Zaburzenie naturalnego gradientu IAA w obszarze AZ poprzez lokalną aplikację tego hormonu prowadzi do akumulacji transkryptu syntazy ACC (LIACS), nagromadzenia prekursora ET oraz wzmożonej ekspresji oksydazy ACC (LIACO).** Kontynuacją badań było sprawdzenie wpływu ET na lokalizację IAA. W komórkach AZ roślin traktowanych ET dochodziło do akumulacji auksyny początkowo w okrągłych przedziałach komórkowych w cytozolu, a następnie wewnątrz wiązek przewodzących. **Może to sugerować, że ET moduluje transport auksyn (publikacja 4.2.2.).** Ten gazowy fitohormon reguluje u pomidora ekspresję *PINI* podczas odcinania owoców (Shi i in., 2017). Z drugiej strony, Jin i in. (2015) wykazali, że auksyna działa niezależnie od ET w procesie separacji liści *Populus*, co wskazuje, że mechanizm może być specyficzny gatunkowo. Model zaproponowany dla odcinania owoców mango indyjskiego (*Mangifera indica*) zakłada, że ET hamuje polarny transport IAA, a jego działanie prowadzi do obniżenia zawartości cukrów w owocu, skutkiem czego jest separacja (Hagemann i in., 2015).

Z uwagi na fakt, że AZ nie jest jednolitą strukturą, a w jej obrębie mogą zachodzić zróżnicowane przestrzennie zmiany oraz analizując wyniki naszych wcześniejszych doświadczeń wskazujących, że kluczową rolę w indukcji odcinania pełni rozmieszczenie IAA w różnych częściach AZ, postawiono kolejne pytanie badawcze. Czy zależna od auksyn aktywacja AZ i odcinanie kwiatów u łubinu żółtego są związane ze zróżnicowanym działaniem IAA w dystalnej i proksymalnej części strefy? Aby na nie odpowiedzieć zastosowano inhibitor polarnego transportu auksyny – TIBA (**publikacja 4.2.5.**). W doświadczeniu fizjologicznym jego bezpośrednia aplikacja na nieaktywną AZ kwiatów powodowała charakterystyczne wygięcie pędu. Z kolei na poziomie komórkowym związek ten wywoływał specyficzne zmiany strukturalne podobne do tych, obserwowanych w aktywnej strefie, a było to wynikiem zróżnicowanego rozmieszczenia auksyny po obu jej stronach, co potwierdzono analizami immunolokalizacji i GC-MS. Bezpośrednią konsekwencją obserwowanych zmian było nadmierne odcinanie kwiatów. **Zahamowanie polarnego transportu auksyn przez TIBA powodowało molekularne i biochemiczne modyfikacje, które były zróżnicowane i specyficzne po obu stronach strefy.** Obniżenie

poziomu IAA w części dystalnej podnosi aktywność transkrypcyjną genów kodujących kolejne elementy szlaku molekularnego indukującego odcinanie kwiatów (*LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*). Z kolei nagromadzenie IAA w proksymalnym rejonie strefy zaburza homeostazę redoks oraz modyfikuje metabolizm hormonalnych stymulatorów odcinania kwiatów – ABA i ET. Podniesienie poziomu H_2O_2 w proksymalnej części AZ uruchamia mechanizmy unieczynniania ROS, których przejawem jest akumulacja CAT oraz peroksydazy askorbinianowej (APX, ang. *ascorbate peroxidase*). Należy zaznaczyć, że indukcji AZ przez aplikację TIBA towarzyszy znaczny wzrost aktywności obu enzymów, a także Cu/Zn-SOD i Mn-SOD w rejonie proksymalnym. Jednocześnie dochodzi w tym obszarze do wzrostu ekspresji genu *LIZEP*, nagromadzenia ABA, podniesienia aktywności transkrypcyjnej *LIACS* i poziomu prekursora ET oraz akumulacji mRNA genu *LIACO* (**publikacja 4.2.5.**). Reasumując, **zróznicowana przestrzennie indukcja szlaku molekularnego oraz tego związanego z biosyntezą fitohormonów stresowych i generowanie stanu stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na zahamowanie polarnego transportu są sygnałem dla rośliny o inicjowaniu procesów aktywacji AZ.**

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań opisywanych w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego dostarczyły zupełnie nowych informacji z zakresu hormonalnej i molekularnej kontroli szlaku indukującego odcinanie kwiatów u łubinu - rośliny o wysokim potencjale agronomicznym dla Polski oraz krajów basenu Morza Śródziemnego. Poniżej wyszczególniono najistotniejsze osiągnięcia prezentowanych badań.

- Zarówno we wczesnych, jak i późnych etapach aktywacji strefy odcinania dochodzi do akumulacji transkryptu nowo zidentyfikowanego homologa genu *IDA* (*LIIDL*), który funkcjonuje w szlaku zależnym od hormonalnych stymulatorów separacji – ABA i ET.
- Aplikacja syntetycznego peptydu EPIP uzyskanego na podstawie przewidywanej sekwencji aminokwasowej *LIIDL* aktywuje strefę odcinania kwiatów i zwiększa stopień ich aborcji.
- Poszczególne fazy funkcjonowania strefy odcinania związane są ze specyficznym, czasowym i przestrzennym rozmieszczeniem transkryptu *LIBOP*. Proces ten jest skorelowany z wysoką aktywnością metaboliczną komórek AZ przejawiającą się akumulacją nowych transkryptów oraz pojawieniem się maszynerii splicingowej.
- Deficyt wody aktywuje strefę odcinania. Podnosi on poziom mRNA nowo zidentyfikowanych genów kodujących kolejne elementy molekularnego szlaku inicjującego odcinanie kwiatów (*LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*). Stres suszy stymuluje ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę ABA (*LIZEP*) i ET (*LIACS*, *LIACO*). Ograniczona dostępność wody prowadzi również do akumulacji ABA oraz ACC w strefie odcinania. Towarzyszy temu stan stresu oksydacyjnego, czego przejawem jest nagromadzenie nadtlenu wodoru oraz wzrastająca aktywność katalazy zlokalizowanej specyficznie w strefie odcinania.
- Włączanie mechanizmów separacji kwiatów wymaga zmian w gradiencie IAA poniżej i powyżej strefy odcinania. Fitohormon ten wpływa na poziom mRNA genów kluczowych dla biosyntezy ET oraz lokalizację jego prekursora, nieuchronnie prowadząc do odrzucenia kwiatu. Jednak z drugiej strony ET moduluje rozmieszczenie auksyny w całym obszarze AZ i tkankach do niej przyległych.
- Zahamowanie polarnego transportu auksyny prowadzi do asymetrycznego rozmieszczenia tego hormonu po obu stronach strefy odcinania, powodując jej aktywację i odrzucenie kwiatu. Obniżony poziom auksyny w części dystalnej podnosi aktywność transkrypcyjną genów kodujących kolejne elementy molekularnego szlaku odpowiadającego za funkcjonowanie strefy odcinania (*LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*). Z kolei fitohormon ten nagromadzony w części proksymalnej zaburza homeostazę redoks: stymuluje aktywność SOD, prowadzi do akumulacji nadtlenu wodoru, zmienia lokalizację i podnosi aktywność katalazy oraz peroksydazy askorbinianowej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Poza pięcioma eksperymentalnymi publikacjami stanowiącymi osiągnięcie naukowe jestem również współautorką 28 prac: 15 oryginalnych oraz 2 publikacji o charakterze przeglądowym opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu impact factor i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), a także 1 oryginalnej oraz 10 artykułów przeglądowych opublikowanych w czasopismach, które nie są ujęte w bazie JCR. Jestem współautorką rozdziału w monografii o tytule *Japanese morning glory* pod patronatem wydawnictwa Springer-Verlag, która ma się ukazać w 2020 r. Obecnie przygotowuję także dwa rozdziały do monografii zatytułowanej *Ethylene in Plant Biology* pod patronatem wydawnictwa Wiley, United Kingdom. W jednym z nich jestem pierwszym, a w kolejnym drugim autorem. Pełny wykaz prac znajduje się w załączniku 4a do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

5.1. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora.

Jako studentka studiów magisterskich rozpoczęłam badania nad udziałem hormonów roślinnych w regulacji fotoperiodycznej indukcji kwitnienia u modelowej rośliny dnia krótkiego *Ipomoea nil* (synonim *Pharbitis nil*, wilec wielkokwiatowy). Odbiór bodźca fotoperiodycznego przez jej liście inicjuje kaskadę zdarzeń prowadzących do zmiany wzorca rozwojowego wierzchołka wzrostu pędu z wegetatywnego na generatywny (Kopcewicz i in., 2012). Wyniki wieloletnich badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Pana prof. dr. hab. Jana Kopcewicza wykazały, że najsilniejszym inhibitorem kwitnienia *I. nil* jest ET. Jednak proces indukcji generatywnej zależy także od pozostałych hormonów roślinnych, m.in. auksyn, jasmonianów, ABA i giberelin, które bardzo często wchodzi z sobą w interakcje (Kęsy i in., 2008, 2011; Frankowski i in., 2009; Wilmowicz i in., 2011).

Podczas studiów magisterskich zdobyłam umiejętność pracy z materiałem roślinnym oraz wiedzę z zakresu technik molekularnych, a także analizy jakościowej i ilościowej hormonów roślinnych. Dzięki temu mogłam kontynuować badania na *I. nil*, które prowadzone były przez kilka kolejnych lat podczas trwania moich studiów doktoranckich i dotyczyły one nie tylko samej indukcji kwitnienia, ale także procesów związanych ze starzeniem się tej rośliny. Stało się to również możliwe dzięki uzyskaniu dodatkowego finansowania w ramach indywidualnego grantu przyznanego w 2014 r. przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UMK, pt. „Analiza ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm kwasu jasmonowego (*InJMT*, *InJAR*) oraz opracowanie metody oznaczania JA-Ile – aktywnego biologicznie koniugatu u wilca wielkokwiatowego (*Ipomoea nil*)”. Otrzymane przeze mnie w latach 2009-2018 wyniki badań zostały opublikowane w 7 pracach eksperymentalnych. Wśród wielu uzyskanych rezultatów najistotniejsze dla opisu mechanizmów regulujących indukcję kwitnienia było zidentyfikowanie genów *PnACO1* i *PnACO3* kodujących oksydazy ACC zaangażowane w biosyntezę ET i wykazanie, że ich aktywność transkrypcyjna jest regulowana przez auksynę, a w przypadku *PnACO1* zależy także od światła (Frankowski i in., 2013, Wilmowicz i in., 2014). W kolejnym etapie stwierdzono, że podobnie jak auksyna, także ABA hamuje kwitnienie *I. nil* stymulując ekspresję genów związanych z biosyntezą ET (Frankowski i in., 2014). Auksyna może również modulować metabolizm jasmonianów podnosząc poziom aktywności transkrypcyjnej genu *InJMT* kodującego metylotransferazę katalizującą przekształcenie kwasu jasmonowego (JA, ang. *jasmonic acid*) w ester metylowy (MeJA, ang. *jasmonic acid methyl ester*), prowadząc do akumulacji MeJA, który jest inhibitorem kwitnienia (Kućko i in., 2017). Kontynuacją badań dotyczących identyfikacji zależnych od fitohormonów szlaków indukcji rozwoju generatywnego *I. nil* było wykazanie, że fotoperiod oraz ET regulują poziom mRNA genu *InEKO1* (ang. *ent-kaurene oxidase*)

zaangażowanego w biosyntezę giberelin, których poziom spada podczas tego procesu (Marciniak i in., 2017, 2018).

Kolejnym z nurtów pobocznych prowadzonych przeze mnie badań były analizy dotyczące udziału jasmonianów w procesie starzenia roślin. Przez wiele lat uznawano, że aktywną biologicznie cząsteczką jest JA. Z czasem okazało się, że także jego koniugaty, uważane do tej pory jedynie za formę magazynową, w wielu testach biologicznych wykazują wyższą aktywność niż wolny JA (Yan i in., 2016; Schuman i in., 2018). Efektem prowadzonych badań dotyczących udziału jasmonianów w regulacji starzenia *I. nil* było stwierdzenie, że w stymulowanym ciemnością starzeniu liści dochodzi do wzrostu ekspresji *InJMT* oraz akumulacji MeJA i obniżenia zawartości JA (Wilmowicz i in., 2016a). Uzyskane wyniki wskazują na wyższą aktywność metaboliczną metylowej pochodnej JA w regulacji badanego procesu. Kontynuacją analiz związanych z zależnymi od jasmonianów reakcjami *I. nil* było zbadanie ich udziału w odpowiedzi na zranienie tkanki. Udowodniono, że uszkodzenie mechaniczne aktywuje ekspresję genu kodującego oksydazę tlenu allenowego (*InAOS*, ang. *allene oxide synthase*), który jest kluczowy w szlaku biosyntezy jasmonianów. Towarzyszy temu znaczny wzrost poziomu tych fitohormonów (Wilmowicz i in., 2016b).

Moje dalsze badania skupiały się na gatunkach uprawnych, a tematykę związaną z jasmonianami i reakcją roślin na mechaniczne uszkodzenie tkanek kontynuowałam uczestnicząc w analizach prowadzonych na cebulowej roślinie ozdobnej – *Hippeastrum*. Chorobą wywołaną przez *Phoma narcissi* jest czerwona plamistość płatków kwiatów, która obniża atrakcyjność roślin i stanowi w przemyśle kwaciarskim poważny problem ekonomiczny. Wyniki badań prowadzonych w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach, w których współuczestniczyłam podczas realizacji projektu wykazały, że uszkodzenie mechaniczne cebul wywołuje powstawanie związku o właściwościach podobnych do fitoaleksyn. Podnosi on odporność *Hippeastrum* na infekcję grzybową. Celem badań było sprawdzenie czy jasmoniany są elementem szlaku transdukcji sygnału prowadzącego do powstawania fitoaleksyn. Wykazano, że zranienie skutkuje nagromadzeniem JA, którego poziom sukcesywnie maleje na rzecz akumulacji MeJA. Zahamowanie biosyntezy jasmonianów obniża zdolność cebul do wytwarzania indukującego odporność barwnika, co wskazuje, że fitohormony te są elementem mechanizmu obronnego *Hippeastrum* uruchamianego w odpowiedzi na stres (Wilmowicz i in., 2014).

Choć moje zainteresowania naukowe poprzedzające uzyskanie stopnia doktora skupione były wokół kilku nurtów badawczych, pierwszy i najważniejszy z punktu widzenia realizacji założeń dysertacji doktorskiej dotyczył charakterystyki strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego oraz udziału ABA i ET w separacji tych organów. Zgłębienie tego zagadnienia możliwe było dzięki finansowaniu uzyskanemu w ramach programu wieloletniego Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (pt. „Fizjologiczna i genetyczna kontrola rozwoju kwiatów i owoców u roślin strączkowych” – 2011 r. - 2015 r.). Początkowo prace badawcze wykonywałam w ramach umowy o dzieło (1.10.2011 r. - 1.10.2012 r.), a przez kolejne 5 lat jako uczestnik studiów doktoranckich. Rozpoczynając pracę na nowych gatunkach roślin i mając w planach wykonywanie szczegółowych analiz molekularnych związanych z ich rozwojem generatywnym, kluczową kwestią była optymalizacja uprawy. Dlatego w pierwszym etapie określono wpływ rodzaju materiału glebowego i warunków upraw fitotronowych na rozwój generatywny trzech gatunków łubinu (biały, żółty, wąskolistny) najczęściej uprawianych w polskim rolnictwie, a uzyskane wyniki opublikowano w pracy Frankowskiego i in. (2014). Kontynuacja pracy doktorskiej była możliwa dzięki pozyskaniu nowych funduszy pochodzących z kilku źródeł finansowania, w tym grantu ufundowanego przez hiszpańskie konsorcjum eidA3-ceiA3 (The International Agrifood Doctorate School, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario) (01.10.2013 r. - 31.03.2014 r.), indywidualnego grantu Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK, pt. „Hormonalna kontrola odcinania organów generatywnych u łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)” (2015 r.) oraz kolejnej edycji wieloletniego programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi („Identyfikacja genów warunkujących zawartość alkaloidów oraz zawiązywanie i

utrzymywanie organów generatywnych u łubinów” – 2015 r. – 2017 r.) (załącznik 4a, punkt 3). W 2013 r. dzięki wygraniu konkursu międzynarodowego wyjechałam na półroczny staż do laboratorium zagranicznego kierowanego przez dr. Juande Dios Alche Ramireza (późniejszego kopromotora mojej pracy doktorskiej). Poznałam tam nowoczesne techniki z zakresu biochemii i mikroskopii, co poszerzyło mój warsztat badawczy. Badania zespołu naukowego, do którego należałam w Polsce, mogły być wówczas realizowane według nowszego podejścia eksperymentalnego. Dzięki temu skierowaliśmy uwagę na rodzące się w tym czasie na świecie zainteresowanie przemianami związanymi z separacją organów, a zachodzącymi bezpośrednio w strefie odcinania. Do najważniejszych osiągnięć należy m.in. określenie czasu oraz miejsca powstawania AZ kwiatów łubinu żółtego (Frankowski i in., 2015b). Jednym z założeń realizacji pracy doktorskiej była identyfikacja genu *LIBOP* zaangażowanego w powstawanie AZ łubinu (Frankowski i in., 2015a). Co więcej, stwierdzono, że nadmierne i przedwczesne odcinanie kwiatów łubinu jest kontrolowane przez fitohormony, w tym ABA i ET. Są one stymulatorami odcinania kwiatów. ABA współdziała z ET pozytywnie regulując ekspresję genów syntazy i oksydazy ACC oraz podnosząc poziom jego prekursora w komórkach AZ (Wilmowicz i in., 2016).

Mając na względzie chęć poszerzenia własnego warsztatu badawczego o metody z zakresu inżynierii genetycznej, po powrocie ze stażu w Hiszpanii, aplikowałam o grant do Fundacji Kościuszkowskiej. Celem projektu było opisanie przemian związanych z gospodarką lipidową, zachodzących podczas odcinania kwiatów łubinu, ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki genu kodującego lipooksygenazę (*LOX*), jeden z enzymów zaangażowanych w biosyntezę jasmonianów. Wszystkie prace miały być przeprowadzone w laboratorium prof. Christopha Benninga z Uniwersytetu w Michigan, które słynie z badań dotyczących lipidów. Na podstawie zaproponowanej koncepcji eksperymentów uzyskałam pisemną zgodę kierownika laboratorium na odbycie stypendium. Zgodnie z planem badań chciałam stworzyć rośliny *Arabidopsis* charakteryzujące się nadekspresją genu *LOX* przeniesionego z łubinu, a następnie wykonać szczegółową analizę fenotypową pod kątem odcinania organów oraz porównać przemiany w składzie lipidowym u transformantów i roślin typu dzikiego. Projekt został zakwalifikowany do przedostatniego etapu, którym była rozmowa z Komitetem Fundacji.

W tym samym czasie uczestniczyłam w badaniach dotyczących drugiego, obok odcinania kwiatów, procesu determinującego plonowanie łubinu żółtego – wiązania azotu atmosferycznego. Efektem tych analiz było stwierdzenie, że formowanie i prawidłowe funkcjonowanie brodawek korzeniowych jest skorelowane ze zmieniającą się aktywnością transkrypcyjną genów *LIBOP* i *LILb1* (ang. *leghemoglobin*). Drugi z nich koduje leghemoglobinę, która umożliwia utrzymanie odpowiedniego ciśnienia parcjalnego tlenu niezbędnego dla aktywności nitrogenazy i wydajnego wiązania N₂. Wyniki dotyczące tego zagadnienia zostały zawarte w pracy Frankowski i in. (2015a).

Prowadzenie opisanych powyżej, wielowątkowych badań wymagało dobrego przygotowania merytorycznego i dokonania wnikliwej analizy danych literaturowych. Pozwoliła ona na sformułowanie weryfikowalnych hipotez oraz zaprojektowanie odpowiednich układów doświadczalnych, które gwarantowały rzetelne przeprowadzenie eksperymentów. Dlatego w ciągu kilku lat działalności naukowej powstał szereg prac przeglądowych podsumowujących najnowsze wyniki badań z zakresu hormonalnej i molekularnej kontroli procesów ontogenetycznych roślin. Podejmowana tematyka związana była z jasmonianami (Wilmowicz i in., 2012a, b), ABA (Frankowski i in., 2013), auksynami (Kućko i in., 2014), odcinaniem organów (Wilmowicz i in., 2014, 2017a), szlakami przekazywania sygnałów hormonalnych i ich interakcjami (Marciniak i in., 2013), udziałem hormonów w regulacji poszczególnych etapów rozwoju roślin (Marciniak i in., 2014; Wilmowicz i in., 2016), nodulacją (Wilmowicz i in., 2017b) oraz mechanizmami obronnymi roślin (Wilmowicz i in., 2017c). Opublikowane artykuły stanowią źródło wiedzy zarówno dla studentów uczestniczących w zajęciach realizowanych w katedrze oraz tych, bezpośrednio zaangażowanych w prace laboratoryjne, co jest niezwykle istotne w kontekście działalności uniwersytetu jako jednostki dydaktycznej. Studenci, będąc współautorami prac

przeglądowych naszego zespołu badawczego, nabyli praktyczną umiejętność pisanie tekstów naukowych.

5.2. Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Uzyskane podczas studiów doktoranckich wyniki były pierwszymi dotyczącymi łubinu żółtego w kontekście odcinania kwiatów. Pozwoliły one na nakreślenie nowych planów naukowych na kilka kolejnych lat, a ich realizację rozpoczęłam tuż po obronie dysertacji (wolontariat w projekcie finansowanym przez MRiRW). Przeprowadzone z moim udziałem analizy przyczyniły się do pogłębienia elementarnej wiedzy z zakresu biologii łubinu i ewolucyjnego zachowania mechanizmów regulujących odcinanie organów. Wyniki tych badań wchodziły w skład prac eksperymentalnych zgłaszanych w niniejszym osiągnięciu naukowym (załącznik 4a, punkt 1). W tym samym czasie uczestniczyłam w realizacji jednego z pobocznych zadań programu wieloletniego MRiRW, którego efektem było wykazanie, że kwas giberelinowy (GA_3) stymuluje odcinanie kwiatów. Pozytywne działanie GA_3 na procesy separacji związane jest z jego wpływem na szlak biosyntezy ET, jednak zachodzi niezależnie od ABA. Wyniki opublikowano w pracy Marciniak i in. (2018).

Zapoczątkowane na studiach zainteresowanie hormonalną kontrolą rozwoju generatywnego *I. nil* zaowocowało współautorstwem rozdziału „*Phytohormones as key mediators of flower induction in Ipomoea nil – physiological and molecular aspects*” w monografii o tytule „*Japanese morning glory*”, która jest przygotowywana pod patronatem wydawnictwa Springer-Verlag. Dodatkowo, ukazała się monografia podsumowująca udział ABA w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia tego gatunku (Florkiewicz i in., 2018).

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałam zatrudniona (umowa na zastępstwo) w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego. Kontynuując badania nad hormonalną i molekularną kontrolą odrzucania kwiatów łubinu żółtego, równolegle zajmowałam się wyjaśnieniem zagadnienia dotyczącego wykorzystania antagonistycznego działania herbicydów w regulacji akumulacji skrobi i lipidów u modelowej rośliny wodnej rzęsy drobnej (*Lemna minor* L.). Gatunek ten służy jako indykator w analizach dotyczących oceny jakości wody, toksyczności ścieków komunalnych oraz przemysłowych. O przydatności rzęsy drobnej w badaniach aplikacyjnych świadczą opracowane specjalnie dla niej normy ISO, które zawierają dokładne wytyczne i standardy testów prowadzonych w celu oszacowania stopnia zanieczyszczenia środowiska. Moje eksperymenty prowadziłam zgodnie z normą ISO 20079:2005. Prace doświadczałne realizowałam przy wsparciu finansowym Uniwersytetu Gdańskiego, na którym w 2018 r. zostałam stypendystką indywidualnego grantu przeznaczonego na badania naukowe służące rozwojowi młodych naukowców. Kluczowym celem projektu było sprawdzenie zależności pomiędzy kombinacją mieszanin stosowanych najczęściej w polskim rolnictwie herbicydów (chlorydazon - CHD i kwas 4-chloro-o-toliloksyoctowy - MCPA) zanieczyszczających ekosystemy wodne, a poziomem przemysłowo istotnych związków - lipidów i skrobi u *L. minor*. Oznaczając liczbę członów pędowych, świeżą i suchą masę, wykazałam wpływ obu badanych herbicydów na rozwój roślin. Stosując metody mikroskopowe opisałam zmiany zachodzące na poziomie komórkowym w członach pędowych. Intersujące działanie wykazał CHD, który silnie stymulował wzrost wydłużeniowy korzeni. Stan fizjologiczny roślin określiłam na podstawie zmian w zawartości barwników fotosyntetycznych (chlorofil a/b, karotenoidy). Pomiary poziomu skrobi oraz glukozy umożliwiły wykazanie w jaki sposób herbicydy modyfikują gospodarkę węglowodanową roślin. Ponadto zbadałam lokalizację lipooksygenazy – jednego z enzymów modulujących biosyntezę lipidów i stwierdziłam jej akumulację w tkankach poddanych jednoczesnemu działaniu toksykantów. Efekt ten może być wykorzystany przy poszukiwaniu markerów umożliwiających stwierdzenie występowania herbicydów w środowisku. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że współdziałanie CHD i MCPA ma charakter antagonistyczny, a reakcja roślin wywoływana badanymi związkami jest zarówno czasowo, jak i tkankowo specyficzna. Uzyskane rezultaty były prezentowane w 2019

r. na konferencji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie i są przygotowane do opublikowania.

W listopadzie 2018 r. podjęłam zatrudnienie jako asystent naukowy (post-doc) w Katedrze Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w ramach projektu zatytułowanego „Analiza roli białek ARGONAUTE w po-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów w kiełkujących nasionach *Arabidopsis thaliana*”, który jest finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Podyktowane to było chęcią doskonalenia warsztatu badawczego i rozszerzenia umiejętności eksperymentalnych o analizy prowadzone na roślinie modelowej w badaniach genetycznych. Realizując powierzone mi zadania nabywam zdolności z zakresu pracy na roślinach transgenicznym, a także zgłębiam wiedzę na temat mechanizmów ustępowania spoczynku, mających kluczowe znaczenie dla poprawy zdolności kiełkowania, także roślin uprawnych.

Kiełkowanie jest ściśle kontrolowane przez działające antagonistycznie fitohormony - ABA i GA oraz ROS, które funkcjonują jako stymulatory tego procesu (Fath i in., 2001; Liu i in., 2009; Leymarie i in., 2012). Także czynniki środowiskowe, takie jak światło, istotnie wpływają na inicjację kiełkowania (Penfield i in., 2005). Wychodzenie nasion ze stanu spoczynku wymaga syntezy wielu białek, których poziom jest modulowany wskutek włączania mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji genów. Jednym z nich jest wyciszenie ekspresji za pośrednictwem miRNA, które są elementami kompleksów składających się, m.in. z białek ARGONAUTE (AGO) (Borges i Martienssen, 2015). Pomimo poczynionego w ostatnich latach postępu nad ich udziałem w regulacji wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin, wciąż nie ma żadnych informacji dotyczących roli AGO w przemianach towarzyszących kiełkowaniu nasion. U *A. thaliana* występuje 10 białek należących do tej rodziny i jak wykazaliśmy do tej pory, kilka z nich są zaangażowane w zależne od światła ustępowanie spoczynku. Obecnie finalizuję prace mające na celu stworzenie roślin charakteryzujących się nadekspresją wybranych genów kodujących badane przez nas białka, oznaczam aktywność ich promotorów w utworzonych już transformantach oraz analizuję przemiany związane z gospodarką redoks i uruchamianiem systemów antyoksydacyjnych w nasionach roślin typu dzikiego oraz tych, wytworzonych przez rośliny modyfikowane genetycznie. Uzyskane dotychczas wyniki badań prezentowane były w formie komunikatów ustnych na 14. konferencji Plant Oxygen Group w Monachium oraz 17. Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin w Toruniu. Aktualnie są one uzupełniane i w niedługim czasie zostaną przygotowane do publikacji.

Otrzymane w latach 2011-2014 wyniki badań nad rozwojem i funkcjonowaniem brodawek korzeniowych łubinu żółtego, opublikowane w pracy Frankowski i in. (2015a), stały się podstawą do podjęcia dalszych analiz, które były kontynuowane w ramach współpracy z zespołem naukowym z UMK w Toruniu. Określono wpływ suszy glebowej na hormonalne przemiany zachodzące w brodawkach korzeniowych oraz ich zdolność do wiązania azotu atmosferycznego. Wykazano, że deficyt wody w glebie zmniejsza ilość wytworzonych brodawek korzeniowych i prowadzi do istotnych zmian histologicznych wskazujących na postępującą degradację symbiosomów. W brodawkach indukowane są szlaki biosyntezy ABA i ET. Dochodzi w nich także do obniżenia ekspresji genów *LIBOP* i *LILBI* zaangażowanych w funkcjonowanie brodawek korzeniowych. Dzięki zastosowaniu techniki atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES) wykazano, że w następstwie działania suszy glebowej spada poziom żelaza i azotu, co sugeruje poważne zaburzenia w funkcjonowaniu symbiosomów. Uzyskane wyniki były prezentowane na konferencji Microscopy at the Frontiers of Science MFS2019: Joint Meeting of SME and SPMicros w Granadzie i opublikowane w pracy Wilmowicz i in. (2019). Stanowią one podstawę do wytypowania molekularnych i hormonalnych markerów wczesnej odpowiedzi na deficyt wody w glebie, przez co mogą być użyte do selekcji odmian łubinu charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na stres suszy, co stanowi ogromne wyzwanie współczesnego rolnictwa stojącego w obliczu narastających problemów klimatycznych.

6. Naukowe plany na przyszłość

Realną szansą na efektywne rozwiązywanie problemów naukowych i wytyczanie nowych kierunków badań jest ciągle doskonalenie warsztatu badawczego, co wymaga współpracy z naukowcami specjalizującymi się w określonych dziedzinach. Efektem długoterminowej współpracy podjętej w miejscach, w których byłam wcześniej zatrudniona (UMK w Toruniu, EEZ w Hiszpanii, UG) jest nie tylko przepływ myśli naukowej, ale także wspólne publikacje i plany. Drastycznie zmieniające się warunki klimatyczne oraz coraz częściej pojawiające się w naszym kraju długotrwałe okresy suszy wymagają szybkiego reagowania i przeciwdziałania oraz wdrożenia rozwiązań, które podniosą odporność roślin, zwłaszcza uprawnych, na ten rodzaj stresora. Zmotywowani utylitarnym znaczeniem wyjaśnienia tego zagadnienia, a także dużym zainteresowaniem wynikami naszych badań w środowisku międzynarodowym, stworzyliśmy plan badań, w który zostali wdrożeni również młodzi naukowcy. W tym zeszłoroczna stypendystka „Diamantowego Grantu” (0217/DIA/2019/48), pani Aleksandra Florkiewicz realizująca obecnie dysertację doktorską, której będę promotorem pomocniczym. Część założeń grantu będzie realizowana w ośrodku hiszpańskim. Badania te poszerzyliśmy o ustalenie zmian proteomicznych i transkryptomicznych zachodzących w brodawkach korzeniowych łubinu pod wpływem suszy glebowej oraz wykazanie zmian mikrobiomu korzeniowego. Wniosek ten powstał przy moich konsultacjach naukowych i został złożony w tegorocznej edycji konkursu „Diamantowy Grant” (ID: 473951). Poza badaniami o charakterze użytkowym, część moich zainteresowań naukowych dotyczy zagadnień podstawowych. Jestem jednym z współtwórców projektu realizowanego na UMK w Toruniu, a dotyczącego określenia wpływu peptydu EPIP na zmiany zachodzące w AZ.

Dotychczasowa współpraca z UMK w Toruniu, EEZ w Hiszpanii, UG oraz SGGW, możliwa dzięki podejmowaniu w nich zatrudnienia, nie tylko przyczyniła się do swobodnego posługiwania nowoczesnymi technikami, ale dała mi także możliwość pracy na różnym materiale roślinnym. Zdobytą wiedzę i umiejętności z zakresu inżynierii genetycznej i mechanizmów plonowania roślin planuję wykorzystać przy składaniu wniosku o finansowanie przyszłych badań.

7. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Poza pracą naukową jestem zaangażowana w działalność dydaktyczną. Dotychczas prowadziłam zajęcia ze studentami biologii i biotechnologii z przedmiotów: Fizjologia roślin; Fizjologia roślin z elementami anatomii i morfologii; Rola RNA w biologii molekularnej i biotechnologii; Uszkodzenia i naprawa DNA; Mechanizmy wzrostu i rozwoju roślin; Substancje pochodzenia roślinnego w diagnostyce medycznej. Zarówno w Gdańsku, jak i w Warszawie, sprawowałam i nadal sprawuję bezpośrednią opiekę nad studentami podczas realizacji ich prac laboratoryjnych (4 magistrantów, 2 licencjatów). Brałam także udział w konsultacjach naukowych podczas powstawania dysertacji doktorskiej pani mgr inż. Katarzyny Panek.

Zaangażowanie w działalność popularyzującą naukę przejawiałam podczas organizacji warsztatów w ramach Festiwalu Nauki i Sztuki, Ogólnopolskiej Nocy Biologów, Fascynującego Dnia Roślin, Dnia Otwartego Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, zajęć prowadzonych dla Uniwersytetu Młodych Fundacji Amicus Universitatis Nicolai Copernici, uczniów Szkoły Podstawowej nr 7 w Toruniu oraz Gimnazjum nr 1 w Chełmnie, a także uczestnicząc w przygotowaniach XLII i XLIV Ogólnopolskiej Olimpiady Biologicznej dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych oraz spotkaniach w Centrum Nowoczesności Młyn Wiedzy w Toruniu.

Do autoreferatu dołączam kserokopie dokumentów potwierdzających osiągnięcia powstałe w wyniku prowadzenia badań w więcej niż jednej jednostce naukowej. Podczas studiów doktoranckich na UMK w Toruniu nawiązałam współpracę z EEZ w Granadzie (Hiszpania), która była kontynuowana w trakcie mojego zatrudnienia na Uniwersytecie Gdańskim i trwa do dzisiaj (kserokopia dokumentu potwierdzającego odbycie stażu oraz przyznanie stypendium naukowego, pierwsze strony publikacji powstałych w wyniku realizowania badań we współpracy z tą jednostką oraz abstrakty konferencyjne). Jej owocem są także publikacje 4.2.3 i 4.2.5 wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego. Będąc doktorantką odbyłam staż w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (kserokopia dokumentu potwierdzającego odbycie stażu). Podczas zatrudnienia na UG kontynuowałam współpracę z UMK w Toruniu (kserokopia pierwszej strony publikacji powstałej w wyniku realizowania badań we współpracy z tą jednostką oraz abstrakty konferencyjne). Jej efektem są także publikacje wchodzące w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego. W trakcie zatrudnienia na SGGW kontynuuję współpracę zarówno z Katedrą Fizjologii i Biotechnologii Roślin UG, w której wykonano część analiz prezentowanych w publikacji 4.2.5., UMK w Toruniu, jak i EEZ w Granadzie.

8. Literatura

1. Roberts J.A., Whitelaw C.A., Gonzalez-Carranza Z.H., McManus M.T. (2000) Cell separation processes in plants: models, mechanisms and manipulation. *Ann. Bot.* 86: 223-235.
2. Kambal A.E. (1969) Flower drop and fruit set in field beans, *Vicia faba* L. *J. Agric. Sci.* 72: 131-138.
3. Fakir M.S.A., Mondal M.M.A., Ismal M.R., Ashrafuzzaman M. (2011) Flowering pattern and reproductive efficiency in mungbean. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 966-970.
4. Couzigou J.M., Magne K., Mondy S., Cosson V., Clements J., Ratet P. (2016) The legume *NOOT-BOP-COCH*-LIKE genes are conserved regulators of abscission, a major agronomical trait in cultivated crops. *New Phytol.* 209: 228-240.
5. Prusiński J., Borowska M. (2002) Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie. Cz. I. Zastosowanie regulatorów wzrostu w uprawie roślin strączkowych. *Hod. Rośl. Nasienn.* 2: 33-38.
6. Addicott F.T. (1982) Anatomy of abscission. W: Addicott F.T. (red.), *Abscission*, Berkeley: University of California Press.
7. Estornell L.H., Agustí J., Merelo P., Talón M., Tadeo F.R. (2013) Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* 199-200: 48-60.
8. Sexton R., Roberts J.A. (1982) Cell biology of abscission. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 133-162.
9. Niederhuth C.E., Cho S.K., Seitz K., Walker J.C. (2013) Letting Go is never easy: abscission and receptor-like protein kinases. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 1251-1263.
10. Kim S.J., Brandizzi F. (2014) The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant Cell Physiol.* 55: 687-693.
11. Cho S.K., Larue C.T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.L., Zhang S., Walker J.C. (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15629-15634.
12. Shi C.L., Stenvik G.E., Vie A.K., Bones A.M., Pautot V., Proveniers M., Aalen R.B., Butenko M.A. (2011) *Arabidopsis* class I KNOTTED-Like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway. *Plant Cell* 23: 2553-2567.
13. Butenko M.A., Patterson S.E., Grini P.E., Stenvik G.E., Amundsen S.S., Mandal A., Aalen R.B. (2003) INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell* 15: 2296-2307.
14. Stø I.M., Orr R.J.S., Fooyontphanich K., Jin X., Knutsen J.M.B., Fischer U., Tranbarger T.J., Nordal I., Aalen R.B. (2015) Conservation of the abscission signaling peptide IDA during Angiosperm evolution: Withstanding genome duplications and gain and loss of the receptors HAE/HSL2. *Front. Plant Sci.* 6: 931.
15. Stenvik G.E., Tandstad N.M., Guo Y., Shi C.L., Kristiansen W., Holmgren A., Clark S.E., Aalen R.B., Butenko M.A. (2008) The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *Plant Cell* 20: 1805-1817.
16. Butenko M.A., Shi C.L., Aalen R.B. (2012) KNAT1, KNAT2 and KNAT6 act downstream in the IDA-HAE/HSL2 signaling pathway to regulate floral organ abscission. *Plant Signal. Behav.* 7: 135-138.
17. Tranbarger T.J., Tucker M.L., Roberts J.A., Meir S. (2017) Editorial: Plant Organ Abscission: From Models to Crops. *Front. Plant Sci.* 8: 196.

18. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J. (2015a) Molecular cloning of the *BLADE-ON-PETIOLE* gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. J. Plant Physiol. 179: 35-39.
19. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J. (2015b) Profiling the *BLADE-ON-PETIOLE* gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. Acta Physiol. Plant. 37: 220.
20. Ohkuma K., Lyon J.L., Addicott F.T., Smith O.E. (1963) Abscisin II, an abscission- accelerating substance from young cotton fruit. Science 142: 1592-1593.
21. Addicott F.T., Lyon J.L., Ohkuma K., Thiessen W.E., Carns H.R., Smith O.E., Cornforth J.W., Milborrow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1968) Absciscic acid: a new name for abscisin II (dormin). Science 159: 1493.
22. del Campillo E., Bennett A.B. (1996) Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. Plant Physiol. 111: 813-820.
23. Kalaitzis P., Solomos T., Tucker M.L. (1997) Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. Plant Physiol. 113: 1303-1308.
24. Bonghi C., Rascio N., Ramina A., Casadoro G. (1992) Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. Plant Mol. Biol. 20: 839-848.
25. Roongsattham P., Morcillo F., Jantasuriyarat C., Pizot M., Moussu S., Jayaweera D., Collin M., Gonzalez-Carranza Z.H., Amblard P., Tregear J.W., Tragoonrung S., Verdeil J.L., Tranbarger T.J. (2012) Temporal and spatial expression of polygalacturonase gene family members reveals divergent regulation during fleshy fruit ripening and abscission in the monocot species oil palm. BMC Plant Biol. 12: 150.
26. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Świdziński M., de Dios Alché J., Nowakowska A., Kopcewicz J. (2016) The influence of abscisic acid on the ethylene biosynthesis pathway in the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus*. J. Plant Physiol. 206: 49-58.
27. Addicott F.T., Lynch R.S., Carns H.R. (1955) Auxin gradient theory of abscission regulation. Science 121: 644-645.
28. Morgan P.W., Hall W.C. (1964) Accelerated release of ethylene by cotton following application of indolyl-3-acetic acid. Nature 201: 99.
29. Jones M., Woodson W. (1999) Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation. Plant Physiol. 119: 755-764.
30. Patharkar O.R., Walker J.C. (2016) Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. Plant Physiol. 172: 510-520.
31. Zhang X., Xu X., Yu Y., Chen C., Wang J., Cai C., Guo W. (2016) Integration analysis of MKK and MAPK family members highlights potential MAPK signaling modules in cotton. Sci. Rep. 6: 29781.
32. Jagodzki P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018) Mitogen-Activated Protein Kinase cascades in plant hormone signaling. Front. Plant Sci. 9: 1387.
33. Roberts J.A., Schindler C.B., Tucker G.A. (1984) Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. Planta 160: 159-163.
34. Meir S., Philosoph-Hadas S., Sundaresan S., Selvaraj K.S., Burd S., Ophir R., Kochanek B., Reid M.S., Jiang C.Z., Lers A. (2010) Microarray analysis of the abscission- related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. Plant Physiol. 154: 1929-1956.
35. Bar-Dror T., Dermastia M., Kladnik A., Znidaric M.T., Novak M.P., Meir S., Burd S., Philosoph-Hadas S., Ori N., Sonogo L., Dickman M.B., Lers A. (2011) Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. Plant Cell 23: 4146-4163.
36. Frankowski K., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., de Dios Alché J., Kopcewicz J., Wilmowicz E. (2017) Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. Acta Soc. Bot. Pol. 86: 3540.
37. Lee Y., Derbyshire P., Knox J.P., Hvorslef-Eide A.K. (2008) Sequential cell wall transformations in response to the induction of a pedicel abscission event in *Euphorbia pulcherrima* (poinsettia). Plant J. 54: 993-1003.
38. Taylor J.E., Tucker G.A., Laslett Y., Smith C.J.S., Arnold C.M., Watson C.F., Schuch W., Grierson D., Roberts J.A. (1990) Polygalacturonase expression during leaf abscission of transgenic and normal tomato plants. Planta 183: 133-138.
39. Ha C.M., Jun J.H., Nam H.G., Fletcher J.C. (2004) *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45: 1361-1370.
40. Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE* genes. Plant Cell. 24: 4498- 4510.
41. McKim S.M., Stenvik G.E., Butenko M.A., Kristiansen W., Cho S.K., Hepworth S.R., Aalen R.B., Haughn G.W. (2008) The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. Development 135: 1537-1546.

42. Wu X.M., Yu Y., Han L.B., Li C.L., Wang H.Y., Zhong N.Q., Yao Y., Xia G.X. (2012) The tobacco *BLADE-ON-PETIOLE2* gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant Physiol.* 159: 835-850.
43. Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes. *Plant Cell.* 24: 4498- 4510.
44. Burch-Smith T.M., Brunkard J.O., Choi Y.G., Zambryski P.C. (2011) Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 1451-1460.
45. Sager R., Lee J.Y. (2014) Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* 65: 6337-6358.
46. Evensen K.B., Page A.M., Stead A.D. (1993) Anatomy of ethylene induced petal abscission in *Pelargonium x hortorum*. *Ann. Bot.* 71: 559-566.
47. Eo J., Lee B.Y. (2009) Anatomical and histological changes in the fruit abscission zone of water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC.). *Hort. Environ. Biotechnol.* 52: 315-320.
48. Santiago J., Brandt B., Wildhagen M., Hohmann U., Hothorn L.A., Butenko M.A., Hothorn M. (2016) Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. *eLife* 5: e15075.
49. Meir S., Philosoph-Hadas S., Riov J., Tucker M.L., Patterson S.E., Roberts J.A. (2019) Re-evaluation of the ethylene-dependent and -independent pathways in the regulation of floral and organ abscission. *J. Exp. Bot.* 70: 1461-1467.
50. Payton S., Fray R.G., Brown S., Grierson D. (1996) Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol. Biol.* 31: 1227 1231.
51. Lanahan M.B., Yen H.C., Giovannoni J.J., Klee H.J. (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521-530.
52. Butenko M.A., Stenvik G.E., Alm V., Saether B., Patterson S.E., Aalen R.B. (2006) Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter:reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant. *J. Exp. Bot.* 57: 3627-3637.
53. Patterson, S. E. and Bleeker, A. B. (2004). Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134,194 -203.
54. Ying P., Li C., Liu X., Xia R., Zhao M., Li J. (2016) Identification and molecular characterization of an *IDA-like* gene from litchi, *LcIDL1*, whose ectopic expression promotes floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 6: 37135.
55. Agustí J., Gimeno J., Merelo P., Serrano R., Cercós M., Conesa A., Talón M., Tadeo F.R. (2012) Early gene expression events in the laminar abscission zone of abscission-promoted citrus leaves after a cycle of water stress/rehydration: involvement of CitbHLH1. *J. Exp. Bot.* 63: 6079-6091.
56. Wojtaszek P. (2012) Ściana komórkowa. W: Wojtaszek P., Woźny A., Ratajczak L. (red.), *Biologia komórki roślinnej* (227-270). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
57. Audran C., Borel C., Frey A., Sotta B., Meyer C., Simonneau T., Marion-Poll A. (1998) Expression studies of the *zeaxanthin epoxidase* gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 118: 1021-1028.
58. Thompson A.J., Jackson A.C., Parker R.A., Morpeth D.R., Burbidge A., Taylor I.B. (2000) Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of *zeaxanthin epoxidase* and *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Mol Biol.* 42: 833-845.
59. Tudela D., Primo-Millo E. (1992) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in *Cleopatra mandarin* (Citrus reshni Hort. Ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol.* 100: 131-137.
60. Nomura Y., Harada T., Morita S., Kubota S., Koshioka M., Yamaguchi H., Tanase K., Yagi M., Onozaki T., Satoh S. (2013) Role of ABA in triggering ethylene production in the gynoecium of senescing carnation flowers: changes in ABA content and expression of genes for ABA biosynthesis and action. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 242-254.
61. Eccher G., Botton A., Dimauro M., Boschetti A., Ruperti B., Ramina A. (2013) Early induction of apple fruitlet abscission is characterized by an increase of both isoprene emission and absciscic acid content. *Plant Physiol.* 161: 1952-1969.
62. Botton A., Eccher G., Forcato C., Ferrarini A., Begheldo M., Zermiani M., Moscatello S., Battistelli A., Velasco R., Ruperti B., Ramina A. (2011) Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. *Plant Physiol.* 155: 185-208.
63. Xu S.L., Rahman A., Baskin T.I., Kieber J.J. (2008) Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3065-3079.
64. Tsang D.L., Edmond C., Harrington J.L., Nühse T.S. (2011) Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene- independent pathway. *Plant Physiol.* 156: 596-604.
65. Tsuchisaka A., Yu G., Jin H., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang X., Gao S., Theologis A. (2009) A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 183: 979-1003.

66. Taylor J.E., Whitelaw C.A. (2001) Signals in abscission. *New Phytol.* 151: 323-340.
67. Frankowski K., Kęsy J., Wojciechowski W., Kopcewicz J. (2009) Light- and IAA-regulated ACC synthase gene (*PnACS*) from *Pharbitis nil* and its possible role in IAA-mediated flower inhibition. *J. Plant Physiol.* 166: 192-202.
68. Wilmowicz E., Frankowski K., Kęsy J., Glazińska P., Wojciechowski W., Kućko A., Kopcewicz J. (2013) The role of *PnACO1* in light- and IAA-regulated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Acta Physiol. Plant.* 35: 801-810.
69. Shi Z., Jiang Y., Han X., Liu X., Cao R., Qi M., Xu T., Li T. (2017) SIPIN1 regulates auxin efflux to affect flower abscission process. *Sci Rep.* 7: 14919.
70. Jin X., Zimmermann J., Polle A., Fischer U. (2015) Auxin is a long-range signal that acts independently of ethylene signaling on leaf abscission in *Populus*. *Front. Plant Sci.* 6: 634.
71. Hagemann M.H., Winterhagen P., Hegele M., Wünsche J.N. (2015) Ethephon induced abscission in mango: physiological fruitlet responses. *Front. Plant Sci.* 6: 706.
72. Kopcewicz J. (2012) Rozwój generatywny. W: Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin* (539-575). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
73. Kęsy J., Maciejewska B., Sowa M., Szumilak M., Kawałowski K., Borzuchowska M., Kopcewicz J. (2008) Ethylene and IAA interactions in the inhibition of photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *Plant Growth Regul.* 55: 43-50.
74. Kęsy J., Wilmowicz E., Maciejewska B., Frankowski K., Glazińska P., Kopcewicz J. (2011) Independent effects of jasmonates and ethylene on inhibition of *Pharbitis nil* flowering. *Acta Physiol. Plant.* 33: 1211-1216.
75. Wilmowicz E., Frankowski K., Glazińska P., Kęsy J., Wojciechowski W., Kopcewicz J. (2011) Cross talk between phytohormones in the regulation of flower induction in *Pharbitis nil*. *Biol. Plant.* 55: 757.
76. Frankowski K., Wilmowicz E., Kęsy J., Glazińska P., Wojciechowski W., Kućko A., Kopcewicz J. (2013) The role of *PnACO1* in light- and IAA-regulated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Acta Physiol. Plant.* 35: 801-810.
77. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2014) Involvement of the IAA-regulated ACC oxidase gene *PnACO3* in *Pharbitis nil* flower inhibition. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 56: 90-96.
78. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Świeżawska B., Kopcewicz J. (2014) Ethylene, auxin, and abscisic acid interactions in the control of photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Biol. Plant.* 58: 305-310.
79. Kućko A., Czeszewska-Rosiak G., Wolska M., Glazińska P., Kopcewicz J., Wilmowicz E. (2017) Auxin increases the *InJMT* expression and the level of JAME: inhibitor of flower induction in *Ipomoea nil*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86: 3518.
80. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kopcewicz J. (2017) Photoperiod and ethylene-dependent expression of gibberellin biosynthesis gene *InEKO1* during flower induction of *Ipomoea nil*. *Biol. Plant.* 62: 194-199.
81. Marciniak K., Kućko A., Wilmowicz E., Świdziński M., Kęsy J., Kopcewicz J. (2018) Photoperiodic flower induction in *Ipomoea nil* is accompanied by decreasing content of gibberellins. *Plant Growth Regul.* 84: 395-400.
82. Schuman M.C., Meldau S., Gaquerel E., Diezel C., McGale E., Greenfield S., Baldwin I.T. (2018) The active jasmonate JA-Ile regulates a specific subset of plant jasmonate-mediated resistance to herbivores in nature. *Front. Plant Sci.* 9: 787.
83. Yan J., Li S., Gu M., Yao R., Li Y., Chen J., Yang M., Tong J., Xiao L., Nan F., Xie D. (2016) Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 172: 2154-2164.
84. Wilmowicz E., Kućko A., Frankowski K., Świdziński M., Marciniak K., Kopcewicz J. (2016a) Methyl jasmonate-dependent senescence of cotyledons in *Ipomoea nil*. *Acta Physiol. Plant.* 38: 222.
85. Wilmowicz E., Kućko A., Frankowski K., Zabrocka-Nowakowska B., Panek K., Kopcewicz J. (2016b) Wounding stimulates allene oxide synthase gene and increases the level of jasmonic acid in *Ipomoea nil* cotyledons. *Acta Soc. Bot. Pol.* 85: 3491.
86. Wilmowicz E., Frankowski K., Grzegorzewska W., Kęsy J., Kućko A., Banach M., Szmidt-Jaworska A., Saniewski M. (2014) The role of jasmonates in the formation of a compound of chalcones and flavans with phytoalexin-like properties in mechanically wounded scales of *Hippeastrum x Hybr.* Bulbs. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 56: 54-58.
87. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Mączkowski R., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) The generative development of traditional and epigonal cultivars of *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius* grown under different phytotron conditions. *Plant Breed. Seed Sci.* 69: 47-57.
88. Marciniak K., Kućko A., Wilmowicz E., Świdziński M., Przedniczek K., Kopcewicz J. (2018) Gibberellic acid affects the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus* via cooperation with the ethylene precursor independently of abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 229: 170-174.
89. Wilmowicz E., Kućko A., Golińska P., Burchardt S., Przywieczerski T., Świdziński M., Brzozowska P., Kapuścińska D. (2020) Absciscic acid and ethylene in the control of nodule-specific response on drought in yellow lupine. *Environ. Exp. Bot.* 169: 10390.

90. Leymarie J., Vitkauskaitė G., Hoang H.H., Gendreau E., Chazoule V., Meimoun P., Corbineau F., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiol.* 5: 96-106.
91. Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J. (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61: 2979-2990.
92. Fath A., Bethke P.C., Jones R.L. (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol.* 126: 156-166.
93. Borges F., Martienssen R.A. (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 727-741.
94. Penfield S., Josse E.M., Kannangara R., Gilday A.D., Halliday K.J., Graham I.A. (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr. Biol.* 15:1998-2006.
95. Wilmowicz E., Kućko A., Ostrowski M., Panek K. (2018) INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-like is an abscission associated and phytohormone-regulated gene in flower separation of *Lupinus luteus*. *Plant Growth Regul.* 85: 91-100.
96. Kućko A., Wilmowicz E., Ostrowski M. (2019) Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *J. Plant Physiol.* 236: 51-60.
97. Kućko A., Smoliński D.J., Wilmowicz E., Florkiewicz A., Alché J. (2019) Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* 256: 1173-1183.
98. Wilmowicz E., Kućko A., Burchardt S., Przywieczerski T. (2019) Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3731.
99. Kućko A., Wilmowicz E., Pokora W., Alché J. (2020) Disruption of auxin gradient in abscission zone area evokes asymmetrical changes leading to flower separation in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 3815.
100. Wilmowicz E., Kućko A., Sidłowska M., Frankowski K., Maciejewska B., Glazińska P., Kopcewicz J. (2012a) Rola jasmonianów w regulacji rozwoju generatywnego. *Kosmos* 61: 603-612.
101. Wilmowicz E., Frankowski K., Sidłowska M., Kućko A., Kęsy J., Gąsiorowski A., Glazińska P., Kopcewicz J. (2012b) Biosynteza jasmonianów u roślin: najnowsze odkrycia. *Post. Biol. Kom.* 58: 26-33.
102. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Sidłowska M., Kęsy J., Kopcewicz J. (2013) Metabolizm kwasu abscysynowego. *Post. Bioch.* 59: 83-88.
103. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2013) Kinazy białkowe w szlakach sygnałowych hormonów roślinnych. *Post. Biol. Kom.* 40: 253-294.
104. Kućko A., Wilmowicz E., Frankowski K., Piotrowski K., Kęsy J., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) Szlaki biosyntezy auksyn. *Post. Biol. Kom.* 41: 121-128.
105. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2014) Współdziałanie fitohormonów w regulacji początkowych faz wzrostu i rozwoju wegetatywnego roślin (embriogeneza, kiełkowanie nasion, merystem wierzchołkowy pędu i korzenia). *Post. Biol. Kom.* 41: 79-98.
106. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Kęsy J., Sidłowska M., Studzińska-Czyszka A., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) Mechanizm odcinania organów u roślin. *Post. Biol. Kom.* 41: 599-615.
107. Wilmowicz E., Marciniak K., Kućko A., Kopcewicz J. (2016) Hormonalna regulacja procesów ontogenetycznych u roślin. *Zarz. Ochr. Przyr. Las.* 10: 84-100.
108. Wilmowicz E., Kućko A., Marciniak K., Gadzikowska A., Przedniczek K., Kopcewicz J. (2017a) Obecny stan wiedzy na temat regulacji powstawania oraz funkcjonowania strefy odcinania kwiatów *Lupinus luteus*. *Biuletyn IHAR* 281: 85-90.
109. Wilmowicz E., Kućko A., Zabrocka-Nowakowska B., Przedniczek K., Florkiewicz A., Panek K. (2017b) Hormonalna kontrola procesu nodulacji. *Post. Biol. Kom.* 44: 137-152.
110. Wilmowicz E., Kućko A., Kopcewicz J. (2017c) Mechanizmy obronne roślin drzewiastych uruchamiane w odpowiedzi na atak patogenów. *Zarz. Ochr. Przyr. Las.* 11: 41-54.
111. Florkiewicz A., Kućko A., Panek K., Czeszewska-Rosiak G., Wolska M., Wilmowicz E. (2018) Podwójna rola kwasu abscysynowego w regulacji fotoperiodycznej indukcji kwitnienia *Ipomoea nil* L. W: *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze*. Cz. 8: *Rośliny i ochrona środowiska* / red. nauk. Jędrzej Nyckowiak, Jacek Leśny. Poznań: Młodzi Naukowcy, 58-63.

Agata Kućko

ZAŁĄCZNIK NR 3b

Summary of profesional accomplishments

1. Name

Agata Kućko

2. Diplomas

2017 - PhD in biology - Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University in Toruń. Thesis title: 'Characterization of flower abscission zone in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) as well as influence of abscisic acid and ethylene on its functioning'. Research performed in the Chair of Plant Physiology and Biotechnology, UMK Toruń. Supervisor: dr hab. Jacek Kęsy, Prof. UMK, Cosupervisor: Dr Juan de Dios Alché Ramírez (Estación Experimental del Zaidín, EEZ-CSIC, Granada, Spain), Auxiliary supervisor: Dr hab. Emilia Wilmowicz, Prof. UMK; Reviewers: Prof. Dr hab. Franciszek Dubert (Institute of Plant Physiology, PAS, Kraków), Dr hab. Marta Koblowska, Prof. UW (University of Warsaw).

2011 - MSc in biology - Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń. Thesis title: 'Changes in the transcriptional activity of the *InOPR3* gene in selected growth-developmental processes of morning glory (*Ipomoea nil*) plants.' Research performed in the Chair of Plant Physiology and Biotechnology, UMK Toruń. Supervisor: Prof. Dr hab. Jan Kopcewicz; Reviewer: Prof. Dr hab. Andrzej Tretyn.

2009 - Bachelor of Science in biology - Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń. Thesis title: 'Mechanisms of gibberellin regulation of plant growth and development'. Research performed in the Department of Plant Physiology and Molecular Biology. Supervisor: Dr hab. Jacek Kęsy, Prof. UMK; Reviewer: Prof. Dr hab. Jan Kopcewicz.

3. Employment in research institutes

1.11.2018 - present - research assistant *Post-doc* (employment contract), Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences - SGGW (WULS-SGGW).

19.02.2018 - 31.10.2018 - adjunct (replacement employment contract), Department of Plant Physiology and Biotechnology, University of Gdańsk.

1.04.2017 - 15.10.2017 - biologist (employment contract), Chair of Plant Physiology and Biotechnology, Nicolaus Copernicus University in Toruń.

27.09.2011 - 30.09.2012 - one of the main researchers in the project financed by Polish Ministry of Agriculture and Rural Development (contract for a specific task), Chair of Plant Physiology and Biotechnology, Nicolaus Copernicus University in Toruń.

4. Scientific achievement - a cycle of scientific articles related thematically, pursuant to art. 219 para 1. point 2b of the Act

4.1. The title of scientific achievement

Exogenous and endogenous factors which determine the functioning of floral abscission zone in yellow lupine

4.2. List of articles of scientific achievement

- 4.2.1. Wilmowicz E.*, **Kućko A.***, Ostrowski M., Panek K. (2018) *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-like* is an abscission associated and phytohormone-regulated gene in flower separation of *Lupinus luteus*. *Plant Growth Regulation* 85: 91-100. (IF₂₀₁₉: 2.473; points of the Ministry of Science and Higher Education: 30).

My contribution to this work consisted of participating in the formulation of research concepts and their planning, plants treatment with hormones and their inhibitors, collecting, fixing, and preparing material for light and electron microscopy. I performed the histological analysis of cell structure of inactive and active AZ, as well as those treated using hormones and inhibitors of their biosynthesis/action. I was responsible for the graphic presentation of the results. I identified the full-length cDNA sequence of LIIDL gene (RNA isolation, cDNA synthesis, PCR, molecular cloning, analysis of the sequencing results, verification of obtained sequence) and I optimized qPCR conditions. I participated in the analysis of cell ultrastructure. I interpreted the obtained results and prepared them for publication. I was the corresponding author, I participated in the manuscript writing, editing, and creating its final version after review. I participated in the acquisition of funds for experiments. () authors contributed to the manuscript equally.*

- 4.2.2. **Kućko A.**, Wilmowicz E., Ostrowski M. (2019) Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *Journal of Plant Physiology* 236: 51-60. (IF₂₀₁₉: 2.825; points of the Ministry of Science and Higher Education: 100).

My contribution to this work was based on co-creation of the concept and planning of research, plant treatments with hormones, performing the abscission zone, activation procedure, collection of material for molecular and chromatographic analyzes. I determined ACC content (isolation, purification, GC-MS analysis). I performed immunolocalization of IAA in ET-treated AZ and I detected ACC in AZ after IAA application (material collection, fixation, reactions with antibodies, microscopy observations). I determined the expression of ET biosynthesis genes, LIACS, LIACO (RNA isolation, cDNA synthesis, qPCR). I participated in the interpretation of all obtained results, their graphic presentation, manuscript writing, and editing all of the subsequent versions.

- 4.2.3. **Kućko A.**, Smoliński D.J., Wilmowicz E., Florkiewicz A., Alché J. (2019) Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* 256: 1173-1183. (IF₂₀₁₉: 2.633; points of the Ministry of Science and Higher Education: 70).

My contribution to this work was based on the co-creation of the research concept on the role of LIBOP in the process of flower abscission. I participated in the collection of

plant material for microscopic and molecular studies, preparation, and fixing of tissue fragments used for the sectioning of tissues for the immunolocalization reactions of LIBOP, poly(A) mRNA, and U2 snRNA. I have detected the reactive oxygen species in AZ. I participated in the analyzes using a confocal microscope and interpretation of obtained results. I made a graphic presentation. I was involved in the funding acquisition for experiments. I was writing and editing all versions of the manuscript.

- 4.2.4. Wilmowicz E.*, **Kučko A.***, Burchardt S., Przywieczerski T. (2019) Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 3731. (IF₂₀₁₉: 4.183; points of the Ministry of Science and Higher Education: 100).

My contribution to this work was based on co-creating the concept and research plan. I participated in the collection of material for molecular, microscopic, and instrumental analyses. I performed MPK6 and catalase immunolocalization (fixation, reactions with antibodies, microscopy observations), I determined catalase activity and H₂O₂ level (spectrophotometric analyzes). I identified the full-length cDNA sequences of LIZEP, LIHSL, LIMP6 genes (RNA isolation, cDNA synthesis, PCR, molecular cloning, analysis of the sequencing results, verification of obtained sequence). I optimized qPCR conditions and examined the expression of LIIDL, LIHSL, LIMP6, LIZEP, LIACS, LIACO (RNA isolation, cDNA synthesis, qPCR). I interpreted these results, made a graphic presentation, and statistical analysis. I was involved in the analysis of all obtained results, writing, editing, and proofreading of the manuscript. () authors contributed to the manuscript equally.*

- 4.2.5. **Kučko A.**, Wilmowicz E., Pokora W., Alché J. (2020) Disruption of auxin gradient in abscission zone area evokes asymmetrical changes leading to flower separation in yellow lupine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 3815. (IF₂₀₁₉: 4.183; points of the Ministry of Science and Higher Education: 100).

My contribution to this work was based on co-creating the concept and the whole research plan. I analyzed the influence of an auxin transport inhibitor on flower abscission (physiological experiment) and AZ cellular structure (material collection, fixation, histological analysis). I participate in the material collection for all planned experiments. I analyzed the localization of IAA, ABA, ACC, CAT, and APX in the abscission zone (material collection, fixation, reactions with antibodies, microscopy observations, documentation of results). I analyzed the expression of ET biosynthesis genes, LIACS, LIACO (RNA isolation, cDNA synthesis, qPCR), as well as CAT localization (fluorescence microscopy). I interpreted these results, made a graphic presentation, and statistical analysis. I participated in the analysis of all obtained results and their graphic presentation, writing, and editing the manuscript after the review process.

4.3. Description of scientific achievement of the above-mentioned papers and obtained results, discussion of their possible application.

Citation of articles representing scientific achievement are underlined and bolded

JUSTIFICATION OF RESEARCH SUBJECT

Organ abscission from the plant body is a physiological phenomenon, which is a part of the realization of its developmental program. This process can be also stimulated by exogenous factors, like drought or pathogens attack. In these circumstances, abscission ensures the removal of unnecessary or infected organs (Roberts et al., 2000). Considering plants of agricultural importance, such as legumes (*Fabaceae* L.), excessive and premature abscission of flowers prevents the development of pods, and consequently production of seeds, which are a valuable source of proteins (Kambal et al., 1969; Fakir et al., 2011; Couzigou et al., 2016). Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) cultivated in our climate is characterized by high flower abortion rate; 60%, 90%, and all of the flowers on the first, second and rest of inflorescences, respectively (Prusiński and Borowska, 2002). This unfavorable phenomenon is directly related to the strong reduction of plant yield and causes huge economic losses in the agricultural sector. For many years, representatives of the government, scientists, and farmers have been discussing the possibilities of increasing the use of native and underrated protein species such as lupine for the production of feedstock. This could limit, and even allow for the replacement of imported raw materials and guarantee the protein security of the country and its economic independence in the future. Therefore, all studies providing new information about the mechanisms regulating generative organ abscission in legumes may contribute to the development of agrotechnical approaches that improve yield. It also may increase the interest of farmers in the cultivation of forgotten but promising species, which have a measurable impact on animal nutrition.

INTRODUCTION

The shedding of an organ from the maternal plant requires the activity of a unique structure - abscission zone (AZ). The time and place of AZ formation are genetically determined (Addicott, 1982; Sexton and Roberts, 1982). Importantly, the presence of fully developed AZ doesn't guarantee separation of the organ; this structure should be activated firstly. As a result, tissue integrity is disrupted. These processes are highly controlled by both genetic and hormonal factors (Estornell et al., 2013).

Given a quite easy way of generation of transgenic plants and availability of knockout mutants, a majority of studies regarding molecular changes accompanied abscission are conducted using model organism for plant research, *Arabidopsis thaliana* (Niederhuth et al., 2013). Based on all obtained results an abscission model has been proposed (Figure 1) (Estornell et al., 2013; Kim, 2014).

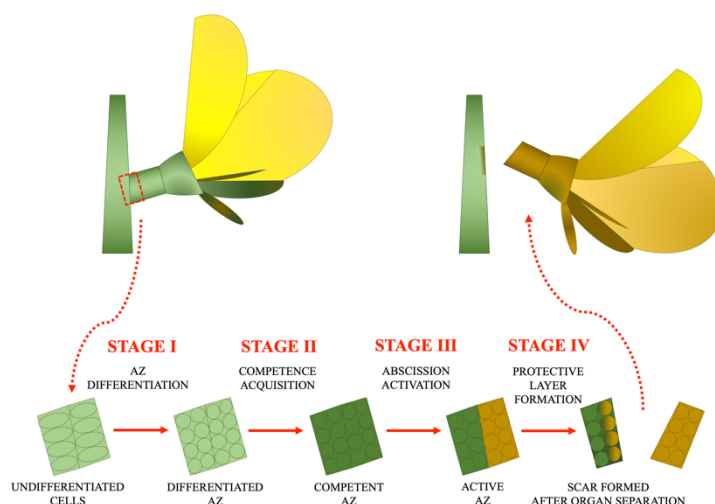


Figure 1. The simplified model describing subsequent steps of organ separation in the abscission zone (based on Estornell et al., 2013, modified).

The model assumes that organ separation involved four phases, which might be universal for other plant species. The first step is the formation of AZ, which is coordinated by transcription factors, such as JOINTLESS or BLADE ON PETIOLE (BOP). Then, AZ cells acquire competence for abscission-activating signals, among them phytohormones. Next, cell wall loosening and hydrolytic enzymes are activated leading to a reorganization of a plasma membrane and cell wall structure. The dissolution of the middle lamella causes tissue disintegration. These processes can be caused by the induction of a mechanism of programmed cell death, which is activated by an accumulation of reactive oxygen species (ROS). Afterward, a protective layer is formed (Addicott, 1982; Sexton and Roberts, 1982; Estornell et al., 2013).

Experiments carried out not only in *A. thaliana* but also in a few crop species, allowed to identify proteins regulating organ separation, among which INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) is the most important. It is a ligand for HAESA/HAESA-like receptor kinases (HAE/HSL) (Butenko et al., 2003; Stø et al., 2015). C-terminus of IDA has a conserved EPIP domain that is responsible for protein activity and receptor binding. In turn, the N-terminus contains a signal peptide directing IDA to the extracellular space, where it binds to the HAE/HSL transmembrane protein, which triggers the cascade of mitogen-activated protein kinase (MAP kinases) in the cytoplasm of AZ cells (Stenvik et al., 2008). The IDA-HAE/HSL complex releases KNAT1 (knotted-like from *Arabidopsis thaliana* 1) transcription factor, which is a repressor of expression of KNAT2/KNAT6, thus increasing their transcriptional activity, which in turn activates genes encoding hydrolytic enzymes (Cho et al., 2008; Shi et al., 2011; Butenko et al., 2012). **The HAE/HSL-mediated signaling pathway evoked by IDA functions in various phylogenetic groups of higher plants, but it is still not known how the individual elements of this pathway are regulated in particular species, especially crops. In this context, further questions arise, mainly those, regarding links of abscission signals with other signal transduction pathways, including phytohormonal ones** (Tranberger et al., 2017).

Previous analyses performed in yellow lupine have shown that floral AZ is located at the base of the pedicels and is composed of small, isodiametric cells, different from those presented below (in the proximal part) and above (in the distal part) (Frankowski et al., 2015b). In this species, the process of flower separation is associated with the changing activity of the *LIBOP* gene encoding the transcription factor. Its expression is additionally regulated by phytohormones (Frankowski et al., 2015a, b). The results of pioneering experiments carried out in the 1960s in the context of hormonal regulation of organ detachment suggested that the most important stimulator of this process is abscisic acid (ABA) (Ohkuma et al., 1963; Addicott et al., 1968). Subsequent analyzes verified this belief because they demonstrated that ABA can act indirectly. This hormone affects the biosynthesis of ethylene (ET), which is the main abscission effector since it stimulates the activity of the enzymes responsible for the hydrolysis of the membrane and cell wall components (del Campillo and Bennett, 1996; Kalaitzis et al., 1997; Bonghi et al., 1992; Roongsattham et al., 2012). A similar relationship has been found in yellow lupine; the simultaneous application of ABA and an inhibitor of ET action - norbornadiene (NBD), inhibited abortion of flowers. It turned out that ABA, stimulating the expression of genes encoding enzymes involved in ET biosynthesis and leading to the accumulation of its precursor - 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in AZ cells, activates this structure and caused the separation of flowers (Wilmowicz et al., 2016). Equally important as ABA and ET in organ separation is the ratio of indole-3-acetic acid (IAA) and ET on both sides of AZ. It has been proven that maintaining high IAA level above AZ and a low IAA level below AZ prevents organ abortion, while disruption of polar auxin transport increases the sensitivity of AZ cells to ET (Addicott et al., 1955; Sexton and Roberts, 1982; Estornell et al., 2013). On the other hand, auxins can stimulate ET production and cause organ abscission, as shown in cotton (*Gossypium hirsutum*) and carnation (*Dianthus caryophyllus*) (Morgan and Hall, 1964; Jones and Woodson, 1999). **Taking into consideration the complexity of the IAA and ET interactions and lack of information regarding the contribution of both hormones in the**

regulation of organ detachment, especially at the level of AZ, further studies are needed to clarify these issues.

Activation of AZ, and as a consequence organ separation, can be caused by unfavorable environmental conditions that largely determine the quantity and quality of yield. In the era of global climate changes and occurring of extreme weather events, the factor that has the greatest impact on uncontrolled abscission of generative organs is drought. According to the report of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation - National Research Institute water deficit in soil affected all voivodships and all monitored crops in Poland, contributing to significant economic losses, and in extreme cases led to a total loss of yield (IUNG-PIB, report 08, period: 1.06-31.08.2019). **Although the mechanisms of plant response to water deficiency have often been studied, there is still no information in the scientific literature regarding the impact of this abiotic factor on the changes occurring particularly in AZ of generative organs that are crucial for their proper development.** Up to date, the results of research performed in *A. thaliana* have shown that during drought-induced leaf abscission the perception of a stress stimulus triggers a cascade of MAP kinases, in which the signaling compounds are ROS and phytohormones (Patharkar and Walker, 2016). It has been also documented that MAP kinases affect plant hormone signaling pathways in response to environmental factors, e.g. drought (Zhang et al, 2016; Jagodzick et al., 2018). **Advancement of knowledge of ROS- and phytohormone-dependent AZ modifications associated with drought-induced flower abscission may contribute to understanding the mechanisms of plant tolerance to unpredictable environmental conditions that determine the yielding of economically important species.**

Gathering information and reviewing the literature the aim of work, which is the basis of proposed scientific achievement, was established; **selection of molecular, biochemical and hormonal elements of pathway regulating early steps of induction of floral abscission zone in yellow lupine, as well as determining the influence of drought on their functioning.**

RESULTS AND DISCUSSION

Activation of flower abscission zone

Considering the methodology of material harvesting for analyses on the abscission of yellow lupine flowers, it was essential to precisely determine AZ localization and proper collection of tissue fragments for experiments regarding two distinct processes (1) AZ formation and (2) further AZ functioning. AZ formation is not sufficient for flower abscission, although, this structure is fully developed. AZ cells must receive specific signals necessary for their activation. In my research, control (inactive AZ) was harvested from non-abscised flowers located at the lower parts of inflorescence, as described previously by Frankowski et al. (2015b). Additionally, the presence of fully developed AZ and no symptoms of its activation was verified by microscopy analyses, which allowed to exclude the induction of abscission activation mechanisms. Tissue fragments for studies on the AZ functioning were selected based on initial, visual assessment, while the presence of active AZ was confirmed by structural analysis. However, the most difficult issue was capturing the moment of switching the abscission mechanism, which is essential for research regarding the selection of factors that initiate organ separation. Therefore, to better understand the course of the early stages of separation, many laboratories apply the procedure of AZ artificial activation. This treatment involves the removal of organ at the base, which activates AZ in the pedicel remaining on the plant. The described methodology has been used previously in several studies carried out on tomato (*Solanum lycopersicum*), poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), and also yellow lupine (*Lupinus luteus*) (Roberts et al., 1984; Lee et al., 2008; Meir et al., 2010; Bar-Dror et al., 2011; Wilnowicz et al., 2016; Frankowski et al., 2017). Excising of flower, being a source of endogenous auxin, causes disruption of polar transport of this hormone, which is a signal for a plant for AZ activation and pedicel abortion.

The results of research, which are a part of the proposed scientific achievement, indicate that artificial AZ activation in lupine flowers leads to structural changes characteristic for those, observed in naturally active AZ, e.g. intensive divisions of cells containing large nuclei, aggregates, vesicles and many plasmodesmata (paper 4.2.1.). These modifications suggest high metabolic activity of cells, as well as synthesis and transport of molecules, that ensure cellular communication between AZ cells at the initial stages of separation (Taylor et al., 1991). Microscopy images of active AZ sections were totally different when compared to inactive AZ. These cells were loosely arranged, didn't divide, and had thicker cell walls (paper 4.2.1.). **Obtained results have proven that a procedure of artificial activation can be successfully applied for monitoring the early steps of flower abscission directly in the AZ area.**

Elements of molecular pathway regulating the functioning of the flower abscission zone

BOP genes encode transcriptional factors belonging to the NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED) protein family. They appear in plants under stress conditions (Ha et al., 2004). Up to date, *BOPs* have been identified in *A. thaliana*, tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Medicago sativa*, *Lotus japonicus*, *Pisum sativum*, as well as yellow lupine (*Lupinus luteus*) (McKim et al., 2008; Wu et al., 2012; Couzigou et al., 2012, 2016; Frankowski et al., 2015a). *BOP* genes expressed at the base of the organ and stimulate differentiation of specific AZ cells. In turn, *bop1 bop2* mutant is not able to develop AZ, e.g. in *A. thaliana* (McKim et al., 2008). In recent years, research about *BOP* related abscission focused mainly on their role in AZ formation. Their contribution to the later stages of separation events has not been verified. The only mention of this issue was provided by McKim et al. (2008). Moreover, our previous analyses showed differences in *LIBOP* gene expression between formed but inactive AZ and a naturally active structure, in which the transcript was accumulated two times higher. It allowed to believe that this gene is involved not only in the formation but also in the functioning of AZ (Frankowski et al., 2015b). To resolve this issue, a series of experiments using an *in situ* technique was carried out in yellow lupine. The localization of the *BOP* transcript in the floral AZ cells during its activation was analyzed for the first time. These results were confirmed by the qPCR method. Moreover, the metabolic activity of AZ cells was monitored at various stages of its functioning by determining the spatial organization of poly(A) mRNA and uridine-rich small nuclear RNA (U2 snRNA), which are an important element of the spliceosome (paper 4.2.3.). *LIBOP* presented in the cytoplasm and nuclei, as well as in extracellular spaces of fully developed, but inactive AZ. Furthermore, the transcript was detected in the xylem vessels and parenchyma cells. During the artificial activation of AZ, dynamic changes occurred in the spatial localization of *LIBOP*. It was reflected by the results of a quantitative assay. Flower removal caused a gradual increase in transcriptional activity of the studied gene in AZ, which reached its maximum value in 8 and 16 h after induction. Then the values were almost five times higher than in inactive control. Two hours after artificial activation *LIBOP* was located in the cytoplasm, nucleus, and plasmodesmata connecting neighboring cells. A similar pattern of its distribution was observed in 8 h, especially in vascular bundles and adjacent cells. In this case, the fluorescence signal was stronger. A significant accumulation of *LIBOP* mRNA was detected near vessels, mainly xylem of naturally active AZ. In this variant, the transcript was located in the intercellular spaces of the AZ area. The above results indicate that ***LIBOP* is involved in flower abscission processes both in the early and late stages of AZ activation.** Moreover, the changing pattern of the spatial distribution of this transcript in vascular elements and its appearance in the plasmodesmata network is a strong argument for the *LIBOP* synthesis in bundles and/or transport from other tissues to AZ cells (paper 4.2.3.). The formation of plasmodesmata is associated with the development of individual tissues or the specification of its cells (Burch-Smith et al., 2011). They ensure communication and direct flow of transcription factors and other regulatory molecules, e.g. RNA. Thus, plasmodesmata can synchronize signal transduction by generating a symplastic network of connections in the

AZ region (Sager and Lee, 2014). Their occurrence indicates high cell activity. **The accumulation of U2 snRNA spliceosome components and poly(A) mRNA following early and late stages of floral AZ activation in yellow lupine could be evidence for a direct link between the abscission process and the increasing total transcriptional activity of the cells.** The temporal and spatial pattern of transcripts localization during separation events indicates that newly formed mRNA molecules in nuclei are appeared to be translated in the cytosol, where key proteins for abscission are synthesized, among them hydrolytic enzymes or transcription factors. In turn, the colocalization of U2 snRNA and poly(A) mRNA suggests that formed transcripts undergo maturation in the spliceosome (**paper 4.2.3.**). A high level of new proteins may be associated with *de novo* synthesis of the abovementioned enzymes. This statement could be in agreement with the results of studies conducted on pelargonium (*Pelargonium hortorum*) and *Oenanthе stolonifera*, in which the application of a protein biosynthesis inhibitor (cycloheximide) inhibited the separation of petals and fruits, respectively (Evensen et al., 1993; Eo and Lee, 2009).

IDA ligand is the initiator of molecular changes accompanying organ abscission. Therefore, in the subsequent experiment performed to investigate the abscission activation mechanism, IDA gene homolog (*LIIDL*) was identified in yellow lupine (**paper 4.2.1.**). The predicted amino acid sequence obtained based on the *LIIDL* nucleotide sequence contains all domains and motifs characteristic of other plants IDA/IDL; among them, the C-terminal conserved 22 amino acid EPIP domain governing the activity of IDA protein. Studies in other plant species revealed that proline residue found in EPIP is crucial for interaction and binding to the HAE/HSL receptor (Stenvik et al., 2008; Santiago et al. 2016). The bioinformatic analysis also confirmed the presence of an N-terminal signal peptide allowing the secretion of IDA to the intercellular space. During the artificial activation of yellow lupine floral AZ, the *LIIDL* transcript gradually accumulated. Moreover, the mRNA content of *LIIDL* gene was ten times higher in naturally-active AZ, when compared to the control (**paper 4.2.1.**). **These results provide evidence that *LIIDL* is involved both in the early and late stages of AZ activation.**

qPCR analysis is a method of verification of gene activity, however, determining whether the protein products encoded by those genes are involved in the regulation of the specific process remains hypothetical. The use of genetic engineering would help to answer this question. Nevertheless, there are methodological difficulties of lupine *in vitro* cultivation that make it impossible to obtain transgenic plants. Therefore, to continue research on the involvement of *LIIDL* in flower separation, a synthetic EPIP peptide was used (**paper 4.2.1.**). It has been chosen because of the fact of its importance for IDA activity (Stenvik et al., 2008). Physiological experiments demonstrated that the **exogenous EPIP peptide applied to inactive AZ increases the degree of flower abortion in yellow lupine, which indicates that this quite small *LIIDL* fragment is sufficient to initiate abscission (paper 4.2.1.)**.

Changes initiated at the molecular level occurring in AZ require the coordinated action of many endogenous factors, including phytohormones. ET and ABA are the most important hormonal stimulators of flower separation in yellow lupine (Frankowski et al., 2017; Wilmowicz et al., 2016). Previous analyses carried out on other plant species suggest that ET-dependent and ET-independent abscission pathways can exist (Meir et al., 2019). In *A. thaliana*, the IDA-activated pathway act independently of ET and also, ABA (Butenko et al., 2006; Patterson and Bleecker, 2004; Patharkar and Walker, 2016). In contrast, ET is necessary for successful organ detachment in *S. lycopersicum* (Lanahan et al., 1994; Payton et al., 1996). This phytohormone also stimulates the expression of IDA homolog (*LcIDL1*) in litchi (*Litchi chinensis*) (Ying et al., 2016). The results published in the paper included in the proposed scientific achievement indicate that ***LIIDL* from lupine, due to the varied sensitivity to ET and ABA, functions in the phytohormone-dependent pathway (paper 4.2.1.)**. ET increases the transcriptional activity of this gene at 8, 16, and 24 h after application, while ABA evoked such effect in the first hours after treatment. Although the response to ET is later than to ABA, the first one acts stronger. It could mean that ABA functions indirectly through

ET by stimulating its biosynthesis pathway, as previously pointed out (Wilmowicz et al., 2016).

Drought-induced activation of the abscission zone

One of the most destructive abiotic factors that can activate AZ is drought (Agustí et al., 2012; Patharkar and Walker, 2016). In yellow lupine, this stress reduces the amount and surface of leaves, as well as their water content. It significantly changes the level of macroelements (Fe, Zn, Cu, S, K, Na) and affects photosynthetic activity. Soil drought also negatively influences the moisture content of AZ, and at the cellular level causes changes characteristic to naturally active structure (**paper 4.2.4.**). Loss of integrity and disruption of tissues lead to the abscission of flowers; the degree of their abortion is 30% higher compared to the control. Organ separation is one of the elements of the plant defense mechanism regulated by the genes responsible for AZ activation. In *A. thaliana*, the water deficit increased the expression of *IDA*, *HAE MPK4/5* in AZ of leaves, and, as a consequence, led to their abscission (Patharkar and Walker, 2016). Analyses carried out on yellow lupine revealed that soil drought strongly stimulated the activity of the *LIIDL* gene, which had previously been found as crucial for the process of flower detachment. What is more, this stress factor upregulated the expression of the newly identified *LIHSL* gene. Analysis of the predicted LIHSL amino acid sequence performed based on the nucleotide sequence indicated that the *LIHSL* cDNA encodes a serine-threonine receptor kinase located in the cell membrane. LIHSL contains LRR-RLK (RECEPTOR-LIKE KINASE PROTEINS WITH LEUCINE-RICH REPEAT) (**paper 4.2.4.**), which is responsible for protein-protein interaction that is important for binding with the ligand (Stenvik et al., 2008). Assuming that the complex LIIDL-LIHSL in yellow lupine triggers a pathway leading to flower abscission, its formation should also activate MAP kinase. *LIMPK6* was selected from lupine using transcriptomic data obtained during the realization of one task of a multiannual protein program (2011-2015, Appendix 4b, point 3.1.). This gene was expressed differently in naturally active and inactive AZ. Further studies showed that soil drought strongly stimulates the expression of *LIMPK6* in floral AZ. Additional immunocytochemical analyzes confirmed the accumulation of MPK6 kinase in AZ and adjacent pedicel cells subjected to water deficit conditions. The obtained data supports that the **identified genes *LIIDL*, *LIHSL*, and *LIMPK6* can encode subsequent elements of the pathway regulating the time of flower separation in lupine (paper 4.2.4.)**. At the same time, it confirms the functioning of the mechanism considered as conservative in the plant kingdom (Butenko et al., 2003, 2006).

As demonstrated in the **paper 4.2.3.** the early stages of abscission activation and the natural separation of yellow lupine flowers are correlated with oxidative stress conditions manifested by the intense accumulation of ROS in the AZ area. ROS can be involved in modifications of the cell wall compounds, that are crucial for conducting organ separation. On the one hand, ROS participate in strengthening and stabilization of this structure, but on the other hand, they lead to its relaxation (Wojtaszek et al., 2012). ROS are more intensively accumulated during stress conditions, and this phenomenon is named ‘oxidative burst’. It has been shown that **drought-induced abscission of a lupine flower is accompanied by significant alteration of redox homeostasis in AZ cells, which was expressed by an increase in H₂O₂ level and, as a consequence, the accelerated activity of catalase responsible for the dismutation of H₂O₂ (paper 4.2.4.)**. Notably, CAT was specifically accumulated not only in the AZ region but also in vascular bundles of the pedicel.

One of the earliest plant responses to changes in cell osmotic potential, caused, e.g., by drought stress, is a concomitant increase in the endogenous ABA content (Audran et al., 1998; Thompson et al., 2000). It may be the result of the upregulation of genes encoding enzymes involved in ABA biosynthesis, including ZEP (zeaxanthin epoxidase). The coding sequence of ZEP was identified in yellow lupine. It was shown that the **increased transcriptional activity of *LIZEP* in flower AZ from plants grown under drought conditions was accompanied by almost three times higher ABA levels**, as supported by the results of

chromatographic analyses. Furthermore, the immunolocalization reactions confirmed that this phytohormone is intensely concentrated in the cytosol of stressed AZ cells and vascular elements, while a very weak fluorescence signal was noted in the control AZ (**paper 4.2.4.**). Similar modifications of ABA metabolism were observed in naturally active AZ (Wilmowicz et al., 2016). A positive correlation between increasing *ZEP* expression and ABA level was also in *Nicotiana plumbaginifolia* and *S. lycopersicum* subjected to water deficit (Audran et al., 1998; Thompson et al., 2000).

Continuation of the hormonal analysis of drought-induced changes in yellow lupine was a demonstration of the positive effect of this stress factor on the ET biosynthesis pathway (**paper 4.2.4.**). The qPCR performed in the study showed that water deficit caused an increase in the expression of the gene coding ACC synthase (*LIACS*). It also raised the level of the ET precursor - ACC, presented strictly in AZ. At the same time ACC oxidase (*LIACO*) transcriptional activity was upregulated, suggesting that the precursor is oxidized to ET - the main abscission effector. The positive effect of soil drought on *ACS* and *ACO* expression as well as ACC and ET production has previously been demonstrated in *Cleopatra mandarin* (Tudela and Primo-Millo, 1992). However, the results presented in the paper included in the proposed scientific achievement are pioneering due to the use of an improved methodological approach (**paper 4.2.4.**). This allowed the examination of changes occurring only in AZ, and not, as previously presented in other plant species, in whole organs with pedicels, and even at the systemic level (Botton et al., 2011; Nomura et al., 2013; Eccher et al., 2013). According to the general scientific trend, not only ET but also ACC can function as a signal molecule, which induces the physiological response (Xu et al., 2008; Tsang et al., 2011; Tsuchisaka et al., 2009). Therefore, there is another possible interpretation of the results obtained in **paper 4.2.4.** ACC can act independently of ET and be involved directly in the response to a water deficit. **The obtained results provided completely new information on the identification of potential markers of early response to water deficit in AZ cells**, which can be used in the future to select lupine varieties characterized by an increased tolerance to drought stress, and thus a higher yield potential.

Distribution of auxin in the abscission zone area as a factor determining the time of flower separation

Despite many years of research on the role of auxins in the regulation of organ abscission, the precise distribution of this phytohormone in the AZ area has not been shown. Determining of IAA localization was necessary to describe its participation in separation processes. Therefore, in the next paper, which is a part of the scientific achievement, specific antibodies were used for the monitoring of IAA distribution following the early and late stages of AZ activation (**paper 4.2.2.**). This hormone was accumulated in naturally active AZ, while IAA content in the control was much lower. It was shown that the auxin gradient on both sides of artificially activated AZ changed over time, however, it increased in the distal and proximal parts, which was confirmed by the quantitative analyses (GC-MS).

AZ activation and subsequent organ separation require dynamic hormonal interactions. Both physiological and molecular analyses indicate that the time of organ detachment depends on the antagonistic effect of ET and auxin (Taylor and Whitelaw, 2001). Inhibition of polar auxin transport or removal of the flower stimulates the abscission of pedicels, while this effect can be reversed by the exogenous inhibitor of ET action (Meir et al., 2010). As proposed previously, the sensitivity of AZ cell to ET is associated with the modification of expression of auxin-response genes (Meir et al., 2010). Given that ET is the main stimulator of flower abscission in yellow lupine (Wilmowicz et al., 2016) and IAA can directly regulate biosynthesis rate of this hormone in many processes (Frankowski et al., 2009; Wilmowicz et al., 2013), in the next stage of my research, we examined the effect of IAA on the elements of ET biosynthesis pathway in AZ cells (**paper 4.2.2.**). **Disruption of the natural IAA gradient in the AZ region by local application of exogenous hormone leads to the upregulation of ACC synthase expression (*LIACS*), accumulation of the ET precursor and increased**

transcriptional activity of ACC oxidase (*LIACO*). A continuation of the study was the assessment of the impact of ET on the auxin distribution. **Once the plant was exposed to ET, IAA appeared initially in the round, cytosolic cellular compartments, and then inside the vascular bundles of AZ. This may suggest that ET modulates auxin transport (paper 4.2.2.)**. This gaseous phytohormone regulates the expression of *PIN1* during tomato fruit separation (Shi et al., 2017). On the other hand, Jin et al. (2015) showed that auxin acts independently of ET in the leaf separation of populus, indicating that the mechanism may be species-specific. The model proposed for mango (*Mangifera indica*) fruit abscission assumes that ET inhibits polar transport of IAA, and reduces sugar content in the fruit, consequently leading to organ separation (Hagemann et al., 2015)

Bearing in mind that AZ is not a homogenous structure because various spatial changes may occur in this structure, and considering the results of our previous experiments showing that the distribution of IAA in different parts of AZ plays a key role in the induction of abscission, another research question arose. If flower abscission induced by auxin-dependent activation of AZ is related to the diverse effects evoked by IAA in the distal and proximal parts of AZ? To answer this question, the polar auxin transport inhibitor TIBA was used (**paper 4.2.5.**). Direct TIBA application to inactive flower AZ caused characteristic bending of the stem. In turn, at the cellular level, inhibitor treatment stimulated specific structural changes similar to those observed in the active zone. It was the result of the different localization of auxin on both sides of AZ, which was confirmed by immunolocalization and GC-MS analyses. **A direct consequence of that was excessive flower abortion. Inhibition of polar auxin transport by exogenous TIBA resulted in molecular and biochemical modifications that were diverse and specific on both sides of the AZ.** Decreasing level of IAA in the distal part accelerates the transcriptional activity of genes encoding subsequent elements of the molecular pathway inducing flower abscission (*LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*). On the other hand, the accumulation of IAA in the proximal region of the AZ disturbs the redox homeostasis and modifies the metabolism of hormonal stimulators of flower separation - ABA and ET. Increasing level of H₂O₂ in the proximal part of AZ triggers ROS detoxification mechanisms, which are manifested in the upregulation of CAT and ascorbate peroxidase. It should be noted that AZ induction by TIBA application is accompanied by a significant increase in the activity of both enzymes, as well as Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the proximal region. At the same time, in this area, *LIZEP* gene expression is stimulated and ABA is accumulated. Moreover, *LIACS* transcriptional activity and ET precursor level, and mRNA of *LIACO* gene increase (**paper 4.2.5.**). Collectively, **the spatially diverse induction of the molecular pathway and this associated with biosynthesis of stress phytohormones and the generation of oxidative stress in response to the inhibition of polar transport is a signal for the plant to initiate AZ activation processes.**

The results obtained during the realization of the research described as the presented scientific achievement provided completely new information about the hormonal and molecular control of the pathway inducing flower abscission in lupine – a plant with high agronomic potential for Poland and Mediterranean countries. The most important achievements of the presented research are listed below.

- The transcript of the newly identified IDA gene homolog (*LIIDL*), which functions in the pathway dependent on hormonal separation stimulators - ABA and ET, accumulates in both the early and late stages of the abscission zone activation.
- Application of the synthetic EPIP peptide obtained based on the predicted *LIIDL* amino acid sequence activates the flower abscission zone and increases their abortion.
- The subsequent phases of the abscission zone functioning are associated with the specific, temporal, and spatial distribution of the *LIBOP* transcript. This process is correlated with the high metabolic activity of AZ cells manifested in the accumulation of new transcripts and the appearance of splicing machinery.
- Water deficit activates the abscission zone. It increases the mRNA level of newly identified genes encoding subsequent elements of the molecular pathway initiating flower separation

(LIIDL, LIHSL, LIMPK6). Drought stress stimulates the expression of genes involved in ABA (*LIZEP*) and ET (*LIACS*, *LIACO*) biosynthesis. Limited water availability also leads to ABA and ACC accumulation in the abscission zone. This is accompanied by oxidative stress, which is reflected by the accumulation of hydrogen peroxide and the increasing activity of catalase specifically located in the abscission zone.

- The induction of flower separation mechanisms requires changes in the IAA gradient below and above the abscission zone. This phytohormone affects the mRNA level of key genes involved in ET biosynthesis and the localization of its precursor, inevitably leading to flower abortion. However, on the other hand, ET modulates the distribution of auxin throughout the entire AZ area and adjacent tissues.
- Inhibition of polar auxin transport leads to the asymmetric distribution of auxin on both sides of the abscission zone, causing its induction and separation of the flower. The reduced level of auxin in the distal part increases the transcriptional activity of genes encoding subsequent elements of the molecular pathway responsible for the functioning of the abscission zone (*LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*). In turn, this phytohormone accumulated in the proximal part disrupts redox homeostasis; stimulates SOD activity, leads to the accumulation of hydrogen peroxide, changes localization, and increases the activity of catalase and ascorbate peroxidase.

5. Other scientific activity

In addition to five experimental papers constituting a scientific achievement, I am also a co-author of 28 articles: 15 original and 2 review papers published in scientific journals with an impact factor and listed in the Journal Citation Reports (JCR) database, as well as 1 original and 10 review articles published in journals that are not included in the JCR database. I am the co-author of one chapter in the book entitled *Japanese morning glory* under the patronage of the Springer-Verlag publishing company, which is planned for publication in 2020. I am also preparing two chapters in the book entitled *Ethylene in Plant Biology* under the patronage of the Wiley, United Kingdom. I am the first author in one of the chapters, while in the other I am the second. The full list of papers is included in Appendix 4b of the presented application.

5.1. Scientific activity prior to the award of the PhD

As a master student, I began research on the participation of plant hormones in the regulation of photoperiodic flower induction in the model short-day plant *Ipomoea nil* (synonym for *Pharbitis nil*, morning glory). The reception of a photoperiod stimulus by cotyledons initiates a cascade of events leading to a change in the developmental pattern of the shoot growth apex from vegetative to generative (Kopcewicz et al., 2012). The results of many years of research conducted in a team headed by Prof. Dr hab. Jan Kopcewicz showed that ET is the strongest flowering inhibitor of *I. nil*. However, the generative induction depends also on other plant hormones, including auxins, jasmonates, ABA, and gibberellins, which can interact with each other (Kęsy et al., 2008, 2011; Frankowski et al., 2009; Wilmowicz et al., 2011).

During my master studies, I gained the ability to work on plant material and knowledge of molecular techniques as well as qualitative and quantitative analysis of plant hormones. Thus, I could continue research on *I. nil*, which has been carried out over the next few years, also during my doctoral studies, and concerned not only the induction of flowering but also the senescence-related processes. It also became possible because of obtaining additional funding under an individual grant awarded in 2014 by the Faculty of Biology and Environmental Protection of the Nicolaus Copernicus University entitled 'The expression analysis of genes involved in jasmonic acid metabolism (*InJMT*, *InJAR*) and designing the

effective method of determination of JAIIe – a biologically active conjugate from *Ipomoea nil*. The obtained research results in the years 2009-2018 were published in 7 experimental papers. Among the many results, the most important for describing the mechanisms regulating flowering induction was the identification of the *PnACO1* and *PnACO3* genes encoding ACC oxidases involved in ET biosynthesis. Their transcriptional activity is regulated by auxin, and in the case of *PnACO1* depends on light (Frankowski et al., 2013, Wilmowicz et al., 2014). In the next stage, it was found that, like auxin, also ABA inhibits *I. nil* flowering by stimulating the expression of genes associated with ET biosynthesis (Frankowski et al., 2014). Auxin may also modulate jasmonate metabolism by increasing the transcriptional activity of the *InJMT* gene encoding methyltransferase that catalyzes the transformation of jasmonic acid (JA) into methyl ester (MeJA), leading to the accumulation of MeJA, which is a flowering inhibitor (Kućko et al., 2017). Continuation of research on the identification of phytohormone-dependent induction pathways of generative development in *I. nil* was the statement that photoperiod and ET regulate the mRNA level of the *InEKO1* (ent-kaurene oxidase) gene involved in gibberellin biosynthesis, which level decreases during this process (Marciniak et al., 2017, 2018).

Another scientific interest was related to the participation of jasmonates in the plant's senescence processes. For many years JA was considered as the biologically active molecule. Over time, it turned out that also JA conjugates, until now considered only as a storage form, in many biological tests show higher activity than free JA (Yan et al., 2016; Schuman et al., 2018). The effect of the research conducted on the participation of jasmonates-dependent senescence of *I. nil* was that in dark-stimulated cotyledon senescence, *InJMT* expression, and MeJA level increase, while JA content decreases (Wilmowicz et al., 2016a). These results indicate a higher metabolic activity of the methyl JA derivative in the regulation of the studied process. Continuation of analyzes related to jasmonate-regulated *I. nil* responses was to investigate their contribution to tissue injury. Mechanical damage activates the expression of the gene encoding allene oxide oxidase (*InAOS*), which is a key component in the jasmonate biosynthesis pathway. It was accompanied by a significant increase in the level of these phytohormones (Wilmowicz et al., 2016b).

My further research focused on crop species. I continued the subjects related to jasmonates and plant responses to mechanical tissue damage. I participated in the experiments carried out on the ornamental plant - *Hippeastrum*. The disease caused by fungal pathogen *Phoma narcissi* is the red spot of flower petals, which reduces the attractiveness of plants and is a serious economic problem in the floristry industry. The results of research carried out at the Research Institute of Pomology and Floriculture in Skierniewice, in which I participated during the realization of the project, showed that mechanical damage of onions causes the formation of a compound characterized by similar properties to phytoalexins. It increases the resistance of *Hippeastrum* to fungus infection. The aim of the study was to check whether jasmonates are a part of the signal transduction pathway leading to the formation of phytoalexins. It has been shown that the injury results in the accumulation of JA, the level of which gradually decreases in favor of the accumulation of MeJA. Inhibition of jasmonate biosynthesis reduces the ability of onions to produce a resistance-inducing compound, which indicates that these phytohormones are part of the *Hippeastrum* defense mechanism triggered in response to stress (Wilmowicz et al., 2014).

Although my scientific interests prior to obtaining a PhD were focused on several research subjects, the first and most important for the realization of the doctoral dissertation concerned the characteristics of the abscission zone of yellow lupine flowers and the participation of ABA and ET in the separation of these organs. Exploring this issue was possible due to the funding obtained under the multi-annual program Polish Ministry of Agriculture and Rural Development ('Physiological and genetic control of flower and fruits development in legumes' - 2011-2015). Initially, I was employed as a researcher on a contract (1/10/2011-1/10/2012), and for the next 5 years as a PhD student. When we started to work on new plant species and have plans to perform detailed molecular analyzes related to their generative development, optimization of cultivation was our crucial aim. Therefore, in the

first stage, the influence of soil material type and phytotron conditions on the generative development of three species of lupine (white, yellow, narrow-leaved) most commonly cultivated in Polish agriculture was determined, and the obtained results were published in the paper of Frankowski et al. (2014).

Continuation of the doctoral dissertation was possible when I obtained new funds from several sources, including a grant funded by the Spanish consortium eidA3-ceiA3 (The International Agrifood Doctorate School, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario) (01/10/2013 - 31/03/2014), an individual grant from the Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University 'Hormonal control of generative organs abscission in yellow lupine (*L. luteus*)' (2015) and the next edition of the multiannual program of Polish Ministry of Agriculture and Rural Development 'Identification of genes determining alkaloid content, formation and maintaining of generative organs in lupines ' (2015-2017) (Appendix 4b, point 3). In 2013, I won an international competition, I had the possibility to spend a six-month internship in a foreign laboratory headed by Dr. Juande Dios Alche Ramirez (co-promoter of my doctoral dissertation). During this time, I have learned modern techniques in the field of biochemistry and microscopy, which improved my research workshop. The research of the scientific team to which I belonged in Poland could then be carried out according to a novel experimental approach. We have turned our attention to the emerging interest in the world in the changes related to the separation of organs and taking place directly in the abscission zone. The most important achievements include determining the time and place of AZ formation of yellow lupine flowers (Frankowski et al., 2015b). One of the assumptions of the dissertation was the identification of *LIBOP* gene involved in the formation of floral AZ in lupine (Frankowski et al., 2015a). Furthermore, excessive and premature separation of flowers has been found to be controlled by phytohormones, including ABA and ET. They are stimulators of this process. ABA positively regulates the expression of ACC synthase and oxidase genes, and to upregulates the level of ET precursor in AZ cells (Wilmowicz et al., 2016).

Bearing in mind the desire to improve my research workshop with methods of genetic engineering, after returning from an internship in Spain, I applied for a grant to the Kosciuszko Foundation. The project aimed to describe the changes associated with lipid metabolism occurring following the abscission of lupine flower, with particular emphasis on the characteristics of the gene encoding lipoxygenase (LOX), one of the enzymes involved in jasmonates biosynthesis. All work was to be carried out in the laboratory of prof. Christoph Benning at the Michigan State University, which is prominent lab in the area of lipid analyses. Based on the proposed experimental plan, I obtained the written consent of the head of the laboratory for the scholarship. According to the research plan, I wanted to create *Arabidopsis* plants characterized by overexpression of the *LOX* gene transferred from lupine, and then to perform a detailed phenotypic analysis of organ abscission and compare lipid composition in wild-type plants and transformants. The project was qualified for the penultimate stage, which was an interview with the Foundation Committee.

At the same time, I participated in research on the second, next to flower separation, process determining yellow lupine yielding - fixation of atmospheric nitrogen. We have shown that the formation and proper functioning of root nodules are correlated with the changing transcriptional activity of the *LIBOP* and *LILbI* (leghemoglobin) genes. The second one encodes leghemoglobin, which allows maintaining proper oxygen partial pressure necessary for nitrogenase activity and efficient N₂ fixation. The results regarding this issue were published in the paper of Frankowski et al. (2015).

Conducting the multi-threaded research required an excellent scientific background and careful analysis of literature data. It allowed the formulation of verifiable hypotheses and the design of appropriate experimental systems that guaranteed the conducting of experiments. That is why, within a few years of my scientific activity, a number of review papers have been prepared summarizing the latest research results in the field of the hormonal and molecular control of ontogenetic development of a plant. The subjects were related to jasmonates (Wilmowicz et al., 2012a, b), ABA (Frankowski et al., 2013), auxins (Kućko et

al., 2014), organ abscission (Wilmowicz et al., 2014, 2017a), hormone signal transduction pathways and their interactions (Marciniak et al., 2013), the participation of hormones in the regulation of several stages of plant development (Marciniak et al., 2014; Wilmowicz et al., 2016), nodulation (Wilmowicz et al., 2017b) and plant defense mechanisms (Wilmowicz et al., 2017c). Published articles are a source of knowledge for both students participating in classes in the Department of Plant Physiology and those directly involved in laboratory work, which is extremely important in the context of the university's activity as a teaching unit. Students of our research team, being co-authors of the review papers, have acquired the practical ability to write scientific manuscripts.

5.2. Scientific activity after the award of the PhD

The results obtained during the doctoral studies were the first concerning yellow lupine in the context of flower abscission. Then it was possible to outline new scientific plans for the next few years, and I started their realization shortly after defending my dissertation (volunteering in a project financed by the Ministry of Agriculture and Rural Development). These analyses contributed to a better understanding of the elementary knowledge in the field of lupine biology and the evolutionary conservation of mechanisms regulating organ separation. The results of these studies are a part of the experimental work reported in this scientific achievement (Appendix 4b, point 1). At the same time, I was involved in the realization of one of the tasks of the MRiRW multi-annual program. The result of this work was a demonstration that gibberellic acid (GA₃) stimulates flower abscission. The positive effect of GA₃ on separation processes is associated with its effect on the ET biosynthesis pathway, but it is independent of ABA. The results were published in the paper of Marciniak et al. (2018).

My scientific interest in hormonal control of generative development has been developed also after PhD studies. This resulted in co-authorship of the chapter 'Phytohormones as key mediators of flower induction in *Ipomoea nil* - physiological and molecular aspects' in the book entitled 'Japanese morning glory', which is prepared under the patronage of the Springer-Verlag publishing company. In addition, a review summarizing the participation of ABA in photoperiodic flower induction of this species has been published (Florkiewicz et al., 2018).

After obtaining a PhD, I was employed (replacement employment contract) in the Department of Plant Physiology and Biotechnology (University of Gdańsk). I have continued my research on the hormonal and molecular control of flower abscission in yellow lupine. In parallel, I have been working on a different scientific issue. I tried to elucidate the mechanism of antagonistic action of herbicides in the regulation of starch and lipids accumulation in the model water plant duckweed (*Lemna minor* L.). This species is a good indicator of water quality and is used for the analyses of toxicity of sewage from industrial wastewater. The usefulness of small duckweed in application tests is reflected by ISO standards provided for this species, containing detailed guidelines of tests, which assess the degree of environmental pollution. I conducted my experiments in accordance with ISO 20079:2005. The experimental work has been carried out under the financial support of the University of Gdańsk (an individual grant for young scientist's development, 2018). The main aim of the project was to understand the relationship between the combination of exogenous herbicides (chloridazone - CHD and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid - MCPA) most commonly used in Polish agriculture, contaminating aquatic ecosystems, and the level of industrially significant compounds - lipids and starch in *L. minor*. By determining the number of fronds, fresh and dry mass, I evaluated the impact of both tested herbicides on plant development. Microscopy methods were used for describing the cellular changes in the fronds. An interesting effect was observed for CHD, which strongly stimulated root elongation. I determined the physiological state of plants based on changes in the content of photosynthetic pigments (chlorophyll a/b, carotenoids). Starch and glucose measurements have shown how herbicides modify the carbohydrate balance of plant. In addition, I examined the localization of lipoxigenase - one

of the enzymes modulating lipid biosynthesis. Lipxygenase accumulated in tissues subjected to the simultaneous action of toxicants. This effect can be used for the selection of biological markers determining the presence of herbicides in the environment. The results of the performed experiments indicate that the cooperation of CHD and MCPA is antagonistic, and the reaction of plants induced by the tested compounds is both time and tissue-specific. The obtained results were presented in 2019 at the Congress of the Polish Botanical Society in Kraków and are prepared for publication.

In November 2018, I was employed in the Department of Plant Physiology, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), as a scientific assistant (post-doc) in a project entitled 'Elucidation of the role of ARGONAUTE proteins in post-transcriptional regulation of gene expression in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*', which is funded by the National Science Center. This was dictated by the desire to improve the research workshop and gain new experimental skills involving analyses carried out on a model plant in genetic studies. Now I am involved in the realization of tasks that require wide experience in transgenic plants. Moreover, I get knowledge about the mechanisms of dormancy maintaining, which is crucial for the improvement of germination ability, also crop species.

Germination is highly controlled by antagonistic action of phytohormones - ABA and GA – as well as is regulated by ROS, which are the stimulators of this process (Fath et al., 2001; Liu et al., 2009; Leymarie et al., 2012). Environmental factors, such as light, significantly influence the initiation of germination (Penfield et al., 2005). Seed dormancy release requires the synthesis of many proteins, the level of which is modulated by the post-transcriptional gene regulation. One of them is expression silencing via miRNA, which are elements of complexes consisting, among others, of ARGONAUTE (AGO) proteins (Borges and Martienssen, 2015). Despite the progress made in recent years in AGO participation in the regulation of many plant growth and development processes, there is still no information about the role of these proteins in modifications accompanying seed germination. *A. thaliana* has 10 proteins belonging to the AGO family, and as we have shown so far, several AGOs are involved in light-dependent dormancy release. Currently, I am finishing the selection of transformants characterized by overexpression of genes encoding selected studied proteins, I determine the activity of their promoters in the obtained GUS-transformants. Furthermore, I analyze changes related to redox homeostasis and activation of antioxidant systems in wild type seeds and those collected from knockout mutants and transformants. The obtained results were presented as oral presentations at the 14th Plant Oxygen Group conference in Munich and the 17th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology in Toruń. They are currently complemented and will be ready soon for publication.

The results regarding the development and functioning of yellow lupine root nodules obtained in 2011-2014 and published in the work of Frankowski et al. (2015a), became the basis for further analyzes, which were continued as part of cooperation with the research team from the Nicolaus Copernicus University in Toruń. The effect of soil drought on hormonal changes occurring in nodules and their ability to fix atmospheric nitrogen was determined. It has been shown that a water deficit in the soil reduces the number of root nodules per plant and leads to significant histological changes indicating a progressive degradation of symbiosomes. ABA and ET biosynthesis pathways are induced in nodules. It is accompanied by a decreasing expression of the *LIBOP* and *LILBI* genes involved in the proper functioning of nodules. Using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry it has been shown that as a result of drought, iron and nitrogen levels decrease, suggesting serious disorders in the functioning of symbiosomes. The obtained results were presented at the conference Microscopy at the Frontiers of Science MFS2019: Joint Meeting of SME and SPMicros in Granada and published in the paper of Wilmowicz et al. (2019). They are a basis for the selection of molecular and hormonal markers of early response to water deficit in soil. They can be used to select lupine varieties characterized by an increased tolerance to drought stress, which is a huge challenge of modern agriculture facing increasing climate changes.

6. Future scientific perspectives

A real opportunity to effectively solve scientific problems and set new research directions is continuous improvement of the experimental methodology, which requires cooperation with scientists specializing in specific fields. The effect of long-term cooperation undertaken in the places where I was previously employed (UMK in Toruń, EEZ in Spain, UG) is not only the scientific thought flow but also joint manuscripts and plans. Drastically changing climatic conditions and prolonged periods of drought appearing more and more often in our country require quick response and counteraction as well as the implementation of solutions that will increase the resistance of plants, especially crops, to this type of stress. Motivated by the utilitarian significance of explaining this issue, as well as the great interest in the results of our research in an international environment, we created a research plan in which young scientists were also included. Including last year's scholarship holder of the "Diamond Grant" (0217/DIA/2019/48), Ms. Aleksandra Florkiewicz. She is currently working on her doctoral thesis and I will be an auxiliary supervisor of this dissertation. Some of the assumptions of the grant will be carried out in a Spanish EEZ. We expanded this research and now we aim to determine the proteomic and transcriptomic changes occurring in the lupine root nodules under the drought conditions. We want also to demonstrate changes in the root microbiome. I took part in a scientific consultation during project preparation, which was submitted in this year's edition of the "Diamond Grant" (ID: 473951). Some of my scientific interests concerning also basic research. I am one of the authors of the project conducted at the Nicolaus Copernicus University in Toruń, which is focused on the influence of EPIP peptide on changes occurring in floral AZ.

My cooperation with the Nicolaus Copernicus University in Toruń, EEZ in Spain, UG and WULS-SGGW, made possible by working in these institutions, not only contributed to the improvement of modern techniques but also gave me the opportunity to work on various plant species. I plan to use the acquired knowledge and skills in the field of genetic engineering and plant yielding mechanisms and apply for a future research project.

7. Teaching and organizational achievements

In addition to scientific work, I am involved in teaching. So far, I have taught the course for biology and biotechnology students in the following subjects: Plant physiology; Plant physiology with elements of anatomy and morphology; The role of RNA in molecular biology and biotechnology; DNA damage and repair; Mechanisms of plant growth and development; Plant-derived substances in medical diagnostics. In both Gdańsk and Warsaw, I have been responsible for the coordination of laboratory work of students (4 master students, 2 bachelor students). I was also involved in scientific consultations during doctoral studies of Dr Eng. Katarzyna Panek.

I was involved in science popularization during the organization of workshops for the Festival of Science and Art, All Poland Biologists Night, Fascination of Plants Day, Open Day at the Faculty of Biology and Environment Protection, workshops organized for Amicus Universitatis Nicolai Copernici Foundation, Primary School no 7 in Toruń and Middle School no 1 in Chełmno, as well as participating in the organization of XLII and XLIV Polish Biology Olympiad for Middle Schools and meeting in Innovation Center Mill of Knowledge.

I enclose photocopies of documents confirming the scientific activity in more than one University/Institute. During doctoral studies at the Nicolaus Copernicus University in Toruń, I started to cooperate with EEZ, Granada (Spain), which was continued during my employment at the University of Gdańsk and continues to this day (photocopy of the document confirming the internship and the awarded scholarship, the first pages of the common publications, and conference abstracts). A direct consequence of this activity are papers 4.2.3 and 4.2.5 included in the submitted scientific achievement. As a PhD student, I completed an internship at the Department of Plant Physiology at the University of Life Sciences in Poznań (photocopy of the document confirming the internship). During my employment at the University of Gdańsk, I continued my cooperation with the Nicolaus Copernicus University in Toruń (a photocopy of the first page of the common publication and conference abstracts). Papers included in the presented scientific achievement are also a part of the scientific cooperation. During my employment at WULS-SGGW, I am also involved in research carried out at the Department of Plant Physiology and Biotechnology, the University of Gdańsk (part of the results are presented in the paper 4.2.5), Nicolaus Copernicus University in Toruń, and EEZ, Granada.

8. Literature

90. Roberts J.A., Whitelaw C.A., Gonzalez-Carranza Z.H., McManus M.T. (2000) Cell separation processes in plants: models, mechanisms and manipulation. *Ann. Bot.* 86: 223-235.
91. Kambal A.E. (1969) Flower drop and fruit set in field beans, *Vicia faba* L. *J. Agric. Sci.* 72: 131-138.
92. Fakir M.S.A., Mondal M.M.A., Ismal M.R., Ashrafuzzaman M. (2011) Flowering pattern and reproductive efficiency in mungbean. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 966-970.
93. Couzigou J.M., Magne K., Mondy S., Cosson V., Clements J., Ratet P. (2016) The legume *NOOT-BOP-COCH-LIKE* genes are conserved regulators of abscission, a major agronomical trait in cultivated crops. *New Phytol.* 209: 228-240.
94. Prusiński J., Borowska M. (2002) Biological potential of legumes and its application. Part I. The using of growth regulators in the cultivation of legumes. *Plant Breed. Seed Sci.* 2: 33-38.
95. Addicott F.T. (1982) Anatomy of abscission. W: Addicott F.T. (red.), *Abscission*, Berkeley: University of California Press.
96. Estornell L.H., Agustí J., Merelo P., Talón M., Tadeo F.R. (2013) Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* 199-200: 48-60.
97. Sexton R., Roberts J.A. (1982) Cell biology of abscission. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 133-162.
98. Niederhuth C.E., Cho S.K., Seitz K., Walker J.C. (2013) Letting Go is never easy: abscission and receptor-like protein kinases. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 1251-1263.
99. Kim S.J., Brandizzi F. (2014) The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant Cell Physiol.* 55: 687-693.
100. Cho S.K., Larue C.T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.L., Zhang S., Walker J.C. (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15629-15634.
101. Shi C.L., Stenvik G.E., Vie A.K., Bones A.M., Pautot V., Proveniers M., Aalen R.B., Butenko M.A. (2011) *Arabidopsis* class I KNOTTED-Like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway. *Plant Cell* 23: 2553-2567.
102. Butenko M.A., Patterson S.E., Grini P.E., Stenvik G.E., Amundsen S.S., Mandal A., Aalen R.B. (2003) INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell* 15: 2296-2307.
103. Stø I.M., Orr R.J.S., Fooyontphanich K., Jin X., Knutsen J.M.B., Fischer U., Tranbarger T.J., Nardal I., Aalen R.B. (2015) Conservation of the abscission signaling peptide IDA during Angiosperm evolution: Withstanding genome duplications and gain and loss of the receptors HAE/HSL2. *Front. Plant Sci.* 6: 931.
104. Stenvik G.E., Tandstad N.M., Guo Y., Shi C.L., Kristiansen W., Holmgren A., Clark S.E., Aalen R.B., Butenko M.A. (2008) The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *Plant Cell* 20: 1805-1817.
105. Butenko M.A., Shi C.L., Aalen R.B. (2012) KNAT1, KNAT2 and KNAT6 act downstream in the IDA-HAE/HSL2 signaling pathway to regulate floral organ abscission. *Plant Signal. Behav.* 7: 135-138.
106. Tranbarger T.J., Tucker M.L., Roberts J.A., Meir S. (2017) Editorial: Plant Organ Abscission: From Models to Crops. *Front. Plant Sci.* 8: 196.

107. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J. (2015a) Molecular cloning of the *BLADE-ON-PETIOLE* gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. J. Plant Physiol. 179: 35-39.
108. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J. (2015b) Profiling the *BLADE-ON-PETIOLE* gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. Acta Physiol. Plant. 37: 220.
109. Ohkuma K., Lyon J.L., Addicott F.T., Smith O.E. (1963) Abscisin II, an abscission- accelerating substance from young cotton fruit. Science 142: 1592-1593.
110. Addicott F.T., Lyon J.L., Ohkuma K., Thiessen W.E., Carns H.R., Smith O.E., Cornforth J.W., Milborrow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1968) Absciscic acid: a new name for abscisin II (dormin). Science 159: 1493.
111. del Campillo E., Bennett A.B. (1996) Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. Plant Physiol. 111: 813-820.
112. Kalaitzis P., Solomos T., Tucker M.L. (1997) Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. Plant Physiol. 113: 1303-1308.
113. Bonghi C., Rascio N., Ramina A., Casadoro G. (1992) Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. Plant Mol. Biol. 20: 839-848.
114. Roongsattham P., Morcillo F., Jantasuriyarat C., Pizot M., Moussu S., Jayaweera D., Collin M., Gonzalez-Carranza Z.H., Amblard P., Tregear J.W., Tragoonrungs S., Verdeil J.L., Tranbarger T.J. (2012) Temporal and spatial expression of polygalacturonase gene family members reveals divergent regulation during fleshy fruit ripening and abscission in the monocot species oil palm. BMC Plant Biol. 12: 150.
115. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Świdziński M., de Dios Alché J., Nowakowska A., Kopcewicz J. (2016) The influence of abscisic acid on the ethylene biosynthesis pathway in the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus*. J. Plant Physiol. 206: 49-58.
116. Addicott F.T., Lynch R.S., Carns H.R. (1955) Auxin gradient theory of abscission regulation. Science 121: 644-645.
117. Morgan P.W., Hall W.C. (1964) Accelerated release of ethylene by cotton following application of indolyl-3-acetic acid. Nature 201: 99.
118. Jones M., Woodson W. (1999) Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation. Plant Physiol. 119: 755-764.
119. Patharkar O.R., Walker J.C. (2016) Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. Plant Physiol. 172: 510-520.
120. Zhang X., Xu X., Yu Y., Chen C., Wang J., Cai C., Guo W. (2016) Integration analysis of MKK and MAPK family members highlights potential MAPK signaling modules in cotton. Sci. Rep. 6: 29781.
121. Jagodzki P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018) Mitogen-Activated Protein Kinase cascades in plant hormone signaling. Front. Plant Sci. 9: 1387.
122. Roberts J.A., Schindler C.B., Tucker G.A. (1984) Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. Planta 160: 159-163.
123. Meir S., Philosoph-Hadas S., Sundaresan S., Selvaraj K.S., Burd S., Ophir R., Kochanek B., Reid M.S., Jiang C.Z., Lers A. (2010) Microarray analysis of the abscission- related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. Plant Physiol. 154: 1929-1956.
124. Bar-Dror T., Dermastia M., Kladnik A., Znidaric M.T., Novak M.P., Meir S., Burd S., Philosoph-Hadas S., Ori N., Sonogo L., Dickman M.B., Lers A. (2011) Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. Plant Cell 23: 4146-4163.
125. Frankowski K., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., de Dios Alché J., Kopcewicz J., Wilmowicz E. (2017) Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. Acta Soc. Bot. Pol. 86: 3540.
126. Lee Y., Derbyshire P., Knox J.P., Hvorslef-Eide A.K. (2008) Sequential cell wall transformations in response to the induction of a pedicel abscission event in *Euphorbia pulcherrima* (poinsettia). Plant J. 54: 993-1003.
127. Taylor J.E., Tucker G.A., Laslett Y., Smith C.J.S., Arnold C.M., Watson C.F., Schuch W., Grierson D., Roberts J.A. (1990) Polygalacturonase expression during leaf abscission of transgenic and normal tomato plants. Planta 183: 133-138.
128. Ha C.M., Jun J.H., Nam H.G., Fletcher J.C. (2004) *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45: 1361-1370.
129. Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes. Plant Cell. 24: 4498- 4510.
130. McKim S.M., Stenvik G.E., Butenko M.A., Kristiansen W., Cho S.K., Hepworth S.R., Aalen R.B., Haughn G.W. (2008) The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. Development 135: 1537-1546.

131. Wu X.M., Yu Y., Han L.B., Li C.L., Wang H.Y., Zhong N.Q., Yao Y., Xia G.X. (2012) The tobacco *BLADE-ON-PETIOLE2* gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant Physiol.* 159: 835-850.
132. Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. (2012) *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes. *Plant Cell.* 24: 4498-4510.
133. Burch-Smith T.M., Brunkard J.O., Choi Y.G., Zambryski P.C. (2011) Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 1451-1460.
134. Sager R., Lee J.Y. (2014) Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* 65: 6337-6358.
135. Evensen K.B., Page A.M., Stead A.D. (1993) Anatomy of ethylene induced petal abscission in *Pelargonium x hortorum*. *Ann. Bot.* 71: 559-566.
136. Eo J., Lee B.Y. (2009) Anatomical and histological changes in the fruit abscission zone of water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC.). *Hort. Environ. Biotechnol.* 52: 315-320.
137. Santiago J., Brandt B., Wildhagen M., Hohmann U., Hothorn L.A., Butenko M.A., Hothorn M. (2016) Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. *eLife* 5: e15075.
138. Meir S., Philosoph-Hadas S., Riov J., Tucker M.L., Patterson S.E., Roberts J.A. (2019) Re-evaluation of the ethylene-dependent and -independent pathways in the regulation of floral and organ abscission. *J. Exp. Bot.* 70: 1461-1467.
139. Payton S., Fray R.G., Brown S., Grierson D. (1996) Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol. Biol.* 31: 1227-1231.
140. Lanahan M.B., Yen H.C., Giovannoni J.J., Klee H.J. (1994) The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521-530.
141. Butenko M.A., Stenvik G.E., Alm V., Saether B., Patterson S.E., Aalen R.B. (2006) Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter:reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant. *J. Exp. Bot.* 57: 3627-3637.
142. Patterson, S. E. and Bleeker, A. B. (2004). Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134,194-203.
143. Ying P., Li C., Liu X., Xia R., Zhao M., Li J. (2016) Identification and molecular characterization of an *IDA-like* gene from litchi, *LcIDL1*, whose ectopic expression promotes floral organ abscission in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 6: 37135.
144. Agustí J., Gimeno J., Merelo P., Serrano R., Cercós M., Conesa A., Talón M., Tadeo F.R. (2012) Early gene expression events in the laminar abscission zone of abscission-promoted citrus leaves after a cycle of water stress/rehydration: involvement of CitbHLH1. *J. Exp. Bot.* 63: 6079-6091.
145. Wojtaszek P. (2012) Cell wall. In: *Biology of plant cell* (Wojtaszek P., Woźny A., Ratajczak L., eds) 227-270. PWN, Warsaw.
146. Audran C., Borel C., Frey A., Sotta B., Meyer C., Simonneau T., Marion-Poll A. (1998) Expression studies of the *zeaxanthin epoxidase* gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 118: 1021-1028.
147. Thompson A.J., Jackson A.C., Parker R.A., Morpeth D.R., Burbidge A., Taylor I.B. (2000) Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of *zeaxanthin epoxidase* and *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Mol Biol.* 42: 833-845.
148. Tudela D., Primo-Millo E. (1992) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in *Cleopatra mandarin* (Citrus reshni Hort. Ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol.* 100: 131-137.
149. Nomura Y., Harada T., Morita S., Kubota S., Koshioka M., Yamaguchi H., Tanase K., Yagi M., Onozaki T., Satoh S. (2013) Role of ABA in triggering ethylene production in the gynoecium of senescing carnation flowers: changes in ABA content and expression of genes for ABA biosynthesis and action. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 242-254.
150. Eccher G., Botton A., Dimauro M., Boschetti A., Ruperti B., Ramina A. (2013) Early induction of apple fruitlet abscission is characterized by an increase of both isoprene emission and absciscic acid content. *Plant Physiol.* 161: 1952-1969.
151. Botton A., Eccher G., Forcato C., Ferrarini A., Begheldo M., Zermiani M., Moscatello S., Battistelli A., Velasco R., Ruperti B., Ramina A. (2011) Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. *Plant Physiol.* 155: 185-208.
152. Xu S.L., Rahman A., Baskin T.I., Kieber J.J. (2008) Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3065-3079.
153. Tsang D.L., Edmond C., Harrington J.L., Nühse T.S. (2011) Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway. *Plant Physiol.* 156: 596-604.
154. Tsuchisaka A., Yu G., Jin H., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang X., Gao S., Theologis A. (2009) A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 183: 979-1003.

155. Taylor J.E., Whitelaw C.A. (2001) Signals in abscission. *New Phytol.* 151: 323-340.
156. Frankowski K., Kęsy J., Wojciechowski W., Kopcewicz J. (2009) Light- and IAA-regulated ACC synthase gene (*PnACS*) from *Pharbitis nil* and its possible role in IAA-mediated flower inhibition. *J. Plant Physiol.* 166: 192-202.
157. Wilmowicz E., Frankowski K., Kęsy J., Glazińska P., Wojciechowski W., Kućko A., Kopcewicz J. (2013) The role of *PnACO1* in light- and IAA-regulated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Acta Physiol. Plant.* 35: 801-810.
158. Shi Z., Jiang Y., Han X., Liu X., Cao R., Qi M., Xu T., Li T. (2017) SIPIN1 regulates auxin efflux to affect flower abscission process. *Sci Rep.* 7: 14919.
159. Jin X., Zimmermann J., Polle A., Fischer U. (2015) Auxin is a long-range signal that acts independently of ethylene signaling on leaf abscission in *Populus*. *Front. Plant Sci.* 6: 634.
160. Hagemann M.H., Winterhagen P., Hegele M., Wünsche J.N. (2015) Ethephon induced abscission in mango: physiological fruitlet responses. *Front. Plant Sci.* 6: 706.
161. Kopcewicz J. (2012) Generative development. In: *Plant physiology* (Kopcewicz J., Lewak S., eds.) 539-575. PWN, Warsaw.
162. Kęsy J., Maciejewska B., Sowa M., Szumilak M., Kawałowski K., Borzuchowska M., Kopcewicz J. (2008) Ethylene and IAA interactions in the inhibition of photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *Plant Growth Regul.* 55: 43-50.
163. Kęsy J., Wilmowicz E., Maciejewska B., Frankowski K., Glazińska P., Kopcewicz J. (2011) Independent effects of jasmonates and ethylene on inhibition of *Pharbitis nil* flowering. *Acta Physiol. Plant.* 33: 1211-1216.
164. Wilmowicz E., Frankowski K., Glazińska P., Kęsy J., Wojciechowski W., Kopcewicz J. (2011) Cross talk between phytohormones in the regulation of flower induction in *Pharbitis nil*. *Biol. Plant.* 55: 757.
165. Frankowski K., Wilmowicz E., Kęsy J., Glazińska P., Wojciechowski W., Kućko A., Kopcewicz J. (2013) The role of *PnACO1* in light- and IAA-regulated flower inhibition in *Pharbitis nil*. *Acta Physiol. Plant.* 35: 801-810.
166. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2014) Involvement of the IAA-regulated ACC oxidase gene *PnACO3* in *Pharbitis nil* flower inhibition. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 56: 90-96.
167. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Świeżawska B., Kopcewicz J. (2014) Ethylene, auxin, and abscisic acid interactions in the control of photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Biol. Plant.* 58: 305-310.
168. Kućko A., Czeszewska-Rosiak G., Wolska M., Glazińska P., Kopcewicz J., Wilmowicz E. (2017) Auxin increases the *InJMT* expression and the level of JAME: inhibitor of flower induction in *Ipomoea nil*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86: 3518.
169. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kopcewicz J. (2017) Photoperiod and ethylene-dependent expression of gibberellin biosynthesis gene *InEKO1* during flower induction of *Ipomoea nil*. *Biol. Plant.* 62: 194-199.
170. Marciniak K., Kućko A., Wilmowicz E., Świdziński M., Kęsy J., Kopcewicz J. (2018) Photoperiodic flower induction in *Ipomoea nil* is accompanied by decreasing content of gibberellins. *Plant Growth Regul.* 84: 395-400.
171. Schuman M.C., Meldau S., Gaquerel E., Diezel C., McGale E., Greenfield S., Baldwin I.T. (2018) The active jasmonate JA-Ile regulates a specific subset of plant jasmonate-mediated resistance to herbivores in nature. *Front. Plant Sci.* 9: 787.
172. Yan J., Li S., Gu M., Yao R., Li Y., Chen J., Yang M., Tong J., Xiao L., Nan F., Xie D. (2016) Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-iso-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 172: 2154-2164.
173. Wilmowicz E., Kućko A., Frankowski K., Świdziński M., Marciniak K., Kopcewicz J. (2016a) Methyl jasmonate-dependent senescence of cotyledons in *Ipomoea nil*. *Acta Physiol. Plant.* 38: 222.
174. Wilmowicz E., Kućko A., Frankowski K., Zabrocka-Nowakowska B., Panek K., Kopcewicz J. (2016b) Wounding stimulates allene oxide synthase gene and increases the level of jasmonic acid in *Ipomoea nil* cotyledons. *Acta Soc. Bot. Pol.* 85: 3491.
175. Wilmowicz E., Frankowski K., Grzegorzewska W., Kęsy J., Kućko A., Banach M., Szmidt-Jaworska A., Saniewski M. (2014) The role of jasmonates in the formation of a compound of chalcones and flavans with phytoalexin-like properties in mechanically wounded scales of *Hippeastrum x Hybr.* Bulbs. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 56: 54-58.
176. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Mączkowski R., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) The generative development of traditional and epigonal cultivars of *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius* grown under different phytotron conditions. *Plant Breed. Seed Sci.* 69: 47-57.
177. Marciniak K., Kućko A., Wilmowicz E., Świdziński M., Przedniczek K., Kopcewicz J. (2018) Gibberellic acid affects the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus* via cooperation with the ethylene precursor independently of abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 229: 170-174.
178. Wilmowicz E., Kućko A., Golińska P., Burchardt S., Przywieczerski T., Świdziński M., Brzozowska P., Kapuścińska D. (2020) Absciscic acid and ethylene in the control of nodule-specific response on drought in yellow lupine. *Environ. Exp. Bot.* 169: 10390.

201. Leymarie J., Vitkauskaitė G., Hoang H.H., Gendreau E., Chazoule V., Meimoun P., Corbineau F., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiol.* 5: 96-106.
202. Liu Y., Ye N., Liu R., Chen M., Zhang J. (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* 61: 2979-2990.
203. Fath A., Bethke P.C., Jones R.L. (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol.* 126: 156-166.
204. Borges F., Martienssen R.A. (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 727-741.
205. Penfield S., Josse E.M., Kannangara R., Gilday A.D., Halliday K.J., Graham I.A. (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr. Biol.* 15:1998-2006.
206. Wilmowicz E., Kućko A., Ostrowski M., Panek K. (2018) *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION*-like is an abscission associated and phytohormone-regulated gene in flower separation of *Lupinus luteus*. *Plant Growth Regul.* 85: 91-100.
207. Kućko A., Wilmowicz E., Ostrowski M. (2019) Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *J. Plant Physiol.* 236: 51-60.
208. Kućko A., Smoliński D.J., Wilmowicz E., Florkiewicz A., Alché J. (2019) Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* 256: 1173-1183.
209. Wilmowicz E., Kućko A., Burchardt S., Przywieczerski T. (2019) Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3731.
210. Kućko A., Wilmowicz E., Pokora W., Alché J. (2020) Disruption of auxin gradient in abscission zone area evokes asymmetrical changes leading to flower separation in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 3815.
211. Wilmowicz E., Kućko A., Sidłowska M., Frankowski K., Maciejewska B., Glazińska P., Kopcewicz J. (2012a) The role of jasmonates in the regulation of generative development in plants. *Kosmos* 61: 603-612.
212. Wilmowicz E., Frankowski K., Sidłowska M., Kućko A., Kęsy J., Gąsiorowski A., Glazińska P., Kopcewicz J. (2012b) Jasmonate biosynthesis: latest discoveries. *Advances in Biochemistry* 58: 26-33.
213. Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Sidłowska M., Kęsy J., Kopcewicz J. (2013) Abscissic acid metabolism. *Advances in Biochemistry* 59: 83-88.
214. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2013) Protein kinases in plant hormone signaling pathways. *Advances in Cell Biology* 40: 253-294.
215. Kućko A., Wilmowicz E., Frankowski K., Piotrowski K., Kęsy J., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) Auxin biosynthesis pathways. *Advances in Cell Biology* 41: 121-128.
216. Marciniak K., Wilmowicz E., Kućko A., Kęsy J., Kopcewicz J. (2014) Phytohormone interactions in the control of initial phases of plant growth and development (embryogenesis, seed germination, shoot and root apical meristem). *Advances in Cell Biology* 41: 79-98.
217. Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Kęsy J., Sidłowska M., Studzińska-Czyszka A., Marciniak K., Kopcewicz J. (2014) The mechanism of organ abscission in plants. *Advances in Cell Biology* 41: 599-615.
218. Wilmowicz E., Marciniak K., Kućko A., Kopcewicz J. (2016) Hormonal regulation of plant ontogenesis. *Management of Nature Conservation in Forests* 10: 84-100.
219. Wilmowicz E., Kućko A., Marciniak K., Gadzikowska A., Przedniczek K., Kopcewicz J. (2017a) The current state of knowledge concerning the regulation of the abscission zone formation and functioning in the flowers of *Lupinus luteus*. *Bulletin of Plant Breeding and Acclimatization Institute* 281: 85-90.
220. Wilmowicz E., Kućko A., Zabrocka-Nowakowska B., Przedniczek K., Florkiewicz A., Panek K. (2017b) The hormonal control of nodulation. *Advances in Cell Biology* 44: 137-152.
221. Wilmowicz E., Kućko A., Kopcewicz J. (2017c) The mechanisms of tree defenses in response to pathogens attack. *Management of Nature Conservation in Forests* 11: 41-54.
222. Florkiewicz A., Kućko A., Panek K., Czeszewska-Rosiak G., Wolska M., Wilmowicz E. (2018) Dual role of abscissic acid in the control of photoperiodic flower induction in *Ipomoea nil* L. In: Research and development of young scientists in Poland: natural science (Jędrzej Nyćkowiak, Jacek Leśny, eds). Poznań: Young Scientists, 58-63.

Agata Kućko