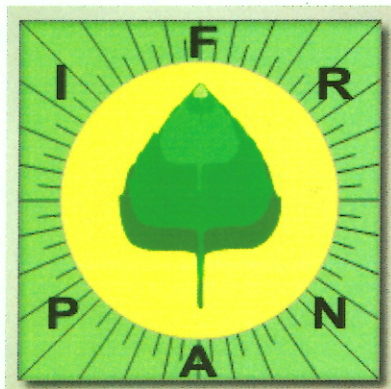


AUTOREFERAT
W JĘZYKU POLSKIM

Summary of professional achievements
(version in Polish)

Dr EWA DUBAS

**Instytut Fizjologii Roślin
im. Franciszka Górskiego PAN**



KRAKÓW 2014

SPIS TREŚCI

ODPIS DYPLOMU	3
I. ŻYCIORYS NAUKOWY	4
II. DANE BIOGRAFICZNE I DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA	6
1. Dane osobowe.....	6
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	6
3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych.....	6
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16. Ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz. 595 ze zm.).....	7
a. Tytuł	7
b. Spis prac.....	7
c. Omówienie celu naukowego prac.....	8
d. Perspektywy dalszych badań.....	18
5. Omówienie pozostałej tematyki badawczej.....	19
a. Główne kierunki prowadzonych badań.....	19
b. Ważniejsze wyniki prowadzonych badań.....	20
6. Zestawienie najważniejszych osiągnięć naukowych - Sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego w tabelach.....	30
- Informacje o uczestnictwie w konferencjach naukowych.....	32
- Recenzje.....	32
- Informacje o uczestnictwie w projektach badawczych	32
- Informacje o współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi za granicą	32
- Informacje o działalności popularyzującej naukę.....	33
- Informacje o działalności organizatorskiej.....	33
- Informacje o działalności dydaktycznej.....	33
- Nagrody i wyróżnienia.....	33
III. JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI NAUKOWYCH, STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, O KTÓRYM MOWA W ARTYKULE 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)	34
Deklaracje.....	36

IV. WYKAZ INNYCH PRAC NAUKOWYCH NIE WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA, O KTÓRYM MOWA W ARTYKULE 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65).....	64
1. Oryginalne prace naukowe.....	64
- Prace wykonane przed uzyskaniem stopnia doktora...	64
- Prace wykonane po uzyskaniu stopnia doktora.....	65
2. Rozdziały w podręcznikach.....	68
3. Inne publikacje lub twórcze opracowania dzieł artystycznych.....	69
4. Streszczenia w materiałach konferencyjnych.....	69
5. Wykonane recenzje książek i artykułów w czasopismach naukowych.....	76
6. Udział w konferencjach naukowych.....	76
V. UDZIAŁ W REALIZACJI PROJEKTÓW BADAWCZYCH.....	77
VI. ODBYTE KURSY I SZKOLENIA.....	80
- Kursy i szkolenia za granicą.....	80
- Kursy i szkolenia w Polsce.....	81
VII. INNE WAŻNE INFORMACJE.....	82
VIII. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA W ZAKRESIE DYDAKTYKI I NAUKI.....	83
- Działalność dydaktyczna.....	83
- Opieka naukowa nad magistrantami.....	84
- Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego.....	84
IX. NAGRODY I WYRÓŻNIENIA NAUKOWE.....	87



RZECZPOSPOLITA POLSKA

UNIwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

.(nazwa jednostki organizacyjnej szkoły wyższej albo innej placówki naukowej)

DYPLOM

Ewa Dubas

(imię i nazwisko)

URODZONA DZIA 26 marca 1976 R. W Dębicy

NA PODSTAWIE PRZEDSTAWIONEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Wykorzystanie kultury izolowanych mikrospor rzepaku (*Brassica rapa* L. subsp. *oleifera* DC) jako modelu w badaniach nad wczesnymi etapami rozwoju zarodkowego”

ORAZ PO ZŁOŻENIU WYMAGANYCH EGZAMINÓW UZYSKAŁA STOPIEŃ NAUKOWY

DOKTORA

NAUK biologicznych

w zakresie biologii

(bliższe określenie nazwy stopnia)

NADANY UCHWAŁĄ RADY Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi

Uniwersytetu Jagiellońskiego

(nazwa rady i nazwa szkoły wyższej albo innej placówki naukowej)

Z DNIA 18 września 2007 R.

PROMOTOR W PRZEWODZIE DOKTORSKIM:

dr hab. Maria Wędzony

RECENZENCI W PRZEWODZIE DOKTORSKIM:

prof. dr hab. Elżbieta Kuta

prof. dr hab. Józef Bednara

Kraków, dnia 5 listopada 2007 r.

(miejsowość, data)

Za zgodność
odpisu z oryginałem.

05.11.2007

data

podpis

rektor

/-/ prof. dr hab. Karol Musioł

dziekan

/-/ prof. dr hab. Kazimierz Krzemień

Nr DA-4013/22.19/07

ŻYCIORYS

Urodziłam się 26 marca 1976 r. w Dębicy, dzisiejszym województwie Podkarpackim. W domu rodzinnym już od najmłodszych lat zdradzałam zainteresowanie przyrodą, odznaczając się wrażliwością na jej piękno i złożoność. Mając siedem lat, zaczęłam uczęszczać do szkoły podstawowej, biorąc udział w polonistycznych, matematycznych oraz biologicznych olimpiadach krajowych na szczeblach szkolnym, międzyszkolnym i wojewódzkim. Od roku 1990 uczęszczałam do Liceum Ogólnokształcącego w Dębicy. Świadectwo dojrzałości otrzymałam w 1995 r., kończąc z wyróżnieniem klasę maturalną o profilu biologiczno-chemicznym.

Dodatkowo, przez cały okres edukacji podstawowej i średniej fascynował mnie taniec ludowy. Należałam do dwóch znanych w kraju i za granicą dębickich zespołów ludowych, jako dziecko do zespołu „Igloopolanie”, a później do zespołu „Małopolska”.

W 1995 r., zgodnie ze swoimi zainteresowaniami, podjęłam pięcioletnie studia wyższe na Uniwersytecie Warszawskim na Wydziale Biologii. Ukończyłam je w Krakowie na kierunku Biologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2001 r. Godząc obowiązki studentki i matki od 1997 roku, dyplom z nadaniem tytułu magistra otrzymałam 25 czerwca 2001 roku.

Po obronie pracy magisterskiej pod tytułem „Zróżnicowanie kariologiczne w rodzaju *Luzula*”, wykonanej pod kierunkiem pani prof. dr hab. Elżbiety Kuty w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin UJ, rozpoczęłam studia III stopnia w Środowiskowym Studium Doktoranckim przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Od 2001 roku, będąc słuchaczem tego Studium, podjęłam pracę na część etatu jako biolog w Instytucie Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Równocześnie, w tej samej jednostce, rozpoczęłam realizację pracy doktorskiej pod kierunkiem pani prof. dr hab. Marii Wędzony. Pracując, w nowo stworzonym Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN, zdobyłam nowe doświadczenie zawodowe liczące się w kraju i za granicą z zakresu wpływu stresu abiotycznego na indukcję androgenezę u pszenżyta, żyta oraz rzepaku.

Jako doktorantka, w latach 2003/2004 odbyłam pierwszy sześciomiesięczny staż na Uniwersytecie Wageningen (Holandia) oraz w ośrodku Plant Research International (Wageningen) w ramach unijnego projektu CropStress QLK5-CT-2002-30424, gdzie analizowałam rolę mikrotubularnego cytoszkieletu podczas rozwoju struktur podobnych do zarodków w embriogennej kulturze mikrospor rzepaku. W okresie od października do grudnia 2004 roku odbyłam kolejny staż w tych samych ośrodkach zagranicznych w ramach projektu COST 851 Short-Term Scientific Missions (STSM), kontynuując zagadnienia badawcze rozpoczęte podczas pierwszego pobytu.

Systematycznie angażuję się w rozwój naukowy IFR PAN. Na początku 2005 roku uczestniczyłam w zorganizowaniu laboratorium immunocytochemii i hybrydyzacji *in situ* w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN w Krakowie, wdrażając metody hodowli *in vitro* mikrospor rzepaku oraz próbując zaadaptować metody immunocytochemiczne znakowania białek w komórce rzepaku oraz pszenżyta *in vivo* oraz *in vitro*. Cztery lata później koordynowałam w macierzystym Zakładzie IFR PAN prace nad założeniem pracowni mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Z dotacji MNiSW pilotowałam zakup wyposażenia mikroskopu fluorescencyjnego w system konfokalnym C1, jako specjalnego urządzenia badawczego, które w kolejnych latach było wykorzystywane do licznych badań własnych oraz innych, prowadzonych w zespołach naukowych IFR PAN oraz we współpracy z innymi uczelniami krakowskimi (Uniwersytet Jagielloński, Uniwersytet Pedagogiczny, Uniwersytet Rolniczy, Politechnika Krakowska).

Moje zainteresowania naukowe koncentrują się głównie wokół zagadnień związanych z oddziaływaniem warunków stresowych (biotycznych i abiotycznych) na rozwój rośliny oraz

wokół embriologii eksperymentalnej, obejmującej swoim zakresem kultury *in vitro* pszenżyta, żyta i rzepaku oraz z zakresu zastosowania tych kultur w badaniach podstawowych wczesnego rozwoju zarodkowego, z wykorzystaniem technik immunocytochemicznych oraz mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Badania z tego zakresu realizowane są w postaci licznych naukowych staży za granicą, projektów badawczych i statutowych zadań badawczych w IFR PAN oraz współpracy z zespołami w kraju (w postaci umów komercyjnych z hodowcami) i za granicą (Słowacja, Belgia, Austria, Czechy, Hiszpania). Po uzyskaniu stopnia doktora i objęciu stanowiska adiunkta w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN odbyłam w sumie 12 staży zagranicznych (The Institute of Plant Genetics and Biotechnology na Słowacji, Plant Systems Biology Department (VIB) Uniwersytetu Ghent w Belgii, CSIC w Hiszpanii) o łącznej długości prawie 3 miesiące (20 tygodni). Staże zagraniczne związane były z realizacją 8 projektów naukowych.

Jestem autorką 27 oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach „karentowych” (znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) Web of Sciences Thomas Reuters). Brałam udział w realizacji 24 projektów badawczych, w tym 3 unijnych: 6+3 UE, 1 SAIA, 5 PAN bezdewizowa, 9 MNiSW/NCN. W latach 2002-2014 wygłosiłam w sumie 50 referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych, na seminariach naukowych w kraju i za granicą prezentując również 62 postery. Recenzuję książki i artykuły naukowe w czasopismach (J Exp Bot, Protoplasma, Plant Cell Rep, Plant Reproduction, PCTOC, Plant Breeding).

Byłam wielokrotnie proszona o prowadzenie zajęć dydaktycznych w uniwersyteckich ośrodkach naukowych. Realizowałam kursy na studiach podyplomowych z Biologii Molekularnej z Elementami Biotechnologii. Studia podyplomowe prowadzone były w ramach 14 zadania „Uruchomienie studiów z Biologii Molekularnej z Elementami Biotechnologii” w projekcie „Rozwój potencjału dydaktycznego Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie” współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego 2009/10 i 2010/11. Sprawowałam opiekę nad 6 pracami magisterskimi studentów Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie, oraz 2 pracami magisterskimi zrealizowanymi w IFR PAN w 2013 roku. W chwili obecnej jestem promotorem pomocniczym 2 prac doktorskich: (1) pracy doktorskiej pt. „Wykorzystanie androgenezy, gynogenezy oraz poliploidyzacji do przywracania płodności roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deu.)” w otwartym przewodzie pana mgr inż. Przemysława Kopcia na Uniwersytecie Rolniczym, oraz (2) pracy doktorskiej pana mgr Macieja Szczyrka pt. „Zmiany fluorescencji chlorofilu u odpornych i wrażliwych na suszę mieszańców kukurydzy poddanych działaniu stresu nadmiaru lub niedoboru wody w glebie i zbitości gleby” realizowanej w Międzynarodowym Studium Doktoranckim Nauk Przyrodniczych PAN w Krakowie.

Od kilku lat jestem członkiem Komitetu Zarządu Akcji COST (2014 -2017, 2011-2013) oraz ekspertem zewnętrznym w ocenie międzynarodowych projektów badawczych Fund for Scientific Research – FNRS.

Mój dorobek naukowy został trzykrotnie wyróżniony przez dyrektora IFR PAN za najwyższą liczbę publikacji w grupie młodszych pracowników wydanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej w latach: 2011, 2012 i 2013.



Kraków 20.08.2014.....

Dr Ewa Dubas

1. Imię i Nazwisko: EWA DUBAS

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- tytuł **doktora nauk biologicznych w zakresie biologii**

Tytuł rozprawy: „Wykorzystanie kultury izolowanych mikrospor rzepaku (*Brassica napus* L. subsp. *oleifera*) jako modelu w badaniach nad wczesnymi etapami rozwoju zarodkowego”

Data obrony: 26 czerwiec 2007

Data zatwierdzenia: 18 września 2007

Miejsce przeprowadzenia przewodu: Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, Instytut Biologii

Nazwisko promotora: prof. dr hab. Maria Wędzony

- tytuł **magistra nauk biologicznych, specjalizacja: botanika ogólna**

Tytuł rozprawy: „Zróżnicowanie kariologiczne w rodzaju *Luzula*”

Data obrony: 25 czerwiec 2001

Miejsce: Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, Instytut Biologii, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin

Nazwisko promotora: prof. dr hab. Elżbieta Kuta

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

2007 – obecnie adiunkt w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk *im. Franciszka Górskiego* w Krakowie

2001 – 2007 biolog w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk *im. Franciszka Górskiego* w Krakowie

2001 – 2007 słuchacz Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) * w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie:

- a) **tytuł osiągnięcia naukowego:** Cykl pięciu jednotematycznych publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

„Cytologiczne, molekularne i hormonalne podłoże procesu androgenyzy u roślin”

- b) **autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa: (Podano IF oraz punkty MNiSW według uaktualnionej listy z roku 2013)**

1. **Dubas E.**, Custers J.B.M., Kieft H., Wędzony M., van Lammeren A.A.M. **2011**. Microtubule configurations and nuclear DNA synthesis in microspore derived embryos of *Brassica napus* cv Topas that mimic zygotic embryo development. *Plant Cell Reports* 30: 2105–2116. MNiSW **35 pkt.**, IF/IF²⁰¹³ 2,274/2,51, IC 7.
2. **Dubas E.**, Janowiak F., Krzewska M., Hura T., Żur I. **2013**. Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction. *Plant Cell Rep* 32:1465–1475. MNiSW **35 pkt.**, IF/IF²⁰¹³ 2,509/2,51.
3. **Dubas E.**, Custers J., Kieft H., Wędzony M., van Lammeren A.A.M. **2014**. Characterization of polarity development through 2- and 3-D imaging during the initial phase of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Protoplasma* 251: 103-113. MNiSW **25 pkt.**, IF/IF²⁰¹³ 2,855/2,86.
4. Żur I., **Dubas E***, Krzewska M., Sánchez-Díaz R.A., Castillo A.M., Vallés M.P. **2014**. Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale (\times *Triticosecale* Wittm.), submitted to *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 116(2):261-267. MNiSW **25 pkt.**, IF/IF²⁰¹³ 3,633/3,633. (* autor korespondencyjny)
5. **Dubas E.**, Moravčíková J., Libantová J., Matušíková I., Benkova E., Żur I., Krzewska M. **2014**. The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic *B. napus* microspores and microspore derived embryos. *Protoplasma* 251:1077-1087. MNiSW **25 pkt.**, IF/IF²⁰¹³ 2,86/2,86.

Łączny IF/IF²⁰¹⁴ w/w prac wynosi 14,126/14,37 oraz 145 pkt MNiSW. IF podano wg roku opublikowania oraz wg IF podawanego w roku 2014 za rok 2013 (IF²⁰¹³) w bazie Journal Citation Reports.

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Jako cykl jednolitych tematycznie prac przedstawiam pięć oryginalnych artykułów, których tytuły i autorzy są wymienieni w pkt 4b

Wprowadzenie

Hodowla roślin służy rolnictwu poprzez polepszanie cech dziedzicznych roślin uprawnych, produkcji odmian jakościowo lepszych o zwiększonym plonowaniu. Współczesna hodowla nie mogłaby rozwijać się bez postępu biologicznego w wytwarzaniu roślin o takich cechach agronomicznych, które wiążą się z większym plonem, przy jednoczesnym mniejszym zużyciu pestycydów i energii. Nowe odmiany powinny charakteryzować się wysoką odpornością na stropy biotyczne i abiotyczne, co pozwoli na utrzymanie bioróżnorodności uprawianych odmian. Postęp biologiczny w rolnictwie to najefektywniejszy sposób rozwoju produkcji roślinnej pod względem ilościowym i jakościowym. Nowe, ulepszone odmiany roślin uprawnych są czynnikiem intensyfikującym produkcję rolniczą, która jest przyjazna środowisku i ma zdecydowanie charakter proekologiczny. Warunkiem koniecznym do osiągnięcia powyższych założeń jest wykorzystanie w hodowli metod i technologii nowoczesnych metod biotechnologicznych, opartych na najnowszej wiedzy z zakresu biologii i genetyki (Malepszy 2000; Święcicki i wsp. 2011). Zastosowanie w hodowli kultur *in vitro* przyczynia się między innymi do skrócenia cyklu hodowlanego oraz do zwiększenia efektywności selekcji. W konsekwencji powyższych działań zostają znacząco zredukowane koszty wyhodowania nowych odmian (na przykład u rzepaku o prawie 50%). Ogromną wartość dla rolnictwa stanowi technologia haploidów, które otrzymuje się na drodze andro- lub gynogenezy. Rośliny DHs (ang. double haploids – rośliny o podwojonym genomie) stanowią doskonały materiał wyjściowy w procesie ulepszania roślin, a nie wiąże się to z modyfikacją genetyczną genomu, która do tej pory ma wielu przeciwników i w Polsce jest zakazana. W technologii DH dochodzi do homozygotyzacji, którą tradycyjnie osiąga się przez samozapylenie lub krzyżowanie w bliskim pokrewieństwie w cyklu kilkuletnim. Linie DH, jako formy całkowicie wyrównane, mogą być bezpośrednio zgłaszane do doświadczeń przedrejestracyjnych. Zastosowanie systemu DH uzupełnia tradycyjną hodowlę roślin poprzez skrócenie procesu hodowli o 4-6 lat oraz przyczynia się do postępu ekonomicznego i podniesienia konkurencyjności współczesnej hodowli roślin. Wadą metod otrzymywania DHs jest zależność efektywności indukcji androgenyzy czy gynogenezy od genotypu rośliny oraz ciągle jeszcze niezadawalająca wydajność podwajania liczby chromosomów u uzyskanych haploidów (Devaux i wsp. 1990; Ponitka i wsp. 1999; Ślusarkiewicz-Jarzina, Ponitka 2003; Żur i wsp. 2012, 2014). Opracowania, względnie dopracowania, wymagają metody haploidyacji za pomocą hodowli *in vitro* pylników i izolowanych mikrospor, krzyżowań oddalonych oraz gynogenezy. Zbadania wymaga także mechanizm biologiczny leżący u podstawy indukcji DH. Utrudnienie stanowi silna zależność efektywności procesu indukcji androgenyzy w kulturze pylników i izolowanych mikrospor *in vitro* od genotypu. Wdrażanie technologii produkcji roślin DHs jest coraz bardziej popularne na świecie np. dla pszenicy, jęczmienia czy rzepaku. Niestety, nie ma uniwersalnej metody produkcji DHs dla wielu ważnych gospodarczo gatunków roślin czy odmian, stąd istnieje konieczność opracowania protokołów przydatnych dla szerokiego spektrum genotypów.

Podwojone haploidy uzyskane na drodze androgenyzy dają szansę na ujawnienie się zupełnie nowych cech i poznanie podstawowych mechanizmów biologicznych, kontrolujących proces indukcji embriogenezy. Współczesna wiedza o rozwoju zarodka opiera się głównie na badaniach modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* w oparciu o analizę mutantów

zarodkowych. Z tego względu, duże znaczenie w badaniach nad rozwojem zarodka we wczesnych etapach mają prace przeprowadzone na innych gatunkach roślin, w tym roślin użytkowych. Wykorzystanie w tym celu dodatkowych metod indukcji zarodków, jak androgeniza u rzepaku (*Brassica napus* L.), pozwoli nie tylko na weryfikację wiedzy o mechanizmach genetycznej regulacji zygotycznej embriogenezy *in planta* u *A. thaliana*, ale także przyczyni się do identyfikacji nowych mechanizmów regulacji embriogenezy w warunkach *in vitro* w przypadku innych gatunków. Wykorzystanie do badań modeli kultury pylników oraz zawiesiny mikrospor, jako komórek kompetentnych do podziałów, w wyniku których utworzony zostanie zarodek, przyczyni się do uzyskania cennych informacji na temat cytologicznych, hormonalnych i genetycznych czynników decydujących o zdolności komórek generatywnych do podjęcia realizacji programu rozwoju zarodkowego.

W chwili obecnej mało jest dostępnej literatury na temat **morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania zarodków androgenicznych w zawieszynie mikrospor czy regulacji hormonalnej oraz genetycznej efektywnej indukcji androgenozy**. Z tego względu, w przedstawionym osiągnięciu naukowym, analizie poddane zostały kultura pylników i zawiesina mikrospor zaindukowane do rozwoju sporofitowego. Zakres niniejszych badań został przedstawiony w postaci pięciu prac dotyczących różnych aspektów embriogenezy w kulturach androgenicznych. Prace te mają duże znaczenie dla badań podstawowych i aplikacyjnych. W ramach pracy analizowano wczesną androgenezę (embriogeneza niezygotyczna bez udziału komórki jajowej) w warunkach *in vitro* u pszenżyta (x *Triticosecale* Wittm.) i rzepaku (*Brassica napus* L.). Zastosowane do badań: pylniki oraz izolowane mikrospory stwarzały uniwersalny model w badaniach nad wczesnymi etapami rozwoju zarodka u roślin, do którego dostęp *in planta* jest utrudniony ze względu na liczne warstwy macierzystych tkanek okrywających rozwijający się zarodek. Wyższość prezentowanego modelu nad innymi polega na łatwej osiągalności dużej populacji zarodków w krótkim czasie. Ponadto, w przypadku zawiesiny mikrospor, wyeliminowany jest wpływ tkanki sporofitowej na rozwój zarodka.

Cele badań

Cel główny:

Poznanie mechanizmów indukcji androgenozy w kulturach pylnikowych i izolowanych mikrospor.

Cele szczegółowe:

1. Charakterystyka morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania zarodków androgenicznych w zawieszynie mikrospor rzepaku.
2. Charakterystyka hormonalnej regulacji procesu androgenozy.
3. Charakterystyka molekularnego podłoża indukcji androgenozy.

Rejestrowano złożone procesy biologiczne na poziomie komórki z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej i konfokalnej oraz precyzyjnych instrumentalnych technik biochemicznych i molekularnych (HPLC, test ELISA, elektroforeza, PCR, klonowanie), wykonując analizy:

- a) cyklu komórkowego,
- b) konfiguracji cytoszkieletu,
- c) stopnia polaryzacji komórek/zarodków androgenicznych,
- d) hormonalnej regulacji procesu androgenezy,
- e) podłoża molekularnego w indukcji androgenezy.

Uzyskana wiedza może być wykorzystana w praktycznej hodowli roślin dla dalszego postępu biologicznego w Polsce i na świecie.

Ad 1.

Dubas E., Custers J.B.M., Kieft H., Wędzony M., van Lammeren A.A.M. 2011. Microtubule configurations and nuclear DNA synthesis in microspore derived embryos of *Brassica napus* cv Topas that mimic zygotic embryo development. *Plant Cell Reports* 30: 2105–2116.

Dubas E., Custers J., Kieft H., Wędzony M., van Lammeren A.A.M. 2014. Characterization of polarity development through 2- and 3-D imaging during the initial phase of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Protoplasma* 251: 103-113.

Badania nad charakterystyką proliferacji (podziałów) mikrospor/ziaren pyłku dostarczają ważnych danych na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw replikacji komórek w embriogenezie, pozwalając na zrozumienie istoty procesu androgenezy i projektowanie efektywnej strategii w uzyskiwaniu podwojonych haploidów (**Dubas i wsp. 2011, Dubas i wsp. 2014**). Ponadto, analiza cyklu komórkowego jest podstawową metodą stosowaną w badaniach nad rozwojem, przy użyciu nowoczesnych substancji indukujących proliferację komórek. Praca (**Dubas i wsp. 2014**) to rodzaj uzupełnienia do wcześniejszej publikacji (**Dubas i wsp. 2011**).

Jedną z fundamentalnych cech mikrospor/ziaren pyłku, poddanych traktowaniu indukującemu powstawanie zarodka androgenicznego, jest zdolność komórek do podziału. Aby taki podział mógł nastąpić, mikrospora/ziarno pyłku musi przejść przez proces cyklu komórkowego. Najistotniejszymi etapami cyklu komórkowego jest faza syntezy DNA (faza S), która umożliwia namnożenie materiału genetycznego oraz mitozę (faza M cyklu komórkowego), dzięki której możliwe jest precyzyjne rozdzielenie materiału genetycznego do dwóch komórek potomnych. Czas, który poprzedza syntezę DNA określany jest jako faza G1 (ang. Gap 1), podczas gdy etap następujący po syntezie DNA i poprzedzający mitozę to faza G2 (ang. Gap 2). Badano zróżnicowanie cyklu komórkowego w komórkach męskiej linii gametycznej rzepaku (*B. napus* L var. *napus*) w różnych warunkach termicznych hodowli *in vitro*. Określenie fazy cyklu obserwowanych komórek było możliwe dzięki pulsacyjnemu podaniu bromodeoksyurydyny (BrdU) do hodowli komórek eksponowanych na działanie wysokiej temperatury (32°C). Zasada BrdU jest wbudowywana do DNA tych komórek, które w momencie jej aplikacji syntetyzowały ten kwas nukleinowy. Immunocytochemiczna detekcja BrdU po zakończeniu eksperymentu, a następnie wsteczne prześledzenie losów mikrospor/ziaren pyłku i embriogennych struktur, w których wykryto obecność BrdU, umożliwiło zidentyfikowanie komórek będących w fazie S cyklu komórkowego w chwili rozpoczęcia badania, jak również wyznaczenie komórek będących w fazie G1. Dzięki tak zaplanowanemu eksperymentowi udało się wykazać, że hodowane komórki są heterogenne pod

względem cyklu komórkowego, oraz które z komórek rozwijającego się zarodka synchronicznie wchodzi w podział mitotyczny. Wśród populacji badanych komórek, część mikrospor podlegała intensywnym podziałom w ciągu kilkudziesięciu godzin od momentu aplikacji BrdU, przyczyniając się do uformowania zarodków androgenicznych ze strukturą podobną do suspensora lub klasycznych zarodków androgenicznych bez suspensora. Wykazano, że długość trwania poszczególnych etapów (S- G1-M-G2) różni się w zależności od traktowania komórek w zawieszynie. Zatrzymana początkowo w rozwoju mikrospora (w fazie G1), przechodziła do kolejnych etapów cyklu komórkowego, proliferowała i różnicowała pod wpływem stymulującego działania temperatury. Aby zapobiec ewentualnemu uszkodzeniu cyklu komórkowego w mikrosporach/ziarnach pyłku, uruchomione zostały mechanizmy kontrolujące mitozę, które odpowiedzialne były za prawidłowy rozdział chromosomów do dwóch komórek potomnych. Proces mitozy przebiegającej w komórkach męskiej linii gametycznej okazał się być procesem dynamicznym, w czasie którego dzięki działaniu wrzeczona mitotycznego, ruch chromosomów był ukierunkowany i ściśle kontrolowany tak, by zostały precyzyjnie rozdzielone na dwie równe pule DNA i wprowadzone do komórek potomnych (kariokineza). Następnie dochodziło do rozdziału cytoplazmy na dwie części (cytokineza). Prawidłowość mitozy analizowano w sukcesywnych stadiach rozwoju zarodka za pomocą immunocytochemicznej metody znakowania cytoszkieletu tubulinowego. Mikrotubule aktywnie uczestniczyły w podziałach komórkowych (metafaza, anafaza i telofaza) oraz pełniły niezbędne funkcje w interfazie. W pracy **Dubas i wsp. (2011)** wykazano, że pierwszy podział mitotyczny mikrospor traktowanych łagodnym stresem wysokiej temperatury był lekko asymetryczny i poprzedzała go synteza DNA w jądrze komórkowym (faza S cyklu komórkowego). Pierścień preprofazowy mikrotubul wyznaczał poprzeczną płaszczyznę podziału. W efekcie mitozy powstawała struktura złożona z dwóch komórek różnej wielkości. Większej – komórki bazalnej i mniejszej – komórki apikalnej. Podziały poprzeczne komórki bazalnej prowadziły do uformowania struktury podobnej do suspensora zarodka zygotycznego z komórką apikalną na szczycie. Komórka apikalna pozostawała w fazie G1 cyklu komórkowego z mikrotubulami bez określonej orientacji do momentu mitozy z podłużną płaszczyzną podziału, kiedy suspensor składał się z 3–8 komórek. Komórki rozwijającego się zarodka (suspensor i zarodek właściwy) charakteryzowały mikrotubule kortykalne i cytoplazmatyczne w różnych konfiguracjach charakterystycznych dla poszczególnych faz cyklu komórkowego (pierścień profazowy, wrzeczono kariokinetyczne, włókna anafazy i telofazowe, fragmoplast). Rearanżacje cytoszkieletu mikrotubularnego umożliwiają komórkom prawidłowe funkcjonowanie w warunkach normalnych, a także przystosowywanie się do zmian w środowisku zewnętrznym.

W publikacji **Dubas i wsp. (2014)**, analizy cyklu komórkowego dokonano w oparciu o zawieszinę mikrospor rzepaku, traktowaną przedłużonym stresem wysokiej temperatury (5 dni, 32°C). Pierwszy podział mitotyczny mikrospor traktowanych silnym stresem wysokiej temperatury był symetryczny i poprzedzała go replikacja DNA. W wyniku dalszych podziałów powstawała struktura złożona z wielu synchronicznie lub asynchronicznie dzielących się komórek o wspólnych lub różnych cechach cytologicznych np. zabarwienie heterochromatyny, czy rozkład jąder komórkowych, retikulum endoplazmatycznego (z ang. endoplasmic reticulum; ER) i mitochondriów. Cytoszkielet mikrotubularny kontrolował prawidłowość przebiegu mitozy, przybierając konfiguracje charakterystyczne dla określonych faz podziału jądra i cytoplazmy. Po raz pierwszy opisano strukturę podobną do matriksu zewnątrzkomórkowego (z ang. extracellular matrix; ECM) tworzącą się na powierzchni androgenicznych zarodków pozbawionych suspensora. Obecność włóknistej struktury, podobnej ECM tkanek zwierzęcych, jest prawdopodobnie niezbędne w zarodku do zapewnienia wymiany informacji między poszczególnymi komórkami wielokomórkowego zarodka. Wytworzenie ECM jest ściśle związane z procesami wymagającymi prawidłowego

funkcjonowania cytoszkieletu np.: w cytokinezie, czy utrzymaniu polarności komórek/struktur. ECM wraz z mikrotubulami odgrywa rolę w ukierunkowanym wzroście komórek.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

1. Określenie fazy cyklu mikrospor w różnych warunkach termicznych indukujących rozwój zarodka androgenicznego u rzepaku.
2. Określenie roli cytoszkieletu mikrotubularnego w embriogenezie i morfogenezie.
3. Wykazanie obecności ECM o charakterze włókienkowym na powierzchni zarodków androgenicznych.
4. Pogłębienie wiedzy na temat istoty procesu androgenyzy celem projektowania efektywnej strategii w uzyskiwaniu podwojonych haploidów.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

Opracowanie protokołu immunodetekcji „whole mount” w mikrosporach, zarodkach androgenicznych w całej tkance bez naruszania jej ciągłości.

Powyższe wyniki są nowatorskie ze względu na szczegółową, trójwymiarową (3-D) analizę cyklu komórkowego oraz określenie regulacyjnej roli mikrotubul w sporofitowym rozwoju mikrospor, do złudzenia przypominającym rozwój zarodka zygotycznego z suspensorem.

Ad. 2.

Dubas E., Janowiak F., Krzewska M., Hura T., Żur I. 2013. Endogenous ABA concentration and cytoplasmic membrane fluidity in microspores of oilseed rape (*Brassica napus* L.) genotypes differing in responsiveness to androgenesis induction. *Plant Cell Reports* 32:1465–1475.

Dubas E., Moravčiková J., Libantová J., Matušiková I., Benkova E., Żur I., Krzewska M. 2014. The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic *B. napus* microspores and microspore derived embryos. *Protoplasma* 251:1077-1087.

Opublikowane wyniki w powyższych pracach dotyczą podłoża hormonalnego embriogenezy (**Dubas i wsp. 2013, Dubas i wsp. 2014**). Analizowano udział endogennych substancji wzrostowych w procesie androgenyzy w kulturach zawiesinowych mikrospor. Szczególną uwagę skoncentrowano na zbadaniu funkcji poziomu kwasu abscysynowego (ABA) oraz płynności błon komórkowych w indukcji embriogenezy u odmian rzepaku jarego (*B. napus* L. var. *napus*) o zróżnicowanym potencjale androgenicznym (**Dubas i wsp. 2013**). Wyniki badań własnych oraz dane literaturowe sugerują, iż ABA pełniący ważną funkcję w sygnalizacji komórkowej w odpowiedzi na abiotyczne czynniki stresowe, wpływa na przepuszczalność membran komórkowych i subkomórkowych oraz bierze udział w procesie androgenyzy. Ponieważ transport przez błony komórkowe warunkowany jest stopniem ich płynności, parametr ten może pośrednio wpływać na poziom akumulacji ABA. Badania objęły pomiary efektywności procesu androgenyzy w kulturach zawiesinowych mikrospor w modelowym układzie eksperymentalnym w kontrolowanych warunkach kultury *in vitro*. Wdrożona w IFR PAN technologia izolowanych mikrospor *Brassica napus*, pozwoliła w zależności od zastosowanych termicznych parametrów dotyczących warunków wzrostu roślin macierzystych oraz kultur *in vitro*, na uzyskanie zarodków androgenicznych, których kolejne etapy są odwzorowaniem stadiów rozwojowych zarodków zygotycznych (1 dzień 32°C), lub kontynuacją rozwoju gametofitowego, prowadzącego do wytworzenia dojrzałych ziaren pyłku (1 dzień 18°C). Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie związku pomiędzy

endogennym stężeniem ABA mierzonym techniką ELISA w pąkach kwiatowych i mikrosporach/ziarnach pyłku roślin donorowych, stopniem płynności błon komórkowych (pomiar współczynnika anizotropii fluorescencji DPH) i końcową efektywnością procesu indukcji androgenyzy w kulturach zawieszinowych mikrospor. Na ich podstawie poddana została weryfikacja hipotezy o indukcyjnym wpływie ABA na androgenezę u rzepaku. Ogólnie, zawartość ABA wynosiła <3,5-87,1 fmol na 10^4 mikrospor. Zawartość ABA w pojedynczej komórce ($\varnothing=40\ \mu\text{m}$) odpowiadała 2,1 μM stężeniu ABA. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała istotny wzrost poziomu ABA w mikrosporach traktowanych temperaturą 32°C. Zmiana stężenia ABA w poszczególnych komórkach była skutkiem zmiany pH, indukowanego przez wysoką temperaturę. Usztywnienie błon komórkowych oraz alkalizacja środowiska powodowała akumulację ABA w danym rejonie komórki, co umożliwiała uruchomienie łańcucha sygnałowego regulującego embriogenezę.

W pracy **Dubas i wsp. (2014)** skoncentrowano się na zbadaniu roli endogennych auksyn w przebiegu embriogenezy u wysoko embriogenicznej odmiany rzepaku jarego (*Brassica napus* L.). Auksyny są podstawowymi fitohormonami odpowiedzialnymi za wiele ważnych procesów wzrostu i różnicowania, w tym za prawidłowy przebieg embriogenezy, stymulację podziałów komórek i ich wzrost na długość, kontrolę morfogenezy tkanek i całych organów. Najważniejszą naturalną auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (IAA, ang. Indole-3-Acetic Acid). W omawianej publikacji (**Dubas i wsp. 2014**), po raz pierwszy przedstawiono wpływ wysokiej temperatury na stężenie i rozmieszczenie auksyny w transgenicznym zarodkach androgenicznych rzepaku (*B. napus*) we wczesnych etapach rozwoju, kiedy to tworzy się embrionalna oś zarodka i wiązki przewodzące. Stężenie auksyn oraz regulowany ich przepływ mają kluczowe znaczenie dla licznych procesów fizjologicznych w tym dla wzrostu i różnicowania. Pomiary poziomu auksyny wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Zmiany stężenia auksyny w zarodkach monitorowano za pomocą systemu genów reporterowych DR5 i Dr5rev z biosensorymi GUS i GFP. Analizę wykonano w oparciu o dwa systemy termicznej indukcji embriogenezy *in vitro* w kulturze zawieszinowej mikrospor: (1) umiarkowany stres wysokiej temperatury (1 dzień, 32°C) oraz (2) wydłużone traktowanie wysoką temperaturą (5 dni, 32°C). Różnice w długości traktowania wysoką temperaturą wpływały na odmienny przebieg embriogenezy. W kulturach traktowanych umiarkowanym stresem, powstawały zarodki ze strukturą podobną do suspensora w zarodkach zygocytynych *in planta*. W kulturach traktowanych wysoką temperaturą przez pięć dni, rozwijały się zarodki pozbawione suspensora.

Przeprowadzone obserwacje wykazały, że wysoka temperatura determinuje rozkład auksyn w komórkach inicjalnych (mikrosporach) oraz w zarodkach androgenicznych na najwcześniejszym etapie indukcji embriogenezy. Potwierdzono fakt, że lokalizacja auksyn zmienia się w zależności od stadium rozwoju zarodka. Po raz pierwszy oszacowano endogenne stężenie auksyn w pojedynczej komórce roślinnej. Zawartość IAA w mikrosporach ($\varnothing=40\ \mu\text{m}$) łagodnie traktowanych stresem wysokiej temperatury, odpowiadała stężeniu 1,01 μM . Rozkład auksyn w tych mikrosporach był spolaryzowany i zasadniczo wpłynął na rozwój zarodka z suspensorem. Odmiennie natomiast, w mikrosporach eksponowanych na działanie wysokiej temperatury przez pięć dni, endogenne stężenie auksyn było kilkadziesiąt razy wyższe i nie obserwowano w tych mikrosporach polarnego rozkładu auksyn. Spolaryzowany rozkład auksyn obserwowano w późniejszych etapach rozwoju zarodka otoczonego egzynową ścianą i pozbawionego suspensora, w stadium kilkukomórkowym. Asymetrycznemu rozmieszczeniu auksyn towarzyszyło pęknięcie egzyny i uwalnianie z egzyny zarodka globularnego. Względna zawartość endogennych auksyn w wyróżnionym zarodku z primordiami liściowymi, merystemem wegetatywnym wierzchołka pędu i korzeniem zarodkowym w środowisku z egzogenną auksyną, wykazała, że 1,3 razy więcej auksyn rozmieszczonych jest w liściach niż w korzeniu.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

1. Określenie funkcji auksyn oraz kwasu abscysynowego (ABA) i płynności błon komórkowych w indukcji embriogenezy u odmian rzepaku (*B. napus* L. var. *napus*) o zróżnicowanym potencjale androgenicznym.
2. Wyjaśnienie roli endogennych auksyn w rozwoju zarodka androgenicznego z suspensorem i pozbawionego suspensora.
3. Określenie zawartości endogennych auksyn i ABA w pojedynczej komórce.
4. Pogłębienie wiedzy na temat istoty procesu androgenozy celem opracowania efektywnej metody uzyskiwania podwojonych haploidów.

Powyższe wyniki są nowatorskie ze względu na określenie zawartości poszczególnych hormonów w pojedynczych komórkach oraz wizualizację rozmieszczenia auksyn na poszczególnych etapach embriogenezy w zawieszynie mikrospor *in vitro*.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

1. Opracowanie protokołu transformacji mikrospor rzepaku.
2. Opracowanie protokołów pomiaru ABA i endogennych auksyn w pojedynczych komórkach.

Ad. 3.

Żur I., Dubas E*, Krzewska M., Sánchez-Díaz R.A., Castillo A.M., Vallés M.P. 2014. Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 116(2):261-267.

(* autor korespondencyjny)

Głównym celem pracy było poznanie podłoża genetycznej regulacji procesu androgenozy poprzez ocenę profilu ekspresji genów. Androgeniza jest procesem złożonym, wymagającym zadziałania abiotycznymi czynnikami. Do inicjacji tego procesu u zbóż niezbędne jest w traktowanie niską temperaturą. Uważa się, że androgeniza regulowana jest zrównoważoną ekspresją genów związanych ze stresem. Androgeniczny rozwój zarodka jest dogodnym źródłem wielu informacji na temat podstawowych mechanizmów regulujących rozwój zarodka *in vivo* oraz genów związanych z procesem embriogenezy. Analizowano ekspresję genów w mikrosporach, zaindukowanych do embriogenezy niską temperaturą (4°C przez 3 tygodnie) oraz w pierwszych fazach kultury *in vitro*. W badaniach wykorzystano cztery linie podwojonych haploidów (DH) pszenżyta ozimego (*×Triticosecale* Wittm.) wyselekcjonowane z populacji mapującej F1 Modus × Saka 3006 (na podstawie badań w ramach projektu NN 310452638), charakteryzujące się skrajnym zróżnicowaniem pod względem stopnia podatności na indukcję androgenozy. Analizę ekspresji genów przeprowadzono techniką RT-PCR wg procedury opracowanej przez Muñoz-Amatriaín i wsp. (2006; 2009a, b) i Sánchez (2011). W ramach analizy wykorzystano 20 kombinacji primerów skonstruowanych do amplifikacji genów zidentyfikowanych uprzednio u pszenicy, jako zaangażowane w odpowiedź na stres i kodujących białka aktywne we wczesnych etapach embriogenezy mikrospor. Jako kontrolę zastosowano primery RS322-RS323 dla małej podjednostki rybosomu (18S). Stwierdzono, że większość z zastosowanych primerów specyficznych dla określonych sekwencji genów pszenicy wykazuje wysoki stopień homologii w stosunku do pszenżyta umożliwiając ich zastosowanie w analizie cDNA tego gatunku. Uzyskane wyniki są pierwszymi danymi dotyczącymi wzorca ekspresji genów związanych z indukcją procesu

androgenezy w mikrosporach pszenżyta ozimego. Analiza profilu ekspresji poszczególnych genów pozwoliła również na identyfikację genów specyficznym związanym z indukcją procesu androgenezy oraz genów warunkujących reakcję na stres niskiej temperatury. Zidentyfikowano 13 genów, które można podzielić na różne klasy w zależności od ich działania. Wiele z nich to geny: związane z rozwojem zarodka (*TaME1*, *TaEXPB4*), pylnika (*TAA1b*, *Ta.TPD1-like*), z reakcją na stres niskiej temperatury (*Tad1*), geny kodujące enzymy katalizujące koniugację z glutationem (jako przeciwutleniaczem; *GSTF2*, *GSTA2*), enzymy biorące udział w metabolizmie lipidów (tłuszczów) długołańcuchowych, enzymy rozkładające arabinoksylany opisane jako substancje o charakterze anty- odżywczym (*XIP-R1*), enzymy (kinazy receptorowe) biorące udział w przekazywaniu sygnałów i uruchamianiu całej kaskady procesów prowadzących do embriogenezy (*SERK2*, *SERK1*), czynniki transkrypcyjne zawierające odmienny moduł wiążący DNA nazywany kasetą MADS (ang. MADS box, *Ta-AGL14*), regulatorowe czynniki wpływające na transkrypcję genów kodujących białko wiążące wzmacniacz dla motywu regulatorowego CCAAT i prawdopodobnie uczestniczące w indukowaniu zarodkowego szlaku rozwojowego (*TaNF-YA7*). Zaobserwowano również istotny wpływ czynników genotypowych na profil ekspresji poszczególnych genów (Fig.1 ilustruje przykład ekspresji dla dwóch par primerów oraz kontroli). Należy pamiętać, że często dopiero współdziałanie produktów wielu genów daje właściwy efekt, a nie tylko specyficzne działanie jednego białka.

W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp, w identyfikacji oraz charakterystyce genów związanych z kontrolą wczesnych etapów rozwoju zarodka. Do chwili obecnej jednak brak jest całościowego obrazu genetycznej regulacji przebiegu embriogenezy na poziomie molekularnym. Co więcej, są to pierwsze doniesienia na świecie na temat genetycznej regulacji rozwoju zarodka u pszenżyta.

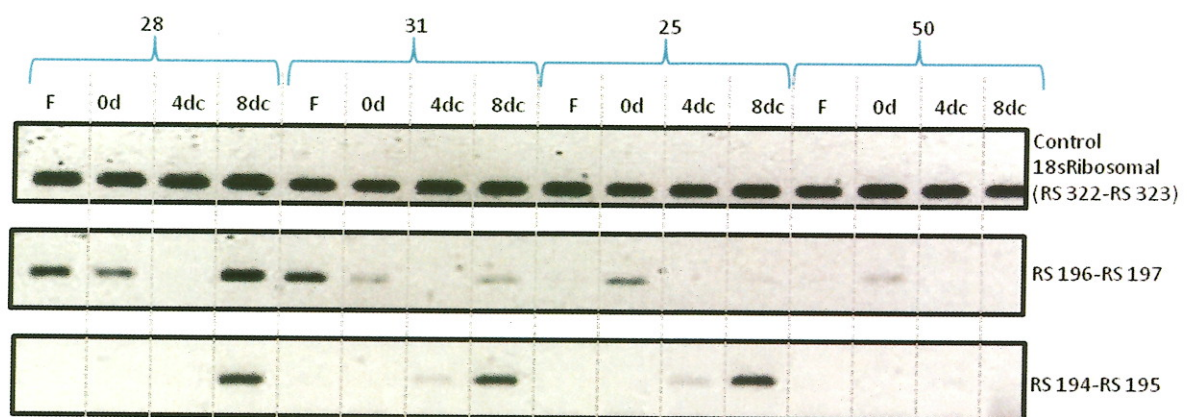


Fig.1. Ekspresja genów uzyskana dla kombinacji primerów: a) RS322-RS323 b) RS 196-RS 197 i c) RS 194-RS 195 dla 4 genotypów pszenżyta ozimego (linie DH 28, 31 o wysokim poziomie indukcji androgenezy, linie DH 25 i 50 o niskim poziomie indukcji androgenezy). F - zawiesiny mikrospor izolowane z pylników pobieranych ze świeżo ściętych kłosów, 0dc – zawiesiny mikrospor izolowane z pylników pobieranych z kłosów poddanych działaniu niskiej temperatury (3 tyg. w 4°C); 4dc, 8dc – zawiesiny mikrospor pobierane odpowiednio po 4 i 8 dniach kultury *in vitro*.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

1. Dostarczenie **po raz pierwszy** informacji na temat wzorca ekspresji genów związanych z indukcją procesu androgenezy w mikrosporach pszenżyta ozimego.
2. Określenie funkcji wybranych genów w indukcji embriogenezy u linii pszenżyta o zróżnicowanym potencjale androgenicznym.
3. Identyfikacja podłoża genetycznej regulacji procesu embriogenezy poprzez ocenę profilu ekspresji wybranych genów specyficznym związanym z indukcją procesu androgenezy oraz genów warunkujących reakcję na stres niskiej temperatury.
4. Pogłębienie wiedzy na temat istoty procesu androgenezy celem opracowania efektywnej strategii w uzyskiwaniu podwojonych haploidów.

Powyższe wyniki są nowatorskie ze względu na identyfikację genów specyficznym związanym z indukcją procesu androgenezy oraz genów warunkujących reakcję na stres niskiej temperatury u pszenżyta.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

Wykazanie, że większość z zastosowanych primerów specyficznym dla określonych sekwencji genów pszenicy wykazuje wysoki stopień homologii w stosunku do pszenżyta umożliwiając ich zastosowanie w analizie cDNA tego gatunku.

Literatura

- Devaux P, Adamski T, Surma M. 1990. Studies on low crossabilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. Plant Breed. 104:305-311.
- Malepszy S. 2000. Wpływ osiągnięć biologii na hodowlę roślin. Kosmos 49(3):421-427.
- Muñoz-Amatriaín M., Svensson J.T., Castillo A.M., Close T.J., Vallés M.P. 2009. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. Funct Integr Genomics 9(3): 311–323.
- Muñoz-Amatriaín M., Svensson J.T., Castillo A.M., Cistué L., Close T.J., Vallés M.P. 2006. Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. Physiol Plantarum 127:551–560.
- Ponitka A, Ślusarkiewicz-Jarzina A, Wędzony M, Marcińska I, Woźna J. 1999. The influence of various *in vitro* culture conditions on androgenetic embryo induction and plant regeneration from hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittm.). J. Appl. Genet. 40:165-174.
- Sánchez-Díaz R.A., Castillo A.M., Vallés M.P. 2013. Microspore embryogenesis in wheat: new markers genes for early, middle and late stages of embryo development. Plant Reproduction doi:10.1007/s00497-013-0225-8
- Ślusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A. 2003. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture. Cereal Res. Commun. 31:289-296.
- Święcicki WK, Surma M, Koziara W, Skrzypczak G, Szukała J, Bartkowiak-Broda I, Zimny J, Banaszak Z, Marciniak K. 2011. Nowoczesne technologie w produkcji roślinnej – przyjazne dla człowieka i środowiska. Polish Journal of Agronomy 7:102–112.
- Wędzony M, Forster BP, Żur I, Golemiec E, Szechyńska-Hebda M, **Dubas E**, Gołębiowska G. 2009. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev A., Jain M., Forster B. (eds.): “Advances in Haploid Production in Higher Plants” © Springer Science + Business Media B.V., pp.1-35.
- Wędzony M, Szechyńska-Hebda M, Żur I, **Dubas E**, Krzewska M. 2014. Tissue culture and regeneration: a prerequisite for alien gene transfer. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants, Vol. 1. Innovations, Methods and Risk Assessment. Pratap A., Kumar, J. (Eds.), Springer, ISBN 978-1-4614-8584-1

- Żur I, Krzewska M, **Dubas E**, Gołębiowska-Pikania G, Janowiak F, Stojałowski S. 2012. Molecular mapping of loci associated with abscisic acid accumulation in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anthers in response to low temperature stress inducing androgenic development. *Plant Growth Regulation* 68(3): 483-492.
- Żur I, **Dubas E**, Krzewska M, Sánchez-Díaz RA, Castillo AM, Vallés MP. 2014. Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale (*× Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 116(2):261-267.

d) Perspektywy dalszych badań

Od roku 2011 jestem kierownikiem projektu finansowanego przez NCN pt. „Rola endogennych auksyn: kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz kwasu indolilo-3-masłowego (IBA) w utrzymaniu homeostazy auksynowej i podwyższaniu efektywności androgenyzy u rzepaku (*Brassica napus*)”. 2011/01/D/NZ9/02547, w ramach którego wykonywane są prace uzupełniające zaprezentowane w osiągnięciu naukowym informacje o hormonalnym podłożu embriogenezy niezygotycznej u roślin. Ponadto, jako kierownik przedłożyłam do recenzji kolejny projekt w ramach postępu biologicznego na lata 2014-2017, w którym badania nad androgenzą prowadzone będą u trudnego, ale gospodarczo ważnego gatunku, jakim jest żyto. Projekt ten został zatwierdzony do finansowania ze środków MRiRW na lata 2015-2018.

5. Omówienie pozostałej tematyki badawczej

Moje wiodące zainteresowania naukowe dotyczą:

(1) totipotencji komórek roślinnych w warunkach *in vitro*, w tym analizy rozwoju gametofitowego (ziarna pyłku) oraz sporofitowego (androgeneza, embriogeneza) w aspekcie badań podstawowych oraz aplikacyjnych.

W zakres badań podstawowych wchodzi studia nad podstawowymi mechanizmami regulującymi rozwojem ziarna pyłku, zarodka androgenicznego (z gametofitu męskiego i bez udziału komórki jajowej), polaryzacją zarodka, udziałem cytoszkieletu w embriogenezie oraz genów związanych z tym procesem. Uzyskane wyniki mogą okazać się pomocne w opracowaniu efektywnej metody pozyskiwania podwojonych haploidów (ang. double haploids, DHs) dla szerokiego spektrum genotypów, mających zastosowanie w programach hodowlanych zwiększających wartość użytkową roślin. Wykorzystanie DHs pozwala hodowcom na skrócenie wieloletniego cyklu krzyżowań wsobnych i selekcji, prowadzących do uzyskania wyrównanych linii.

W zakres badań aplikacyjnych wchodzi przygotowanie i wykorzystanie populacji mapujących (kilkadziesiąt homozygotycznych linii DH mających tych samych rodziców) w mapowaniu genów w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny. Linie DHs są ważnym materiałem w mapowaniu genów i konstruowaniu map genetycznych, zwłaszcza w badaniach cech warunkowanych poligenicznie i lokalizacji *loci* warunkujących cechy ilościowe (QTL, ang. *quantitative trait loci*). Otoczone, łatwymi do identyfikacji, markerami molekularnymi DNA *loci* tych, wykorzystywane są do szybkiej i nieinwazyjnej selekcji roślin w dowolnej fazie rozwojowej. Technologie wykorzystujące markery molekularne są narzędziem twórczej hodowli roślin użytkowych ze względu na fakt, że pozwalają na stworzenie, w krótkim czasie, relatywnie gęstej mapy genetycznej dla populacji linii DH. Przyporządkowanie zidentyfikowanych cech dla określonych markerów genetycznych ma służyć wzbogaceniu materiałów hodowlanych o geny cech ważnych dla biologii i uprawy.

Rozwinięciu głównych zainteresowań we wspomnianym powyżej zakresie, towarzyszyły ponadto:

(2) diagnostyka **cytogenetyczna** oraz nowe **badania nad reakcją roślin na stres** (3) abiotyczny i (4) biotyczny.

Wszystkie poruszane zagadnienia wymagały przygotowania merytorycznego i technicznego z zakresu anatomii, cytologii, embriologii i genetyki roślin.

a) Główne kierunki prowadzonych badań

- Różnicowanie kariologiczne w rodzaju *Luzula*
- Androgeneza w technologii podwojonych haploidów u wybranych gatunków roślin użytkowych
- Fizjologiczne, metaboliczne, cytologiczne i genetyczne podłoże odpowiedzi na stres biotyczny

b) Ważniejsze wyniki prowadzonych badań

Zróżnicowanie kariologiczne w rodzaju *Luzula*

W początkowym etapie mojej pracy zawodowej, po uzyskaniu tytułu magistra w zakresie nauk biologicznych, przygotowywałam publikację wyników z pracy magisterskiej. Działalność naukową z zakresu **cytogenetyki** rozpocząłam jako studentka Instytutu Botaniki, realizując pracę magisterską w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin UJ w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Kuty. W 2004 współprzygotowałam do druku prace (1.1, 1.2), omawiające osiągnięcia pracy magisterskiej. Problematyka ta dotyczyła aspektów kariologicznych, ze szczególną uwagą poświęconą chromosomom holokinetycznym (holocentrycznym) u roślin. Chromosomy holokinetyczne mają kinetochor dyfuzyjny rozciągający się na całej długości chromatyd. Dzięki takiej strukturze kinetochoru chromosomy holokinetyczne mogą podlegać fuzji (częściowa lub całkowita symploidalność) bądź ulegać fragmentacji (częściowa lub całkowita agmatoploidalność) bez negatywnego wpływu na przebieg mitozy. W pracach przedstawiono i przedyskutowano zagadnienia związane ze strukturą kompleksu centromer/kinetochor, zachowaniem się chromosomów holokinetycznych w mitozie i mejozie, mutacjami strukturalnymi i genomowymi *in vivo* i *in vitro* (w kulturze kalusa wyprowadzonego z merystemu liściowego). Ponadto zaprezentowano wyniki badań nad ilością jądrowego DNA w odniesieniu do mutacji strukturalnych chromosomów holokinetycznych (fuzje, fragmentacje), zmienności w liczbach chromosomów (aneuploidalność *sensu stricto*) i mutacji genomów (całkowita agmatoploidalność bez zwiększenia ilości DNA; całkowita symploidalność bez zmniejszenia ilości DNA oraz poliploidalność, której towarzyszy zwielokrotnienie ilości DNA). W pracy (1.1) kwestię liczby chromosomów i ilości DNA rozpatrywano w odniesieniu do holokinetycznej natury chromosomów u wybranych gatunków z rodzaju *Luzula*. Udowodniono, że u źródła zróżnicowania kariologicznego w tym rodzaju leży agmatoploidalność i niestabilność genetyczna prowadząca do współwystępowania w diploidalnym organizmie komórek aneuploidalnych (aneusomia segmentalna). Opublikowane prace przyczyniły się do kontynuacji badań w tym temacie przez następne 10 lat w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin UJ, ale już bez mojego współautorstwa.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

Identyfikacja źródła zróżnicowania kariologicznego w rodzaju *Luzula*.

Androgenesa w technologii podwojonych haploidów u wybranych gatunków roślin użytkowych

Badania procesu androgenyzy u roślin rozpocząłam pod kierunkiem prof. Marii Wędzony oraz dr hab. Iwony Żur w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN w Krakowie. Przeprowadzone eksperymenty polegały na optymalizacji metod izolacji mikrospor pszenicy (*Triticum aestivum* L.) i pszenżyta (*×Triticosecale* Wittm.) oraz na analizie cytologicznej przebiegu procesu indukcji androgenyzy w kulturze zawiesinowej mikrospor.

Na początku mojej pracy zawodowej, w 2004 roku, założyłam pracownię immunocytochemii i *in situ* hybrydyzacji oraz wprowadziłam do praktyki laboratoryjnej Zakładu Biologii Komórki IFR PAN liczne barwienia z wykorzystaniem fluorochromów oraz techniki immunocytochemiczne. Zasady barwienia i kilka protokołów zostało przygotowanych w tym samym roku do druku w postaci rozdziału w książce (2.1). Implementowane, w nowo założonej pracowni, metody obejmowały barwienia w całej tkance 'whole mount' oraz na

materiale krojonym i miały pozwolić na ocenę przebiegu indukcji embriogenezy oraz polaryzacji zarodków w zawiesinie mikrospor *in vitro* różnych gatunków roślin. Na podstawie tych metod, w macierzystym zakładzie, wykonałam eksperymenty, które opublikowano w kilku oryginalnych pracach w tym samym roku i w latach następnych. W publikacji (1.3) przedstawiono zdolności do androgenyzy w kulturach zawiesinowych pszenicy jarej poddanej działaniu czynników stresowych na różnych podłożach w odmiennych warunkach termicznych, w jakich prowadzono kulturę. Wykazano, że traktowanie wstępne kłosów niską temperaturą (4°C) w połączeniu z hodowlą mikrospor na pożywce głodowej w wysokiej temperaturze (33°C) efektywnie indukują embriogenezę.

Założenie, wyżej wspomnianego, laboratorium poprzedzały kilkumiesięczne staże naukowe w dwóch wiodących ośrodkach naukowych w Europie - Plant Research International oraz Uniwersytet w Wageningen (Holandia). W latach 2003/2004 odbyłam pierwszy sześciomiesięczny staż w ramach unijnego projektu CropStress QLK5-CT-2002-30424, gdzie analizowałam rolę mikrotubularnego cytoszkieletu podczas rozwoju struktur podobnych do zarodków w embriogenicznej kulturze mikrospor rzepaku. Dodatkowo, pracowałam nad optymalizacją metody barwienia cytoszkieletu mikrotubularnego i aktywnego w zawiesinie komórek tytoniu BY-2 (1.5). W efekcie niniejszych badań pomyślnie zoptymalizowano protokół barwienia cytoszkieletu mikrotubularnego i aktywnego w interfazowych oraz dzielących się komórkach BY-2 bez naruszania ich ciągłości. Kluczowym etapem procedury okazały się: modyfikacja utrwalania z pojedynczego do dwuetapowego oraz odpowiedni dobór składu enzymów cellulolitycznych i warunki trawienia ściany. Zoptymalizowanie protokołu barwienia umożliwiło lokalizację białek i molekuł w różnorodnym materiale roślinnym. W szczególności opracowany protokół dla materiału utrwalonego stanowi alternatywę do przyżyciowej analizy dynamiki zmian w konfiguracji cytoszkieletu *in vivo* w komórkach tych gatunków roślin, u których transformacja genetyczna jest ograniczona.

W okresie październik- grudzień 2004 roku odbyłam kolejny staż w tych samych ośrodkach zagranicznych w ramach innego niewspółfinansowanego międzynarodowego projektu COST 851 Short Term Scientific Missions (STSM) z biura COST-u, kontynuując zagadnienia badawcze rozpoczęte w ramach pierwszego pobytu oraz rozpoczynając nowe badania mających na celu analizę powstawania osi embrionalnej zarodka androgenicznego poprzez identyfikację białek transportowych jednego z najważniejszych u roślin regulatora wzrostu – auksyn.

W ramach badań głównego obszaru zainteresowań, testowano wpływ wstępnego traktowania kłosów na efektywność procesu androgenyzy (1.6). Otrzymywanie androgenicznych roślin w kulturach *in vitro* zależy między innymi od sposobu traktowania ściętych kłosów przed wyłożeniem pylników/mikrospor na pożywkę oraz od komponentów pożywek indukujących i regeneracyjnych. Badania prowadzono na wstępnie wyselekcjonowanych, jarych odmianach pszenżyta (*×Triticosecale* Wittm.), istotnie zróżnicowanych pod względem podatności na indukcję androgenyzy oraz zdolności regeneracyjnych. Wykazałam, że w warunkach optymalnego traktowania kłosów niską temperaturą, podtrzymywana jest żywotność mikrospor. Wysoka przeżywalność izolowanych mikrospor korelowała z kolei z efektywną indukcją androgenyzy i/lub regeneracją roślin zielonych w ogólnej liczbie regenerantów. W kolejnych eksperymentach analizie poddawano wpływ substancji wzrostowych i gęstości kultur izolowanych mikrospor pszenżyta na efektywność indukcji androgenyzy.

Badania nad przebiegiem indukcji androgenyzy prowadziłam równolegle na dwóch gatunkach będących przedstawicielami roślin jedno- i dwuliściennych: pszenżycie (*×Triticosecale* Wittm.) i rzepaku (*Brassica napus* L.). Część wyników została opisana i przedyskutowana w pracy doktorskiej pt. „Wykorzystanie kultury izolowanych mikrospor rzepaku (*Brassica napus* L.) jako modelu w badaniach nad wczesnymi etapami rozwoju

zarodkowego”, która obroniona została w 2007 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ w Krakowie. Badania te dotyczyły charakterystyki efektywności indukcji procesu androgenezy, ze szczególnym omówieniem typów rozwoju mikrospor indukowanych warunkami termicznymi kultury *in vitro*. W pracy zaobserwowano podobieństwo pomiędzy procesem formowania ziaren pyłku *in vitro* i *in vivo* oraz rozwojem zarodków androgenicznych i zygotycznych, począwszy od najwcześniejszych etapów. Szczególną uwagę skupiłam na morfologii i cytologii z zaakcentowaniem przejawiającej się polaryzacji komórek i struktur zarodkowych.

Zagadnienie polaryzacji mikrospor i struktur zarodkowych z nich uformowanych rozszerzono w pracy naukowej opublikowanej w 2008 roku (B 1.1), po uzyskaniu tytułu doktora. Jako modelu do badań użyto zawiesinę mikrospor rzepaku poddaną działaniu łagodnego stresu wysokiej temperatury (1 dzień 32°C). Zaindukowane struktury posiadały strukturę podobną do suspensora i przypominały swoją budową zarodek zygotyczny *in planta*. Aby wykazać, że uzyskane zarodki androgeniczne można wykorzystywać w badaniach porównawczych nad embriogenezą zygotyczną, przeprowadzono eksperyment mający na celu identyfikację białek będących nośnikami wypływu auksyn (białka PIN; z *ang.* auxin efflux facilitators; kodowane przez geny z rodziny PIN; z *ang.* pin-formed). Postawiono hipotezę naukową, że u podstaw wzrostu zarodka androgenicznego z uformowaną osią apikalno-bazalną jest gradient stężenia auksyn. Wiadomo, że u *Arabidopsis thaliana* odpowiedni gradient stężenia auksyn w tkankach roślinnych jest wytwarzany przez zlokalizowane w membranach przenośniki auksyn. Zmiana lokalizacji białek PIN i towarzyszący jej ukierunkowany eksport auksyny są istotne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju.

Celem poszerzenia wiedzy na temat procesów prowadzących do zmiany kierunku rozwoju mikrospory z gametofitowej na sporofitową oraz poznania czynników warunkujących regenerację wytworzonych struktur podobnych do zarodków, przeprowadzono eksperymenty, których wyniki opublikowano w okresie 2008-2009 (B 1.2, 1.3). Zbadano cytologiczne i fizjologiczne aspekty podłoża androgenezy u pszenżyta (*×Triticosecale* Wittm.). Wykonano szereg obserwacji morfologicznych oraz analiz mikroskopowych, fizykochemicznych i biochemicznych, mających na celu charakterystykę optymalnego do indukcji stadium rozwojowego kłosa, mikrospor oraz pokazanie dynamiki zmian podczas poszczególnych etapów indukcji, obejmujących wstępne traktowanie chłodem oraz kulturę *in vitro*. Wykazano, że przyczyną niskiej podatności na indukcję androgenezy jest niska żywotność komórek. Celem poprawy żywotności izolowanych mikrospor, zoptymalizowano warunki wstępnego traktowania kłosów i kultury pylników, gęstości komórek w zawiesinie, skład i stężenie regulatorów wzrostu w medium hodowlanym oraz warunki kultury. Poczynione zabiegi skutkowały nie tylko podniesieniem żywotności mikrospor, ale także efektywną indukcją oraz stymulacją regeneracji roślin zielonych ze struktur zarodkowych, ponieważ badane odmiany istotnie różniły się powyższymi parametrami, poszukiwano źródła tejże zmienności. Wykazano, że odmienna reakcja komórek na indukcję androgenezy ma wieloczynnikowe podłoże i może zależeć od poziomu reaktywnych form tlenu (z *ang.* reactive oxygen species ROS), aktywności enzymów antyoksydacyjnych i ich izoform (dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego SOD, katalazy CAT i peroksydazy PX), zawartości kwasu abscysynowego (ABA), intensywności oddychania i emisji ciepła, osmolalności pożywki hodowlanej i akumulacji pierwiastków, kontrolujących aktywność wielu enzymów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki (jonów Ca^{2+} i K^{+}). Jedną z najszybszych reakcji uruchamianych w odpowiedzi na stres, będący jednocześnie jednym z najważniejszych czynników indukujących proces androgenezy było podniesienie poziomu ROS, jako produktów częściowej redukcji tlenu atmosferycznego. Nadprodukcja ROS stanowiła poważne zagrożenie dla mikrospor, wywołując stan tzw. „stresu oksydacyjnego”, który mógł powodować poważne uszkodzenia wielu struktur komórkowych, a nawet śmierć komórki. Ze względu na zagrożenie

stresiem oksydacyjnym, w mikrosporach uruchamiany był mechanizm kontrolujący wewnątrzkomórkowy poziom ROS. Wykazano, że mikrospory bronią się przed uszkodzeniem, zwiększając ekspresję enzymów rozkładających ROS: SOD, CAT i PX. Ekspozycja kłosów na działanie niskiej temperatury przyczyniała się do nabywania przez znajdujące się w pylnikach mikrospory odporności na stres mechaniczny związany z izolacją i stres termiczny pre-kultury i właściwej kultury *in vitro*. Zjawisko to można przyrównać do obserwowanej u roślin odporności krzyżowej (ang. cross-protection) w środowisku, gdzie działają niekorzystne czynniki. Ochronną rolę w nabywaniu odporności mikrospor na stres odgrywał także kwas abscysynowy (ABA). Jak wiadomo, ABA bierze istotny udział w reakcjach organizmów roślinnych na stres i procesie adaptacji do zachodzących zmian środowiskowych. W przeprowadzonych eksperymentach stwierdzono występowanie istotnej korelacji ($r = 0,88$; $p < 0,05$) pomiędzy poziomem ABA i żywotnością izolowanych mikrospor. Nie wykazano jednak bezpośredniej korelacji pomiędzy poziomem ABA a efektywnością indukcji androgenyzy. Uzyskane wyniki sugerują, że poziom stresu i aktywność systemu antyoksydacyjnego są czynnikami, które w istotny sposób modyfikują efektywność procesu androgenyzy. Wpływ tych czynników podlega jednak dodatkowej modyfikacji poprzez dostępność substratów energetycznych i poziom aktywności metabolicznej tkanki.

W kolejnej serii badań będących kontynuacją wcześniejszych doświadczeń, w celu poznania molekularnego podłoża procesu androgenyzy u pszenżyta, w roku 2012 podjęto próbę identyfikacji genów i ich alleli warunkujących efektywność procesu androgenyzy i akumulację ABA na skutek traktowania niską temperaturą. Wyznaczono rejony genomu związane z tymi cechami (B 1.10, 1.12). Wszystkie informacje zgromadzono w oparciu o analizę QTL, która pozwoliła na przypisanie złożonych cech, określających końcową efektywność androgenyzy specyficznym rejonom chromosomowym, określenie prawdopodobnej liczby *loci* oraz analizę różnego typu interakcji np. genotyp i traktowanie stresem. Do badań wykorzystano populację mapującą wyprowadzoną z odmian 'Modus' (częściowo odporny) i 'Saka 3006' (podatny) charakteryzujących się różnym poziomem podatności na indukcję androgenyzy w kulturach pylnikowych. Zwrócono szczególną uwagę na miejsca na chromosomie odpowiedzialne za akumulację ABA i podatność na indukcję androgenyzy. Do analiz wykorzystano dwa testy: złożonego mapowania interwałowego (CIM) oraz Kruskala-Wallisa. Wykryto 28 QTL zdolności do indukcji androgenyzy. Zidentyfikowane QTL zlokalizowano na pięciu chromosomach subgenomów pszenicy A i żyta R: 5A, 4R, 5R, 7R. Ponadto dla ujawnionych QTL, oznaczano markery istotnie ($p \leq 0,005$) sprzężone z tą cechą na chromosomach 2BL oraz 7B. Sprzężenie QTL ze zdolnością do regeneracji zlokalizowano na chromosomie subgenomu pszenicy A: 4A. Sprzężenie QTL z całkowitą efektywnością androgenyzy zlokalizowano na czterech chromosomach: 5A, 4R, 5R, 7R. Dodatkowa analiza testem Kruskala-Wallisa ujawniła sześć markerów istotnie ($p \leq 0,005$) sprzężonych z tą cechą, zlokalizowanych na chromosomach 5A, 7B, 5R. W badaniach nad poziomem ABA, stwierdzono, że wysokie stężenie ABA stymulująco wpływa na indukcję androgenyzy jedynie w najwcześniejszych etapach, a niekorzystnie na regenerację struktur androgenicznych. Wykazano ujemną korelację ($r = -0,33$) pomiędzy zawartością ABA w pylnikach traktowanych niską temperaturą a regeneracją roślin zielonych ze struktur androgenicznych. Sprzężenie QTL z zawartością ABA zlokalizowano na chromosomie 2A, 1B, 5R. Dodatkowo, dla ujawnionych QTL oznaczano markery istotnie ($p \leq 0,005$) sprzężone z tą cechą na chromosomie 3R w pylnikach roślin traktowanych chłodem oraz na chromosomach 3A, 3B, 5B oraz 2RS w pylnikach roślin kontrolnych (bez traktowania niską temperaturą). Analiza *loci* cech ilościowych jest ważnym narzędziem w kompleksowym zbadaniu charakteru danej cechy, gdyż zidentyfikowane markery molekularne mogą zostać użyte w programach hodowlanych do identyfikacji genotypów o pożądanym cechach oraz monitorowania transferu istotnych alleli do genotypów nie posiadających tej cechy.

Osiągnięcia naukowe nad poprawą efektywności procesu androgenezy u pszenżyta i ponad 200 innych gatunków roślin zostały opisane w artykule przeglądowym w książce o międzynarodowym zasięgu (2.1, Wędzony M., Forster B.P., Żur I., Golemić E., Szechyńska-Hebda M., **Dubas E.**, Gołębiowska G. 2009. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev A., Jain M., Forster B. (eds.): "Advances in Haploid Production in Higher Plants" © Springer Science + Business Media B.V., pp.1-35). W opracowaniu podsumowano ponad 20 lat badań licznych zespołów nad optymalizacją warunków dla indukowania podwojonych haploidów metodami krzyżowań oddalonych, kultur pylnikowych, izolowanych mikrospor oraz metodyki podwajania liczby chromosomów roślin haploidalnych. Tabela podsumowanie dla prawie 200 gatunków roślin, stworzyło możliwość w laboratoriach naukowych i komercyjnych do szybkiej orientacji w doborze odpowiedniej techniki oraz dopasowaniu optymalnych warunków, w jakich powinna odbywać się indukcja androgenezy, regeneracja roślin zielonych i podwyższona wydajność uzyskiwania linii DH dla określonego gatunku.

W 2009 roku, koordynowałam w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN prace nad założeniem pracowni do mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Z dotacji MNISW na działalność naukowo-badawczą (SPUB), pilotowałam zakup wyposażenia mikroskopu fluorescencyjnego w system konfokalny C1 jako specjalnego urządzenia badawczego, które w kolejnych latach było wykorzystywane do licznych badań własnych oraz innych prowadzonych w zespołach naukowych IFR PAN oraz we współpracy z innymi uczelniami krakowskimi (Uniwersytet Jagielloński, Uniwersytet Pedagogiczny, Uniwersytet Rolniczy, Politechnika Krakowska).

W kolejnych doświadczeniach poświęconych analizie podłoża indukcji androgenezy, w zarodkach androgenicznych pszenżyta, wykazałam wraz z zespołem po raz pierwszy, że poszczególnym etapom inicjacji i rozwoju zarodka androgenicznego u roślin jednoliściennych towarzyszą charakterystyczne zmiany w płaszczyźnie podziału, organizacji cytoszkieletu mikrotubularnego, wakuolizacji, rozkładzie mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego oraz w architekturze nowo powstającej ściany komórkowej. Wspomniane osiągnięcia zostały opublikowane po uzyskaniu tytułu doktora w 2010 roku (B 1.4). Pierwszy podział mikrospory był symetryczny i poprzedzało go uformowanie prążka profazowego (z ang. Preprophase Band; PPB) wyznaczającego orientację i miejsce powstania ściany komórkowej. Kolejne podziały komórkowe prowadziły do uformowania struktur wielojądrowych lub wielokomórkowych. Struktury wielokomórkowe zbudowane były z komórek jednorodnych (struktury jednodomenowe) lub morfologicznie odmiennych (struktury dwudomenowe).

W innej pracy (B 1.9), analizowano rozwój gametofitowy ziaren pyłku rzepaku *B. napus* cv. Topas w warunkach kultury *in vitro* w zawieszynie traktowanej temperaturą 18°C. Poszukiwanie podobieństwa pomiędzy procesem formowania ziaren pyłku *in vivo* a *in vitro* ma duże znaczenie ze względu na konieczność pozyskiwania nowego materiału wyjściowego w hodowli roślin. Hodowla pyłku może być wykorzystywana w ocenie żywotności, selekcji cech warunkowanych ekspresją jakiegoś genu np. odporność na szkodliwy czynnik abiotyczny i biotyczny, do uzyskania materiału zapylacza do krzyżowania. Analiza cytologiczna pozwala na szczegółową analizę porównawczą na poziomie pojedynczej komórki. W publikacji (B 1.9) szczególną uwagę zwrócono na zmiany konfiguracji cytoszkieletu tubularnego towarzyszące różnicowaniu ziarna pyłku. Zastosowanie techniki immunodetekcji w całej tkance oraz obserwacje w konfokalnym laserowym mikroskopie skaningowym umożliwiły po raz pierwszy uzyskanie bardzo wysokiej jakości trójwymiarowych obrazów przedstawiających związane z rozwojem zmiany konfiguracji cytoszkieletu mikrotubularnego. Po raz pierwszy udało się uzyskać trójwymiarowe obrazy rozkładu mikrotubul od stadium mikrospory do stadium dwukomórkowego ziarna pyłu, kiedy układ mikrotubul wokół komórki generatywnej przypominał kometę. Ponadto opisano podziały komórkowe, wzór wakuolizacji, architekturę

ściany komórkowej, intensywność fluorescencji cytoplazmy po reakcji z DiOC₆ oraz ilości i asymetrię rozkładu ziaren skrobi. Wykazano, że hodowane ziarna pyłku są idealnym modelem do badań z zakresu biologii komórki roślinnej oraz, że ze względu na podobieństwo do ziaren pyłku *in vivo* mogą stanowić alternatywne źródło zapylacza *in planta*.

Moje badania nad rozwojem pyłku oraz indukcją androgenezy zostały poszerzone w kolejnych latach (2012-2013) o gatunki 'trudne', w tym o allotriploidalnego, wysoce plonującego mieszańca międzygatunkowego - miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus*) (B: 1.11, 1.15). Obszar uprawy tej energetycznej rośliny w Polsce jest ograniczony ze względu na możliwość jedynie wegetatywnego jej rozmnażania (roślina sterylna, nie wytwarzająca nasion) i krótki cykl wegetacyjny spowodowany klimatem. Doprowadzenie do poliploidyzacji genomu miskanta (proste zdublowanie chromosomów), mogłoby przywrócić płodność u tego gatunku trawy. Wyprowadzenie nowych genotypów miskanta oraz poliploidyzacja są możliwe poprzez wdrożenie technologii podwojonych haploidów DH u tego gatunku. W przeprowadzonych eksperymentach podjęto próbę indukcji androgenezy w kulturach pylnikowych i izolowanych mikrospor *in vitro*. Badania nad androgenezą poprzedzało zapoznanie się z przyczynami sterility. Szczegółowa analiza cytologiczna i embriologiczna wykazała zaburzenia rozwojowe w makro- i mikrosporogenezie, gametogenezie męskiej i żeńskiej oraz w żywotności i wigorze pyłku. W mejozie, od metafazy I aż do wytworzenia się spor występowały różnego rodzaju zaburzenia (opóźnione chromosomy, uniwalenty i mikrojądra). Powszechnym zjawiskiem był brak synchronizacji podziałów. Wytworzony pyłek był różnej wielkości i charakteryzował się słabą żywotnością i brakiem zdolności do kiełkowania (1.12). Liczne zaburzenia występowały także w rozwoju załączka, przed makrosporogenezą oraz w rozwoju gametofitu żeńskiego i obejmowały np. degenerację komórki macierzystej megaspory i elementów aparatu jajowego.

Po raz pierwszy pokazano, że rozwój gametofitowy mikrospor może przebiegać prawidłowo w kulturze *in vitro*. Ponadto wykazano, że indukcja androgenezy w zawiesinie izolowanych mikrospor jest możliwa. Osiągnięty postęp wynikał z udanej optymalizacji traktowania wiech oraz warunków kultury *in vitro*. W pierwszych dniach hodowli pojawiały się struktury gwiazdziste (z *ang.* Star like structures, SLS), opisywane w literaturze jako morfologiczny marker indukcji androgenezy. Struktury SLS dzieliły się w wyniku serii symetrycznych podziałów. W efekcie, struktury wielokomórkowe stanowiły prawie 5% komórek w zawiesinie. Niestety, rozwój tych struktur został zahamowany na pewnym etapie i następowała ich degeneracja w okresie 3 tygodni od momentu założenia kultury.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

1. Identyfikacja genotypów pszenicy, pszenżyta, rzepaku i miskanta o wysokim/niskim potencjale androgenicznym.
2. Charakterystyka fizycznych i chemicznych warunków środowiskowych przełamujących oporność na indukcję androgeny oraz poprawiających efektywność regeneracji roślin zielonych u wybranych gatunków roślin uprawnych.
3. Charakterystyka podłoża hormonalnego w indukcji androgeny na przykładzie auksyn i kwasu abscysynowego.
4. Charakterystyka podłoża fizjologicznego w indukcji androgeny w warunkach zagrożenia stresem oksydacyjnym.
5. Charakterystyka zmian cytologicznych w izolowanych mikrosporach/ziarnach pyłku we wczesnych etapach gametogenezy oraz androgeny. Rola cytoszkieletu w różnicowaniu ziaren pyłku oraz w embriogenezie i morfogenezie.
6. Identyfikacja i lokalizacja QTL związanych z efektywnością androgeny i zawartością ABA u pszenżyta.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

1. Opracowanie technologii produkcji podwojonych haploidów dla pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittm.).
2. Identyfikacja markerów molekularnych mających zastosowanie w programach hodowlanych do identyfikacji genotypów o pożądanym cechach oraz monitorowania transferu istotnych alleli do genotypów nieposiadających tej cechy.

Fizjologiczne, cytologiczne, metaboliczne i genetyczne podłoże odpowiedzi na stres biotyczny

Wszechstronne poznanie zagadnienia poświęconego interakcji roślina – patogen, w tym poznanie reakcji obronnych na atak jest istotne ze względu na możliwość wczesnego zapobiegania infekcji i wzmacniania odporności.

Zainteresowanie naukowe niniejszą problematyką przejawiało się cyklem kilku publikacji omawiających fizjologiczne, cytologiczne, metaboliczne i genetyczne podłoże odpowiedzi na infekcję patogenami grzybowymi. Moje pionierskie prace w tym temacie obejmowały badania podatności polskiej odmiany *Festulolium* oraz jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.), w różnych fazach rozwojowych na plamistość liści powodowaną przez *Bipolaris sorokiniana* (1.4 przed uzyskaniem stopnia doktora). *Festulolium* posiada cechy zarówno życicy wielokwiatowej, jak i kostrzewy łąkowej: wysoko plonuje, odznacza się dużą zimotrwałością i odpornością na suszę, jakość paszy jest wysoka. Trawa ta okazała się jednak podatna na porażenie patogenem grzybowym *Bipolaris sorokiniana*. Podobnie, *B. sorokiniana* jest znanym patogenem jęczmienia i sprawcą brunatnej plamistości liści oraz czernienia kłosów. Jako, że patogen ten przyczynia się do znacznego spadku plonowania, badania nad przebiegiem infekcji oraz reakcją rośliny na stres biotyczny wywołany porażeniem przez *B. sorokiniana* są istotne. Scharakteryzowano przebieg infekcji na poziomie cytologicznym oraz skutki infekcji, będące zakłóceniem procesów fizjologicznych. Opisano aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz enzymów szlaku fenylopropanoidów w biosyntezie lignin. Zaobserwowano, że w odpowiedzi na stres zwiększała się zawartość fenoli i lignin u obydwu badanych gatunków. Wskazywało to na szybką reakcję obronną poprzez wzmacnianie struktury ściany komórkowej. Im w większym stopniu ścianę komórkową wysycali fenole i lignina, tym roślina była bardziej odporna na atak

patogena. Ściana komórkowa wysycona dużą ilością ligniny tworzyła barierę strukturalną w strefie infekcji, fizycznie odcinając tkanki zainfekowane od zdrowych.

Cykl pozostałych prac został poświęcony chorobie roślin uprawnych wywołanej przez różową pleśń śniegową (*Microdochium nivale* (Fr.) Samuels&Hallett) (B: 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.13, 1.14). *M. nivale* jest gatunkiem grzyba stanowiącego poważne zagrożenie dla traw pastewnych oraz upraw ozimych zbóż w umiarkowanej i chłodnej strefie klimatycznej. We wszystkich pracach podjęto badania mające na celu zbadanie mechanizmu infekcji wywołanej przez *M. nivale*. W celu określenia zintegrowanej reakcji na stres, analizy prowadzono u roślin kontrolnych oraz hartowanych niską temperaturą.

Celem tych prac było prześledzenie dynamiki infekcji korzeni, węzłów krzewienia i liści przez strzępki grzyba *M. nivale*. Choroby powodowane przez *M. nivale* powodują plamistość liści traw oraz obniżają plon ziarna i pogarszają jego jakość poprzez zanieczyszczenie metabolitami wtórnymi (mikotoksynami). Grzyby te mogą porażać murawę trawnikową - życicę trwałą (*Lolium perenne* L.) oraz zboża, w tym badane pszenżyto (\times *Triticosecale* Wittm.) i żyto (*Secale cereale*) w różnych stadiach rozwoju, powodując plamistość liści, zgorzel siewek, zgorzel podstawy źdźbła oraz/lub fuzariozę kłosów. W pracach tych analizowano mechanizm infekcji *M. nivale* oraz mechanizmy indukcji odporności rośliny chłodem w warunkach zbliżonych do naturalnych. Hartowanie siewek niską temperaturą może prowadzić do ich aklimacji do nowych warunków dzięki zmianom w procesach metabolicznych i w strukturze komórek i tkanek. Część tych zmian może przyczyniać się do reakcji krzyżowej, w wyniku której nabywanie odporności na stres abiotyczny zwiększa odporność roślin na stres biotyczny.

W przedstawionych pracach wykazano, że podczas hartowania niską temperaturą, siewki pszenżyta oraz żyta ozimego mogą nabywać odporność na różową pleśń śniegową wywołaną przez *M. nivale*. Zobrazowano stopień porażenia siewek hartowanych oraz niehartowanych na poziomie cytologicznym. Obserwacje mikroskopowe wsparto analizami biochemicznymi. Do analizy cytologicznej przebiegu infekcji wywołanej grzybnia *M. nivale*, wykorzystano po raz pierwszy liczne techniki mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej. Wykazano, że strzępki *M. nivale* przenikają tkankę liści, pochew liściowych i węzłów krzewienia, gdzie wytwarzają we wnętrzu atakowanych komórek haustoria, za pomocą których pobierają pokarm. Przenikaniu strzępek przez aparaty szparkowe towarzyszyła akumulacja nadtlenu wodoru, którego rolą jest inicjowanie reakcji obronnych rośliny. Infekcji przez *M. nivale* towarzyszyła akumulacja dużych ilości wykazujących właściwości obronne związków fenolowych.

W kolejnej pracy (B 1.13) wykazano, że wybrane linie żyta z nabytą tolerancją na działanie niskiej temperatury, charakteryzują się wyższą odpornością na infekcję *M. nivale*. Linie te cechowały się jednocześnie wydajniejszą fotosyntezą i asymilacją dwutlenku węgla. Porażenie *M. nivale* wpływało negatywnie na procesy związane z fotosyntezą u linii podatnych na infekcję. Zakłócenia dotyczyły funkcjonowania kluczowego w procesie asymilacji CO₂ enzymu Rubisco (karboksylazy/oksygenazy rybulozo 1,5 bifosforanu). Ponadto, wykazano, że proces infekcji tkanki roślinnej przez patogeny grzybowe wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem zainfekowanych tkanek na cukry rozpuszczalne. Wiadomo, iż wzrost poziomu monosacharydów generuje sygnały metaboliczne jednocześnie indukujące ekspresję genów odporności i hamując proces fotosyntezy. Cukry rozpuszczalne, jako główne źródło metabolitów i energii, niezbędne są do reorganizacji metabolizmu i kształtowania odporności komórek. Oprócz zmian metabolicznych, wykazano, że podatność żyta na infekcję *M. nivale* uzależniona jest od stężenia roślinnego hormonu stresu - kwasu abscysynowego. Wiadomo też, że ABA odgrywa istotną rolę w szlakach przekazywania sygnału i integracji sygnału z programem genetycznym komórki.

Wykazano, że w zintegrowanej odpowiedzi zainfekowanych roślin na infekcję *M. nivale* istotną rolę odgrywają fitohormony i białka (B 1.14). W jednej z prac analizowano, w siewkach pszenżyta, aktywność białek obronnych związanych z reakcją na infekcję przez *M. nivale*.

Wykazano, że na skutek infekcji wzrasta ekspresja i akumulacja specyficznych białek związanych z patogenezą (białka PR, z *ang.* Pathogenesis-Related) - β -glukanazy i chitynazy. Rośliny z nabytą tolerancją na działanie niskiej temperatury, charakteryzowała wyższa zawartość wybranych rodzin białek PR, które wykazują właściwości antygrzybowe, a ponadto są elementem szlaku sygnałowego w odpowiedzi roślin na stres. Wysokie stężenie chitynaz u odmiany odpornej sugeruje, że enzymy te mogą pełnić rolę markera w selekcji roślin niewrażliwych na infekcję *M. nivale*. Identyfikacja, biorących udział w reakcjach obronnych, białek PR jest istotna, gdyż można wykorzystać takie białka jako naturalne substancje przeciwgrzybicze.

Poznanie podłoża genetycznego interakcji roślina-patogen jest bardzo istotne ze względu na możliwość opracowania strategii ataku patogenów oraz strategii obrony organizmu roślinnego przed tymi patogenami. Najlepszym sposobem poznania genów i ich alleli warunkujących cechę odporności na infekcję patogenem wydaje się być znalezienie odpowiednich markerów genetycznych, sprzężonych z fenotypową cechą stopnia porażenia dla możliwie jak największej liczby linii. W tym celu tworzy się mapy genetyczne poprzez analizę populacji mapujących. Zastosowanie markerów molekularnych sprzężonych z danymi cechami pozwala na poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów kontrolujących infekcję oraz na precyzyjną selekcję pożądanych genotypów scharakteryzowanych jako odporne na infekcję patogenem.

W pracy (B 1.8) zidentyfikowano markery molekularne związane z odpornością pszenżyta na infekcję wywołaną *M. nivale*. Do badań wykorzystano populację mapującą wyprowadzoną z odmian 'Modus' (częściowo odporny) i 'Saka 3006' (podatny) charakteryzujących się różnym poziomem odporności na infekcję *M. nivale*. Zidentyfikowane rejony genomu pszenżyta związane z tą cechą zlokalizowano na dziewięciu chromosomach: 1B, 2A, 3A, 3B, 5A, 5B, 6A, 6B oraz 7B. QTL dla przeżywalności siewek w kontrolnych roślinach nieinfekowanych zidentyfikowano na sześciu chromosomach: 1B, 2B, 3A, 5A, 7B oraz 7R.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

1. Identyfikacja genotypów pszenżyta, jęczmienia, zycicy trwałej i *Festulolium* o wysokim/niskim potencjale odporności na infekcję wywołaną wybranymi patogenami grzybowymi.
2. Charakterystyka fizycznych warunków środowiskowych podnoszących odporność na infekcję patogena u wybranych gatunków roślin uprawnych.
3. Fizjologiczne, metaboliczne, cytologiczne i genetyczne podłoże odpowiedzi na infekcję patogenami grzybowymi.
4. Identyfikacja i lokalizacja QTL związanych z odpornością na infekcję wywołaną *M. nivale*.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

Identyfikacja markerów molekularnych mających zastosowanie w programach hodowlanych do identyfikacji genotypów o pożądanych cechach oraz monitorowania transferu istotnych alleli do genotypów nie posiadających tej cechy.

Większość opisanych powyżej zagadnień badawczych ma swoją kontynuację w chwili obecnej w postaci projektów NCN i statutowych zadań badawczych w IFR PAN i jest realizowana we współpracy z zespołami w kraju i za granicą (Słowacja, Belgia, Austria, Czechy, Hiszpania).

6. Zestawienie najważniejszych osiągnięć naukowych

Szczegółowy wykaz mojego dorobku zamieściłam w załącznikach: II-IX

Poniżej przedstawiam zestawienie najważniejszych osiągnięć wraz z odnośnikami do odpowiednich punktów wyżej wymienionego wykazu.

- Liczba prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) Web of Sciences Thomas Reuters (stan z dnia 31.07.2014): **25** (w tym 5 prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego) [Załącznik II];
- Liczba monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych spoza bazy JCR: **6** [Załącznik II];
- Sumaryczny IF według listy JCR, zgodnie z rokiem 2013
IF= **49,9** (w tym $IF/IF^{2013}=14,13/14,83$ 5 prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego [Załącznik II]);
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW według uaktualnionej w 2013 roku listy: **643**. Po odjęciu punktów za monotematyczny cykl publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne: **467** [Załącznik II];

- Cytacje

- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Sciences Thomas Reuters (na dzień 31.07.2014):
136 (z autocytowaniami), **101** (bez autocytowań) [Załącznik II];
- Indeks Hirsha (H-index) według bazy Web of Sciences Thomas Reuters: **h=7** [Załącznik II];

The screenshot shows the top navigation bar of the Web of Science platform, including logos for Web of Science, InCites, Journal Citation Reports, Essential Science Indicators, and EndNote. The main header features the 'WEB OF SCIENCE' logo and the Thomson Reuters logo. Below the header, there are navigation links: 'Back to Search', 'My Tools', 'Search History', and 'Marked List' with a count of 21.

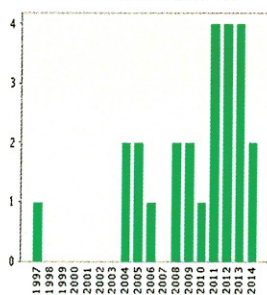
Citation Report: 25

(from All Databases)

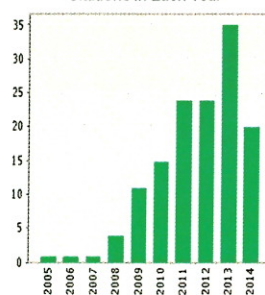
You searched for: AUTHOR: (Dubas E) ...More

This report reflects citations to source items indexed within All Databases.

Published Items in Each Year



Citations in Each Year



Results found: 25
Sum of the Times Cited [?]: 136
Sum of Times Cited without self-citations [?]: 101
Citing Articles [?]: 101
Citing Articles without self-citations [?]: 88
Average Citations per Item [?]: 5.44
h-index [?]: 7

- Sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego w tabelach

Liczba publikacji z podziałem na oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe, prace i streszczenia konferencyjne oraz artykuły popularno-naukowe (łącznie z artykułami zaprezentowanymi w osiągnięciu)

Rodzaj publikacji	Liczba	Suma IF*/IF²⁰¹³	Suma pkt. wg. listy MNiSZW z dnia 17.12.2013
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie z listy JCR	22	45,551/49,946	610
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie spoza listy JCR	6	-	31
Oryginalne prace twórcze opublikowane w pozostałych czasopiśmie zagranicznych i czasopiśmie polskich	1	-	2
Rozdziały w podręcznikach o międzynarodowym zasięgu	3	-	-
Nierecenzowane publikacje w materiałach konferencyjnych	1	-	-
Streszczenia w materiałach konferencyjnych (doniesienia) krajowe/międzynarodowe	32/45	-	-
Publikacje łącznie	77	45,55/49,946	643

* IF zgodny z rokiem opublikowania pracy; IF²⁰¹³ zgodny z rokiem 2013 podany w roku 2014 w bazie Journal Citation Reports

Zestawienie publikacji oryginalnych z podziałem ze względu na miejsce habilitanta wśród współautorów (łącznie z artykułami zaprezentowanymi w osiągnięciu)

Rodzaj publikacji	Prace samodzielne	Pierwszy autor	Drugi autor	Trzeci lub dalszy autor	Łącznie
Oryginalne prace twórcze	-	9	10	10	29
Streszczenia w materiałach konferencyjnych	1	21	32	24	78
Rozdziały w podręcznikach akademickich	-	-	-	3	3
Łącznie	1	30	42	37	110

Zestawienie czasopism JRC, w których opublikowano oryginalne prace twórcze przed i po uzyskaniu stopnia doktora (pkt. wg. listy MNiSZW z dnia 17.12.2013 r.) (łącznie z artykułami zaprezentowanymi w osiągnięciu)

Czasopismo (Układ alfabetyczny)	Przed uzyskaniem stopnia doktora			Po uzyskaniu stopnia doktora			Łączna suma pkt.
	N	Suma IF ²⁰¹³	Suma pkt.	N	Suma IF ²⁰¹³	Suma pkt.	
Advances in Cell Biology	1		2	-	-	-	2
Genome	1	1,558	20	-	-	-	20
PAGEN, Monografie Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu	1	-	2	-	-	-	2
Plant Cell Rep	1	2,936	35	-	-	-	35
Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych	2	-	9	-	-	-	18
ABC	-	-	-	2	1,324	20	40
Annual Report Polish Academy of Science				1	-	2	2
APP	-	-	-	1	1,524	25	25
Biologia	-	-	-	1	0,696	15	15
J Exp Bot	-	-	-	1	5,794	45	45
PCTOC	-	-	-	3	7,836	25	75
Physiol Mol Plant P	-	-	-	1	1,987	30	30
Plant Cell Rep	-	-	-	4	10,04	35	140
Plant Genetic Resources: Characterization and utilization	-	-	-	1	1,057	20	20
Plant Growth Regul	-	-	-	1	1,625	30	30
Plant Physiol Bioch	-	-	-	1	2,352	35	35
Plant Reproduction	-	-	-	1	-	25	25
Protoplasma	-	-	-	3	9,513	25	75
Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych PAN				1	-	9	9
Łącznie		4,494			43,478		643

N liczba prac w danym czasopiśmie; *IF zgodny z rokiem 2013 a podany w roku 2014

Wskaźniki naukometyczne wg poszczególnych baz danych z dnia 02.07.2014

Baza danych	Liczba cytowanych prac	Liczba cytowań	Indeks Hirscha (h-index)
Web of Science (WoS) Thomson Reuters	25	134	7
Google Scholar	26	219	8
Scopus	23	103	6

- Uczestnictwo w konferencjach naukowych [Załącznik IV-4]

- Uczestnik 27 międzynarodowych konferencji naukowych.
- Liczba wygłoszonych referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych: **15**. Ponadto liczne wykłady na seminariach naukowych w kraju i za granicą. W tym wykłady dla Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w roku 2014.
- Liczba pozostałych komunikatów prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. **62**.
- Całkowita liczba doniesień konferencyjnych zaprezentowanych w latach 2002-sierpień 2014: **77** (z **45** abstraktami zaprezentowanymi na konferencjach międzynarodowych).

- Recenzje [Załącznik IV-5]

- Recenzje książek i artykułów w czasopismach naukowych
1 recenzja książki
- 10 recenzji artykułów w czasopismach naukowych (2008-2014): **J Exp Bot, Protoplasma, Plant Cell Rep, Plant Reproduction, PCTOC, Plant Breeding**

- Informacje o uczestnictwie w projektach badawczych [Załącznik V]

- Uczestnik 10 krajowych, 6 międzynarodowych i 5 bilateralnych projektów badawczych
- Liczba i rodzaj projektów badawczych :
3+3 UE, 1 SAIA, 5 PAN bilateral projects, 10 MNiSW/NCN

- Informacje o współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi za granicą [Załącznik VI]

W trakcie realizacji pracy doktorskiej odbyłam dwa staże zagraniczne w Holandii do ośrodków: Plant Research International oraz Uniwersytet w Wageningen o łącznej długości 9 miesięcy. Po uzyskaniu stopnia doktora i objęciu stanowiska adiunkta w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN zrealizowałam w sumie 12 staży za granicą (The Institute of Plant Genetics and Biotechnology na Słowacji, Plant Systems Biology Department (VIB) Uniwersytetu Ghent w Belgii, CSIC w Hiszpanii) o łącznej długości prawie 3 miesięcy (20 tygodni). Staże zagraniczne związane były z realizacją 8 projektów [Załącznik VI].

- Uczestniczyłam w **26** kursach/warsztatach (**18** międzynarodowych i **8** w kraju).

- Informacje o działalności popularyzującej naukę [Załącznik VII]

- Od kilku lat jestem członkiem Komitetu Zarządu Akcji COST (2014 -2017, 2011-2013)
- Jestem ekspertem zewnętrznym w ocenie międzynarodowych projektów badawczych Fund for Scientific Research – FNRS.

- Informacje o działalności organizatorskiej [Załącznik VIII]

Od roku 2004 koordynuję działalność pracowni mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej i konfokalnej, biorę udział w planowaniu i zagospodarowaniu pomieszczeń Zakładu Biologii Komórki w IFR PAN w Krakowie. Od 2014 jestem Przedstawicielem Młodych Pracowników Naukowych do spraw Rozwoju Kadry IFR PAN w Krakowie.

- Informacje o działalności dydaktycznej [Załącznik VIII]

- Prowadzenie wykładów i ćwiczeń

Prowadziłam wykłady oraz ćwiczenia w ramach zleconych godzin dydaktycznych na Wydziale Geograficzno-Biologicznym Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie. Realizowałam kursy na studiach Podyplomowych z Biologii Molekularnej z Elementami Biotechnologii. Studia podyplomowe realizowane były w ramach 14 zadania "Uruchomienie studiów z Biologii Molekularnej z Elementami Biotechnologii" w projekcie "Rozwój potencjału Dydaktycznego Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie" współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w roku akademickim 2009/10 i 2010/11.

- Opieka naukowa nad magistrantami

Przez trzy lata sprawowałam opiekę nad wykonaniem eksperymentów do prac magisterskich 6 studentów Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie, których promotorem była prof. dr hab. Maria Wędzony. Objęłam samodzielną opiekę nad 2 pracami magisterskimi zrealizowanymi w IFR PAN w 2013 roku.

- Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego.

2014 - Pełnię funkcję promotora pomocniczego w otwartym przewodzie doktorskim Pana mgr inż. Przemysława Kopeć na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie.

2014 - Pełnię funkcję pomocniczego opiekuna naukowego w planowanym otwarciu przewodu doktorskiego Pana mgr. Piotra Szczyrka w Międzynarodowym Studium Doktoranckim Nauk Przyrodniczych PAN w Krakowie.

- Nagrody i wyróżnienia [Załącznik IX]

- Wyróżnienie mojej pracy doktorskiej
- Mój dorobek naukowy został trzykrotnie wyróżniony: dwukrotnie nagrodą Dyrektora IFR PAN za najwyższą liczbę publikacji w czasopismach z Listy Filadelfijskiej w latach: 2011 i 2012 w grupie młodszych pracowników oraz wyróżnieniem w 2013.

Ewa Dubas