

DR INŻ. EWA GRZEBELUS

AUTOREFERAT

ZAKŁAD GENETYKI, HODOWLI ROŚLIN I NASIENICTWA

INSTYTUT BIOLOGII ROŚLIN I BIOTECHNOLOGII

WYDZIAŁ OGRODNICZY

UNIWERSYTET ROLNICZY IM. HUGONA KOŁŁĄTAJA W KRAKOWIE

KRAKÓW 2014

1. Imię i nazwisko (Nazwisko panieńskie) **Ewa Grzebelus (Nowak)**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania.

magister inżynier ogrodnictwa, specjalizacja genetyka i hodowla roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 1994

Tytuł pracy: **Próby wykorzystania androgenezy dla otrzymania haploidów u warzyw z rodziny *Cruciferae***

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Adela Adamus

Recenzent: prof. dr hab. Wieńczysława Kozera

doktor nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, specjalność naukowa: genetyka i hodowla roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 2001

Tytuł rozprawy: **Charakterystyka gynogenicznej populacji oraz metody podwajania liczby chromosomów u haploidalnych roślin cebuli (*Allium cepa* L.)**

Promotor: prof. dr hab. Adela Adamus

Recenzenci: prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Szczytt
 prof. dr hab. Franciszek Dubert

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

1995-1996 asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra Szczegółowej Hodowli Lasu, Akademia Rolnicza w Krakowie

1996-2000 słuchacz Studium Doktoranckiego Biologii Stosowanej, Akademia Rolnicza w Krakowie

2000-2001 starszy technik, Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza w Krakowie

od 2001 adiunkt, Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa (obecnie: Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa), Akademia Rolnicza w Krakowie (obecnie: Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)

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.):

a) **tytuł osiągnięcia naukowego:**

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

Badania nad stymulacją rozwoju protoplastów w kulturach *in vitro*

b) **publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego:**

(autor/autorzy, rok wydania, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa)

1. **Grzebelus E.**, Szklarczyk M., Barański R., 2012. An improved protocol for plant regeneration from leaf- and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109 (1): 101-109 (**IF₂₀₁₂ = 3,633; punkty MNiSW₂₀₁₂: 25**, mój udział procentowy szacuję na **80%**)
2. **Grzebelus E.**, Kruk M., Macko-Podgórní A., Grzebelus D., 2013. Response of carrot protoplasts and protoplast-derived aggregates to selection using a fungal culture filtrate of *Alternaria radicina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 115 (2): 209-222 (**IF₂₀₁₂ = 3,633; punkty MNiSW₂₀₁₃: 35**, mój udział procentowy szacuję na **70%**)
3. **Grzebelus E.**, Szklarczyk M., Greń J., Śniegowska K., Jopek M., Kacińska I., Mrożek K., 2012. Phytosulfokine stimulates cell divisions in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mesophyll protoplast cultures. *Plant Growth Regulation* 67(1): 93-100 (**IF₂₀₁₂ = 1,67; punkty MNiSW₂₀₁₂: 30**, mój udział procentowy szacuję na **35%**)
4. Maćkowska K., Jarosz A., **Grzebelus E.**, 2014. Plant regeneration from leaf-derived protoplasts within the *Daucus* genus – effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117 (2): 241-252 (**IF₂₀₁₂ = 3,633; punkty MNiSW₂₀₁₃: 35**, mój udział procentowy szacuję na **45%**)

Sumaryczny IF_(zgodnie z rokiem opublikowania) = **12,569**

Suma punktów MNiSW_(zgodnie z rokiem opublikowania) = **125**

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

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

Wprowadzenie

Protoplast roślinny powstaje w wyniku mechanicznego lub enzymatycznego usunięcia ściany komórkowej (Eeckhaut i in. 2013). Do literatury termin protoplast został wprowadzony w 1880 r. przez Hansteina jako zlepek słów „protos”– pierwszy i „platos”– kształtować (Piwowarczyk 1980). Teoretycznie protoplasty są totipotenne co oznacza, że potencjalnie są zdolne do odtworzenia (regeneracji) organizmu. Ta właściwość może ujawnić się w określonych warunkach kultury, które inicjują zmianę pierwotnej determinacji komórek (Malepszy i Burza 2010). Jest ona warunkowana procesem odróżnicowania i zmiany wzorca ekspresji genów, które inicjują odbudowę ściany i umożliwiają włączenie się komórki w ponowny cykl podziałów mitotycznych. Powstałe komórki potomne realizując różne modele cytodyferencji mogą różnicować się w inne typy komórek w nowo tworzących się organach lub zarodkach somatycznych (Majewska-Sawka 2009). Ta właściwość czyni protoplasty dogodnym narzędziem w szeroko rozumianej biotechnologii roślin. Protoplasty po raz pierwszy zostały wyizolowane ponad 100 lat temu przez Klerckera (1892) z liści rośliny wodnej *Stratiotes aloides* (osoka aleosowata) w sposób mechaniczny poprzez pokrojenie splazmolizowanej tkanki i wyflukowanie uwolnionych komórek do roztworu hipertonicznego. Znaczący postęp w pracach nad protoplastami nastąpił ponad 50 lat temu, po zastosowaniu enzymów do ich izolacji (Cocking 1960). Dostępność handlowych preparatów enzymatycznych zawierających celulazy i pektynazy znacząco ułatwiła i przyspieszyła prace nad pozyskiwaniem protoplastów roślinnych. Początkowo stosowano dwustopniową procedurę ich izolacji polegającą na osobnym traktowaniu tkanek pektynazami dla separacji komórek, a następnie celulazami dla degradacji ich ścian (Takebe i in. 1968). Wkrótce technikę uproszczono do jednostopniowej poprzez jednoczesne trawienie tkanek mieszaninami enzymów pektyno- i celulozowych (Power i Cocking 1970) i taki tok postępowania jest stosowany do dzisiaj.

Protoplasty można izolować z roślin rosnących w szklarni, ale brak możliwości całkowitej kontroli warunków w niej panujących, zmienność sezonowa wpływająca na kondycję fizjologiczną roślin oraz konieczność dezynfekcji takiego materiału niekorzystnie wpływają na ilość i jakość uwolnionych komórek. Dlatego lepszą praktyką jest korzystanie z materiału aseptycznego i prowadzonego w ściśle kontrolowanych warunkach czyli pochodzącego z kultur *in vitro*. Wykorzystuje się w tym celu kultury roślin, pędów, siewek, kalusa oraz embriogenne, jak i nieembriogenne kultury zawieszinowe. Protoplasty można izolować z określonych tkanek np. tkanki mezofilowej, tkanki okrywającej (komórki szparkowe), tkanki kalusowej bądź określonych elementów roślin (blaszki liściowe, ogonki liściowe, całe liście, płatki kwiatowe) czy siewek (epikotyle, hipokotyle, korzenie). Ze względu na szybkość wyprowadzenia materiału donorowego szczególnie preferowane jest izolowanie protoplastów z siewek lub liści. Natomiast w przypadku gatunków opornych, reprezentowanych m.in. przez rośliny jednoliścienne (zboża, banan) cenne są komórki charakteryzujące się wysokim potencjałem regeneracyjnym, zazwyczaj pozyskiwane z embriogennych zawieszin komórkowych lub np. z aparatów szparkowych (Davey i in. 2005b).

Podstawowym miernikiem jakości uwolnionych protoplastów, a jednocześnie wskaźnikiem efektywności zastosowanej metody izolacji jest ich żywotność, którą ocenia się stosując różnorodne barwniki – bardzo popularnym jest diocjan fluoresceiny (FDA*; Davey i in. 2005b). Po odcięciu grup octanowych przez aktywne esterazy zlokalizowane w nienaruszonej błonie komórkowej przenika on do cytoplazmy żywych komórek i może być zwizualizowany w mikroskopie fluorescencyjnym. O odróżnicowaniu protoplastów świadczy odbudowa ściany komórkowej i podjęcie aktywności podziałowej. Tę weryfikuje się w różnych punktach czasowych kultury poprzez tzw. wydajność posiewu (ang. *plating efficiency*), która odzwierciedla udział formujących się agregatów komórkowych w stosunku do liczby protoplastów wprowadzonych do kultury (Orczyk 2009).

Krytycznym momentem każdej kultury jest odtworzenie ściany komórkowej i indukcja pierwszych podziałów mitotycznych. W tym celu stosuje się różnorodne systemy wspomagania obejmujące dobór właściwego medium hodowlanego i sposobu kultury protoplastów. Stosowane pożywki mogą bazować na recepturach (1) prostych, powszechnie stosowanych w roślinnych kulturach *in vitro* np. opracowanych przez Murashige i Skooga - pożywka MS (1962) czy Gamborga i in. - pożywka B5 (1968) lub (2) bogatych, dedykowanych do kultur protoplastów, zawierających substancje nieorganiczne, jak i organiczne zdefiniowane (witaminy, cukry, aminokwasy, kwasy organiczne, nukleotydy) i niezdefiniowane (np. mleczko kokosowe) – pożywka KM (Kao i Michayluk 1975). Wyżej wymienionym składnikom towarzyszą substancje stabilizujące ciśnienie osmotyczne pożywki, takie jak niemetalizowane cukry (mannitol, sorbitol) lub cukry wykorzystywane także jako źródło węgla (glukoza, sacharoza). Oprócz typowych regulatorów wzrostu, głównie auksyn i cytokinin, znane są przykłady stosowania innych związków do stymulacji podziałów komórkowych, takich jak brasinosteroidy (Oh i Clouse 1998), poliaminy (Rákosy-Tican i in. 2007) czy arabinogalaktany (Wiśniewska i Majewska-Sawka 2007).

Najprostszym sposobem kultury protoplastów jest umieszczenie ich w pożywce płynnej. W takich warunkach komórki mają jednak tendencję do agregacji, skutkiem czego są gorzej natlenione i bardziej narażone na toksyczne produkty własnego metabolizmu. Ponadto wszelkie manipulacje związane ze zmianami warunków kultury, np. wymiana pożywki, są trudniejsze i narażone na niepożądane, przypadkowe zakażenia. Alternatywą są systemy oparte na unieruchomieniu protoplastów w zestalających się (agar, agaroz) lub polimeryzujących (alginian) podłożach, a następnie umieszczeniu ich w płynnym medium. Taka separacja komórek z jednoczesną równomiernością zawieszenia w jednostce objętości hamuje produkcję polifenoli przedłużając tym samym żywotność komórek, stymuluje odtworzenie ściany komórkowej i promuje podziały mitotyczne (Davey i in. 2005 a, b). Dla protoplastów wrażliwych na wysoką temperaturę szczególnie korzystna jest immobilizacja w alginianie. W trakcie tego zabiegu z alginianu można formować krople (Damm and Willmitzer 1988), dyski (Pan et al. 2003) lub błonki różnej grubości: cienkie błonki (TAL - *thin alginate layer*; Damm et al. 1989) oraz super cienkie filmy (ETAF - *extra thin alginate film*; Pati et al. 2005). Udowodniono, że im cieńsza warstwa powstałego żelu alginianowego tym większa wydajność posiewu w kulturach protoplastów (Dovzhenko i in. 1998; Dovzhenko i in. 2003; Pati i in. 2005).

* wykaz stosowanych skrótów podano na końcu tej części tekstu

W większości aplikacji możliwość regeneracji protoplastów w rośliny jest zasadniczym etapem. Mimo, że znane są protokoły otrzymywania roślin z kultur protoplastów (tzw. *protoplast-to-plant system*) dla ponad 400 gatunków, głównie spośród takich rodzin jak *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Gramineae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* czy *Rosaceae* (Davey i in. 2005a), to szczególnie dla wielu roślin uprawnych wydajność regeneracji jest wciąż niska lub okazjonalna. W ostatnich latach obserwujemy powrót do badań bazujących na izolacji protoplastów. W obszarze prac podstawowych są one stosowane w eksperymentach z zakresu biologii komórki, w szczególności związanych z mechanizmami odróżnicowywania się komórek (Jiang i in. 2013). W kontekście aplikacyjnym, manipulacje na protoplastach są wykorzystywane w hodowli roślin uprawnych do generowania nowej zmienności genetycznej poprzez fuzję protoplastów gatunków uprawnych z pokrewnymi gatunkami dzikimi lub poprzez selekcję *in vitro* (Eeckhaut i in. 2013). Zastosowanie technologii opartych na izolacji protoplastów w praktyce hodowlanej musi być jednak poprzedzone opracowaniem najczęściej wysoko wydajnej, uniwersalnej lub dedykowanej konkretnej tkance donorowej procedury regeneracji roślin dla danego gatunku.

Cel badań

Nadrzędnym celem cyklu publikacji stanowiących treść niniejszego osiągnięcia naukowego były badania nad stymulacją rozwoju protoplastów w różnych warunkach kultury *in vitro*. Prowadzono je głównie na marchwi jadalnej jako obiekcie modelowym, lecz również na dzikich przedstawicielach rodzaju *Daucus* oraz buraku cukrowym powszechnie uważanym za gatunek odporny w kulturach protoplastów.

Realizacja założonego celu obejmowała:

- opracowanie efektywnego i szybkiego systemu regeneracji roślin marchwi z protoplastów liściowych i hipokotylowych
- wykorzystanie opracowanego systemu w badaniach nad selekcją *in vitro* w warunkach stresu biotycznego
- analizę wpływu fitosulfokiny na aktywność podziałową protoplastów liściowych buraka i dzikich taksonów *Daucus*
- analizę wpływu alginianu na aktywność podziałową protoplastów liściowych dzikich taksonów *Daucus* w różnych systemach kultury

Omówienie otrzymanych wyników

Marchew jest jednym z pierwszych gatunków roślin z powodzeniem wprowadzonych do kultur *in vitro* oraz gatunkiem modelowym w badaniach nad somatyczną embriogenezą (Gautheret 1939; Steward 1958). W 1972 roku po raz pierwszy wyizolowano protoplasty marchwi z 50-dniowych korzeni pochodzących z uprawy polowej (Kameya and Uchimiya 1972) oraz z zawiesiny komórkowej (Grambow et al. 1972). W obu przypadkach zregenerowano rośliny na drodze somatycznej embriogenezy. Na przestrzeni lat zawiesina komórkowa była podstawowym źródłem pozyskiwania protoplastów marchwi, szczególnie w badaniach nad somatyczną hybrydyzacją o zasięgu zarówno wewnątrz- czy międzygatunkowym jak również międzyrodzajowym (Dudits et al. 1977; Dudits et al. 1987;

Han et al. 2009). Mimo tego, że zawiesina komórkowa ze względu na wysoki potencjał embriogeniczny jest doskonałym źródłem protoplastów, to jej wyprowadzenie i utrzymywanie jest stosunkowo czaso-, praco- i kosztocłonne. Dodatkowo poprzedzone musi być otrzymaniem stabilnej kultury kalusowej, co zazwyczaj zajmuje, zależnie od obiektu, od kilku do kilkunastu tygodni. Alternatywą może być pozyskiwanie protoplastów z różnych części roślin lub siewek. Jak do tej pory jedynie Dirks i in. (1996) zregenerowali rośliny marchwi na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy z kultur protoplastów ogonków liściowych.

Założeniem badań prezentowanych w publikacji **4b.1** było opracowanie szybkiego i wysoko wydajnego systemu regeneracji roślin marchwi na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy z kultur protoplastów liściowych i po raz pierwszy hipokotylowych. W dalszej perspektywie te dwa typy protoplastów mogłyby być szczególnie przydatne w somatycznej hybrydyzacji, gdzie takie znaczniki morfologiczne jak chloroplasty protoplastów liściowych i pasma cytoplazmatyczne protoplastów hipokotylowych mogłyby być posłużone jako łatwy system identyfikacji komórek mieszańcowych. Dodatkowo fuzja takich morfologicznie różnych komórek oferuje możliwość selekcji heterokarionów w świetle fluorescencyjnym, gdzie można wykorzystać czerwoną autofluorescencję chloroplastów i fluorescencję komórek hipokotylowych po ich wybarwieniu przyżyciowym fluorochromem emitującym światło w innym zakresie spektralnym. Celem potwierdzenia uniwersalności opracowanych warunków wzrostu dla obu typów protoplastów badania przeprowadzono dla 7 obiektów z uwzględnieniem populacyjnej odmiany marchwi oraz 3 par męskosterylnych (A) i dopełniających (B) linii hodowlanych. Protoplasty liściowe izolowano z kultur około 3-tygodniowych roślin wyprowadzonych z nasion, podczas gdy protoplasty hipokotylowe uzyskano z około 10-dniowych kultur siewek. W efekcie zastosowanych warunków izolacji protoplastów (poprzedzonych wieloma eksperymentami wstępnymi – dane niepublikowane), obejmujących wstępną plazmolizę komórek w tkance oraz całonocną macerację w obecności celulazy (1%) i pektolizazy (0,1%) oraz oczyszczanie poprzez wirowanie w gradiencie gęstości, uzyskano wysoki plon zarówno protoplastów liściowych (średnio $3,21 \times 10^6$ z g świeżej masy) jak i hipokotylowych (średnio $0,96 \times 10^6$ z g świeżej masy). Są to wartości wystarczająco wysokie do przeprowadzenia fuzji protoplastów. Ponadto, w większości przypadków wydajność izolacji była wysoce powtarzalna, o czym świadczą niskie wartości błędów standardowego, szczególnie gdy materiałem donorowym były hipokotyle (bł. st. $< 0,5 \times 10^6$). Jakość uwolnionych protoplastów wyrażona poprzez określenie żywotności komórek po barwieniu FDA była zadowalająca i wynosiła średnio ok. 60 i 67% odpowiednio dla protoplastów liściowych i hipokotylowych. Dla zwiększenia wydajności podziałów komórkowych przed kulturą zastosowano immobilizację protoplastów w alginianie sodu. Nowym, nieproponowanym do tej pory rozwiązaniem przedstawionym w publikacji **4b.1** była modyfikacja systemu opartego na cienkich błonkach alginianowych. Główne elementy modyfikacji obejmowały: (1) aplikację mniejszej objętości mieszaniny alginianu i protoplastów na płytkę agrowo-wapniową (300 μ l zamiast 625 lub 1000 μ l proponowanych we wcześniejszych badaniach), (2) eliminację z systemu trudno dostępnej siatki polipropylenowej stosowanej dla rozplaszczania żelu oraz (3) minimalizację grubości błonki poprzez ruchy rotacyjne szalki z zaaplikowaną kroplą mieszaniny alginianu i protoplastów. Ponadto do kultury komórek zastosowano zmodyfikowaną pożywkę CPP (Dirks i in. 1996) bazującą na

przepisie Kao i Michayluk'a (1975), którą w stosunku do oryginalnej receptury uproszczono pozostawiając jedynie makro- i mikroskładniki, podstawowe witaminy (mezoinozytol, tiaminę, pirydoksynę, kwas nikotynowy, glicynę), kwasy organiczne, hydrolizat kazeiny, glukozę, 2,4-D i zeatynę. W efekcie wprowadzonych zmian obserwowano stosunkowo wysoką wydajność posiewu zarówno w kulturze protoplastów liściowych (średnio 40%), jak i hipokotylowych (średnio 67%). W ciągu 3-6 tygodni prowadzenia kultury w w/w pożywce, bez zmian jej osmotycum (zabieg często stosowany podczas prowadzenia kultury protoplastów), na skutek niezaburzonych podziałów komórkowych dla wszystkich badanych obiektów uzyskano masę proembriogenną przerastającą błonkę alginianową z okazjonalnie pojawiającymi się już na tym etapie zarodkami somatycznymi. W efekcie przeniesienia takiego materiału na pożywkę stałą bez regulatorów wzrostu obserwowano formowanie się z powstałej masy proembriogennej zarodków somatycznych z bardzo wysoką wydajnością, a następnie prawidłowo wykształconych roślin. Były one w większości diploidami (93%), które po okresie wzrostu wegetatywnego i wernalizacji wytwarzały żywotny pyłek i po samozapyleniu zawiązywały nasiona na poziomie jaki obserwowano u roślin otrzymanych z nasion. Zaproponowany w pracy **4b.1** system kultury protoplastów marchwi pozwala na niezwykle szybką regenerację roślin tj. już po 2-3 miesiącach wliczając czas potrzebny na przygotowanie materiału donorowego do izolacji protoplastów. Dodatkowo, ze względu na wysoką wydajność regeneracji roślin, niezależnie od obiektu i typu tkanki donorowej, oraz na uproszczenie procedury wydaje się on wartościowy w badaniach podstawowych nad selekcją *in vitro*, fuzją protoplastów czy transformacją, a także w badaniach aplikacyjnych obejmujących np. mikrorozmnażanie cennych materiałów hodowlanych.

Badania przedstawione w pracy **4b.2** są przykładem wykorzystania opracowanej w publikacji **4b.1** wydajnej metodyki izolacji i regeneracji protoplastów liściowych marchwi w selekcji *in vitro*. Najczęściej materiałem roślinnym używanym w selekcji *in vitro* jest kalus lub kultury zawieszinowe. Kalus jednak charakteryzuje się niejednorodnością tkanki pod względem ploidalności, co może skutkować trudnościami w regeneracji bądź sterylnością roślin pokolenia R0 (Fernández i in. 2000). Kultury protoplastów mogą być atrakcyjną alternatywą umożliwiając, w porównaniu do innych ekplantatów, selekcję (1) większej populacji jednolitych pod względem fizjologicznym komórek, (2) w kontrolowanych warunkach i (3) na mniejszej przestrzeni laboratoryjnej. Ponadto protoplasty i małe agregaty komórkowe, w porównaniu z innymi typami materiału roślinnego, są zazwyczaj bardziej wrażliwe na fitotoksyny, a tym samym bardziej odpowiednie do testów biologicznych (Gentile i in. 1992). Dodatkowo ich immobilizacja w matrycy żelowej (np. alginianie) pozwala na lepszą ekspozycję na czynnik selekcyjny, przez co uniknięcie presji selekcyjnej przez komórki zostaje zminimalizowane w odróżnieniu do selekcji bazującej na heterogenicznej i wielowarstwowej tkance kalusowej (Remotti i in. 1997; Mahlanza i in. 2013). Mimo tych zalet protoplasty raczej rzadko są wykorzystywane w selekcji *in vitro*, najprawdopodobniej ze względu na brak prostych i wydajnych metod ich izolacji i regeneracji dla roślin uprawnych.

Dużym problemem w hodowli marchwi jest podatność na patogen grzybowy *Alternaria radicina* Meier, Drechsler and E.D. Eddy. Grzyb ten towarzyszy marchwi na każdym etapie wegetacji, ale także podczas przechowywania, powodując tzw. czarną zgniliznę

korzeni, która wiąże się z dużymi stratami plonu. Stosowane zabiegi agrotechniczne i środki ochrony roślin są na tyle mało skuteczne, że wszędzie tam gdzie uprawia się marchew występuje *Alternaria*. Do tej pory metodami hodowli konwencjonalnej nie udało się otrzymać odmian odpornych, a wśród dostępnych odmian marchwi i dzikich form *Daucus* nie zidentyfikowano genów odporności na ten patogen. Mimo, że marchew jest rośliną modelową dla roślinnych kultur *in vitro*, w literaturze można znaleźć jedynie pojedyncze doniesienia o wykorzystaniu kultur tkankowych w selekcji na stropy biotyczne (Barański i in. 1997). Dlatego celem badań przedstawionych w publikacji **4b.2** była regeneracja roślin marchwi z kultur protoplastów w warunkach presji filtratu pokulturowego (FCF) z *Alternaria radicina* oraz wieloaspektowa analiza otrzymanego materiału, także pod kątem tolerancji na alternariozę. Wyniki przedstawione w omawianej publikacji są pierwszą udokumentowaną próbą zastosowania selekcji *in vitro* dla wygenerowania materiałów charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na czarną zgniliznę korzeni marchwi. Materiałem donorowym do izolacji protoplastów były trzy obiekty marchwi o różnym podłożu genetycznym, tj. dwie odmiany populacyjne oraz amerykańska linia hodowlana – wszystkie wrażliwe na czarną zgniliznę korzeni. Selekcji w obecności różnych stężeń FCF (1-50%) poddawano dwie grupy komórek tj. (1) protoplasty w dniu ich izolacji oraz (2) 5-dniowe kultury, tj. takie w których część protoplastów odtworzyła ścianę komórkową i podjęła pierwsze podziały mitotyczne. W przypadku rozpoczęcia selekcji w dniu izolacji protoplastów każde z zastosowanych stężeń filtratu grzybowego obniżało żywotność komórek oraz wydajność posiewu w stosunku do kombinacji kontrolnych, a aplikacja FCF w dawkach wyższych niż 5% blokowała całkowicie podziały komórkowe. W przypadku selekcji prowadzonej od 5-tego dnia kultury istotne obniżenie wydajności posiewu obserwowano od 3,5% FCF w pożywce, natomiast w kulturach zawierających 10-50% FCF widoczna plazmoliza komórek świadczyła o ich stopniowym obumieraniu. W obu typach kultur stwierdzono różnice obiektowe we wrażliwości na zastosowany czynnik selekcyjny – większą tolerancją cechowały się komórki odmiany Dolanka i linii 9304B, mniejszą komórki odmiany Amsterdamska. Badania innych autorów wykazały, że filtrat z płynnej kultury *Alternaria radicina* zawiera fitotoksyny (radicinina, radicinol i epi-radicinol) uczestniczące w procesie chorobotwórczym u marchwi i wyższy poziom tych toksyn stwierdzono u odmian bardziej wrażliwych na porażenie przez *Alternaria radicina* (Solfrizzo i in. 2004). O toksyczności filtratu świadczyły objawy powstałe po zaaplikowaniu go na materiał roślinny w postaci więdnienia, nekroz czy zahamowania wzrostu siewek. Obniżenie żywotności protoplastów oraz zahamowanie podziałów komórkowych przedstawione w publikacji **4b.2** dowodzą jego toksyczności również na poziomie komórkowym i uzasadniają jego zastosowanie jako czynnik selekcyjny. Natomiast mniejsza wrażliwość kultur pięciodniowych na działanie filtratu pokulturowego sugeruje, że obecność ściany komórkowej może stanowić barierę dla jego toksyn (Sjödin i Glimelius 1989; Breiman i Galun 1981). W efekcie selekcji, z kultur z dodatkiem 1-3,5% FCF zregenerowano rośliny. Rośliny, podobnie jak w publikacji **4b.1**, otrzymano na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy z uformowanej podczas kultury masy proembriogennej. Podstawowym założeniem selekcji *in vitro* jest indukcja zmienności genetycznej (tutaj nazywanej zmiennością somaklonalną) w warunkach stresu jaki jest generowany przez czynnik selekcyjny. Zmienność taką można identyfikować na różnych poziomach: morfologicznym, fizjologicznym, cytologicznym czy

molekularnym (Bairu i in. 2011). Większość roślin otrzymanych w toku eksperymentów przedstawionych w publikacji **4b.2** charakteryzowała się prawidłową morfologią, w pojedynczych przypadkach obserwowano zmiany w postaci bardziej podzielonych blaszek liściowych (ang. *fennel-like leaves*). Podobny brak zmian fenotypowych u roślin zregenerowanych pod presją stresu biotycznego nie jest zjawiskiem odosobnionym. Był obserwowany m.in. u goździka, bawełny, chryzantemy czy cytryny (Thakur i in. 2002; Ganesan i Jayabalan 2006; Kumar i in. 2008; Savita i in. 2011). Cytogenetyczna analiza regeneratów wykazała, że presja selekcyjna miała wpływ na liczbowe mutacje chromosomowe. Zdecydowanie więcej roślin tetraploidalnych obserwowano w populacji roślin zregenerowanych w obecności czynnika selekcyjnego niż z kultur kontrolnych. Nie stwierdzono natomiast występowania roślin aneuploidalnych. Nie wykazano także innych rearanżacji genomowych na podstawie testów molekularnych: profile RAPD-PCR i transponów typu MITE (*Krak*, *DcSto*, *Dc-hAT*) u analizowanych roślin były identyczne. Przeprowadzone laboratoryjne testy odpornościowe regeneratów wykazały, że plamy gnilne obserwowane pod wpływem inokulacji ogonków liściowych grzybnią *A. radicina* rozprzestrzeniają się wolniej i obejmują mniejszą powierzchnię w porównaniu z roślinami kontrolnymi (tj. otrzymanymi z nasion – tzw. kontrola polowa). Taka zależność była szczególnie widoczna u regeneratów tetraploidalnych. Te obserwacje potwierdzają hipotezę zaproponowaną we wczesnych badaniach nad selekcją *in vitro*, że toksyny filtratów grzybowych mogą mieć wpływ na ploidalność regeneratów i że poziom odporności może być zwiększony u poliploidalnych somaklonów (Latunde Dada i Lucas 1983; Hartman i in. 1984). Wyniki testu ogonkowego wykazały również, że regeneraty otrzymane z kultur poddanych działaniu czynnika selekcyjnego, jak i regeneraty z kultur kontrolnych cechowały się podobną tolerancją na *A. radicina*. To może sugerować, że większa w stosunku do kontroli polowej tolerancja regeneratów na atak patogena jest nie tyle efektem zmienności wygenerowanej pod wpływem toksyn grzyba, co skutkiem samej kultury *in vitro*. Wiążącą odpowiedź co do wartości wytworzonych materiałów można by otrzymać przeprowadzając testy laboratoryjne lub przechowalnicze na korzeniach marchwi. Jednak cechą charakterystyczną i w tym wypadku wykluczającą takie postępowanie jest wytwarzanie przez rośliny R0 bardzo zdeformowanych i rozwidlonych korzeni. Dodatkowo ewaluacja roślin R0 jest niewystarczająca, gdyż adaptacja komórek w warunkach *in vitro* do czynnika selekcyjnego może mieć podłoże epigenetyczne (Rai i in. 2011). Dlatego, niezależnie od wyników przeprowadzonego testu ogonkowego regeneraty zostały rozmnożone dla otrzymania linii pokolenia R2, które zostaną poddane szczegółowej analizie pod kątem wrażliwości na *A. radicina* zarówno w okresie wegetacji, jak i przechowywania.

Burak cukrowy (*Beta vulgaris* L.) należy do grupy gatunków, dla których bardzo trudno znaleźć warunki stymulujące odtworzenie ściany komórkowej lub/i indukcję podziałów mitotycznych w kulturach protoplastów mezofilowych. Mimo wprowadzanych na przestrzeni blisko trzech dekad innowacji wciąż nie udało się opracować prostego i stosunkowo uniwersalnego modelu regeneracji roślin z kultur protoplastów buraka. Uzyskany do tej pory postęp w badaniach nad rozwojem protoplastów buraka obejmował: (1) włączenie zarówno na etapie izolacji, jak i kultury protoplastów galusanu propylu – inhibitora lipoksygenazy

o właściwościach antyoksydacyjnych (stres oksydacyjny generowany podczas izolacji i kultury protoplastów uważany jest za istotny czynnik hamujący ekspresję totipotencji; Krens i in. 1990), (2) immobilizację protoplastów – głównie w żelu alginianowym (Schlangstedt i in. 1992; Hall i in. 1993), (3) systemy dokarmiające (ang. *feeder systems*) wykorzystujące kultury niańki (ang. *nurse cultures*; Hall i in. 1993) oraz (4) wykorzystanie jako donora protoplastów komórek szparkowych lub kultury kruchego kalusa (Hall i in. 1997; Dovzhenko i Koop 2003). Jednak zaproponowane rozwiązania albo były dedykowane określonej, wąskiej puli obiektów (głównie o właściwościach wysoce embriogennych) albo wymagały złożonych manipulacji (jak izolacja protoplastów z komórek szparkowych) w związku z czym wydają się być mało przydatne w rutynowych zastosowaniach. Ponadto dla polepszenia wydajności posiewu w kulturach protoplastów buraka stosowano takie stymulatory chemiczne jak: egzogenne poliaminy (Majewska-Sawka i in. 1997) czy białka arabinogalaktanowe (Wiśniewska i Majewska-Sawka 2007). Jednak jak do tej pory nie były one wystarczające do przełamania oporności na kulturę protoplastów liściowych – podobnie jak u marchwi szczególnie cennych ze względu na łatwość pozyskania ich w dużej liczbie i po krótkim czasie przygotowywania materiału donorowego. Dlatego celem badań prezentowanych w publikacji **4b.3** było sprawdzenie działania innej cząsteczki regulatorowej tj. fitosulfokiny (PSK) na liściowe protoplasty buraka cukrowego. Fitosulfokina jest związkiem peptydowym wyizolowanym stosunkowo niedawno z kultury komórek mezofilowych szparaga (Matsubayashi i Sakagami 1996). Stwierdzono, że należy do grupy oligopeptydów sygnalnych regulujących wzrost i rozwój komórek roślinnych (Matsubayashi i in. 1997; Ryan i Pearce 2001) i w stężeniach nanomolowych zachowuje się podobnie jak hormony roślinne, uczestnicząc m.in. w takich procesach jak odróżnicowywanie się komórek, ich proliferacja czy ponowne różnicowanie (Igasaki i in. 2003; Matsubayashi i in. 2004). Takie właściwości fitosulfokiny czynią ją, podobnie do szeroko stosowanych auksyn czy cytokinin, szczególnie interesującym suplementem w roślinnych kulturach *in vitro*. Wykorzystanie PSK w kulturach protoplastów pochodzących z mezofilu liściowego zaproponowane w pracy **4b.3** jest unikatowym rozwiązaniem. Jak do tej pory fitosulfokinę zastosowano jedynie w kulturach protoplastów ryżu izolowanych z kultury zawieszinowej (Matsubayashi et al. 1997). Podobnie jak w przypadku marchwi, dla wybrania uniwersalnej procedury, badania przedstawione w pracy **4b.3** prowadzono na kilku męskosterylnych i żeńskopłodnych liniach hodowlanych buraka o różnym pochodzeniu. Dodatkowo w eksperymentach wstępnych przetestowano trzy podłoża do immobilizacji protoplastów (alginian oraz dwa typy niskotopliwej agarozy) oraz trzy pożywki, spośród których dwie były modyfikacją pożywki CPP zastosowanej w pracy **4b.1**. W efekcie przeprowadzonych eksperymentów jedynie protoplasty immobilizowane w alginianie i prowadzone w pożywce CPP wzbogaconej putrescyną odbudowały ścianę komórkową, zreorganizowały cytoplazmę i przeszły pierwszy podział mitotyczny. Jednak zaledwie po dwóch kolejnych mitozach dalszy rozwój został zablokowany. Dopiero aplikacja PSK do kultury niezwykle pozytywnie wpłynęła na rozwój komórek. Spośród trzech testowanych stężeń (10, 100 i 1000 nM) dodatek 100 nM PSK skutkowało około 10-krotnym zwiększeniem wydajności posiewu w stosunku do kontroli. Natomiast liczba agregatów komórkowych w kulturach zawierających 10 lub 1000 nM PSK była porównywalna do tej obserwowanej na pożywkach bez fitosulfokiny. W ciągu 6 tygodni kultury, w pożywkach wzbogaconych

w 100 nM PSK na skutek systematycznych podziałów komórkowych w błonkach alginianowych formowała się widoczna gołym okiem tkanka kalusowa. Podobny wzorzec rozwojowy obserwowano w doświadczeniu założonym dla dwóch par linii męskosterylnych i żeńskopłodnych. Po trzech tygodniach kultury wydajność posiewu dla porównywanych obiektów wahała się od 17 do 28%. Obserwowane wartości nie różniły się statystycznie, co w tym wypadku jest korzystne, bo może świadczyć o pewnej uniwersalności dobranych parametrów kultury. Należy podkreślić, że są to pierwsze badania w których wykazano pozytywny wpływ PSK na procesy odróżnicowania się protoplastów liściowych i ponowne ich włączenie w podziały komórkowe. Ponadto jest to pierwsze doniesienie, w którym odnotowano tak wysokie wartości wydajności posiewu w liściowych kulturach protoplastów buraka – uzyskane jak dotąd nie przekroczyły 2% (Hall i in. 1993). Wyniki zaprezentowane w publikacji **4b.3** pozwalają żywić nadzieję, że PSK jako uniwersalna cząsteczka sygnałna uczestnicząca w regulacji wzrostu i rozwoju komórek może przełamać oporność na kulturę protoplastów liściowych innych gatunków roślin uprawnych o dużym znaczeniu gospodarczym, takich jak zboża, cebula, rośliny bobowate czy drzewiaste. Ponadto dużą zaletą PSK w porównaniu do podobnych substancji stymulujących uwalnianych przez dzielące się komórki w systemach opartych na kulturze niańki jest (1) łatwość jej aplikacji oraz (2) fakt, że jest związkiem ściśle zdefiniowanym, który można zsyntetyzować, w efekcie czego (3) jej poziom w kulturze może być precyzyjnie kontrolowany.

Jednym z praktycznych zastosowań kultur protoplastów jest możliwość przeprowadzania fuzji, pozwalająca wprowadzić unikatowe cechy z form dzikich do dostępnej puli materiałów hodowlanych. Stosowane w hodowli konwencjonalnej krzyżowania oddalone nie zawsze kończą się sukcesem ze względu na różne bariery pre- i post-zygotyczne i różną biologię kwitnienia kojarzonych partnerów. Dlatego przydatną, czasami wręcz jedyną alternatywą może być hybrydyzacja somatyczna. Jednym z wielu elementów warunkujących powodzenie fuzji protoplastów jest opracowanie procedur regeneracyjnych dla poszczególnych komponentów donorowych. Zwiększa to szansę na regenerację roślin z powstałych komórek hybrydowych. Protoplasty izolowane z różnych gatunków, a nawet z różnych tkanek w obrębie jednego gatunku, mogą mieć różne wymagania i w związku z tym procedury sprawdzające się dla gatunku uprawnego raczej rzadko da się zastosować dla form dzikich należących nawet do tego samego rodzaju. Dlatego celem badań przedstawionych w publikacji **4b.4** było opracowanie warunków regeneracji roślin z protoplastów dzikich form marchwi. Otrzymane wyniki mogą być wykorzystane w przyszłości w pracach nad poszerzeniem zmienności genetycznej marchwi jadalnej poprzez fuzję protoplastów. Jak do tej pory jedynym gatunkiem w obrębie rodzaju *Daucus*, który był eksplorowany w tym kontekście był *D. capilifolius* (Dudits i in. 1977; Ichikawa i in. 1987), wedle ostatnich doniesień zaklasyfikowany jako podgatunek *D. carota* (Spoonier i in. 2013). Doświadczenia wstępne do pracy **4b.4** wykazały, że stosując protokół przedstawiony w publikacji **4b.1** nie jest możliwa regeneracja roślin z kultur protoplastów innych gatunków *Daucus*. Zatem wprowadzono modyfikacje, które dotyczyły warunków immobilizacji protoplastów oraz bazując na pozytywnych przesłankach zaprezentowanych w pracy **4b.3**, aplikacji do pożywki fitosulfokiny. Innowacje związane z immobilizacją protoplastów obejmowały zastosowanie

oprócz autoklawowanego (stosowanego do tej pory), także filtrowanego alginianu oraz uformowanie z alginianu oprócz cienkich błonek także super cienkiego filmu. Przestanką do zastosowania innej niż autoklawowanie metody sterylizacji alginianu był fakt, że towarzyszące temu wysoka temperatura i wysokie ciśnienie mogą oddziaływać na polimeryzację molekuł alginianu, a tym samym modyfikować takie właściwości żelu jak wytrzymałość mechaniczna, zdolność dyfuzyjna i związana z tym stymulacja rozwoju zamkniętej biomasy (Leo i in. 1990). W literaturze w kontekście kultury protoplastów można znaleźć jedynie pojedyncze przypadki zwracające uwagę na sposób sterylizacji alginianu i sugerujące pozytywny wpływ jego filtrowania na wydajność posiewu (Draget i in. 1988; Hall i in. 1997; Dovzhenko i in. 1998; Dovzhenko i in. 2003). Jednak, w żadnej z prac stwierdzenia takie nie zostały poparte danymi liczbowymi. Badania prezentowane w pracy **4b.4** dotyczyły siedmiu obiektów *Daucus*, spośród których trzy stanowiły dzikie podgatunki *D. carota* (*D. c. subsp. azoricus*, *D. c. subsp. drepanensis*, *D. c. subsp. maritimus*), trzy dzikie gatunki *Daucus* (*D. aureus*, *D. pusillus*, *D. montevidensis*) i jeden zastosowany jako kontrola reprezentował marchew jadalną (*D. c. subsp. sativus* Hoffm., linia hodowlana 9304B). Materiałem donorowym do izolacji protoplastów były liście kultur pędowych (ang. *shoot cultures*) lub roślinnych (ang. *plantlet cultures*) odpowiednio dla form dzikich i marchwi jadalnej. Przyjęta metoda izolacji protoplastów, opracowana dla marchwi jadalnej i przedstawiona w publikacji **4b.1** okazała się wystarczająco wydajna do izolacji dużej liczby protoplastów u wszystkich badanych obiektów. Otrzymane wartości wahały się od 1,4 do 4,5 x 10⁶ protoplastów z g świeżej masy tkanki, przy czym ponad dwukrotnie więcej protoplastów uwalniało się z liści podgatunków *D. carota* (średnio 4,0 x 10⁶) w porównaniu z dzikimi gatunkami *Daucus* (średnio 1,8 x 10⁶). Jakość pozyskanych protoplastów była zadowalająca (średnio 70%) i podobnie jak w przypadku wydajności izolacji, protoplasty podgatunków *D. carota* cechowały się nieco wyższą żywotnością (75%) w stosunku do protoplastów dzikich gatunków *Daucus* (63%). Wyniki te, jak również inne obserwacje nie zamieszczone w niniejszej publikacji sugerują, że protoplasty dzikich gatunków *Daucus* w porównaniu do podgatunków *D. carota* (w tym marchwi jadalnej) są bardziej wrażliwe na stres jakim jest procedura izolacji. Ponadto o satysfakcjonujących wartościach wydajności izolacji i jakości protoplastów w przypadku dzikich gatunków *Daucus* w znaczącym stopniu decyduje rytm sezonowy (izolacja w terminie wiosenno-letnim jest korzystniejsza niż w terminie jesienno-zimowym) oraz jakość materiału donorowego. Izolacja z kultur pędowych w ściśle określonym momencie od ostatniego pasażu jest do tego stopnia istotna, że opóźnienie terminu nawet o jeden dzień skutkuje obniżeniem zarówno plonu, jak i jakości protoplastów. W toku prowadzonych badań udowodniono, że zastosowana modyfikacja polegająca na sterylizacji alginianu poprzez jego filtrowanie pozytywnie wpłynęła na wydajność posiewu. Na każdym etapie monitorowania tej cechy obserwowano ponad 10% więcej agregatów komórkowych w porównaniu do kultur bazujących na alginianie autoklawowanym. Taka tendencja była widoczna dla wszystkich badanych obiektów, spośród których dla trzech (*D. c. subsp. drepanensis*, *D. c. subsp. maritimus* i *D. pusillus*) różnice w wydajności posiewu obserwowane dla obu metod sterylizacji alginianu były statystycznie istotne. Na wydajność posiewu miały także wpływ zastosowane systemy kultury protoplastów w alginianie. Oba zostały zmodyfikowane w stosunku do oryginalnych procedur – zmiany wprowadzone do systemu TAL przedstawiono w publikacji **4b.1**, natomiast zmiany w systemie

ETAF dotyczyły uproszczenia etapu polimeryzacji alginianu, który zamiast na szkiełku podstawowym przeprowadzono na płytce agarowo-wapniowej, podobnie jak w systemie TAL. Odwrotnie do oczekiwań, lepszą o ponad 20% wydajność posiewu na każdym etapie ewaluacji uzyskano w cienkich błonkach alginianowych w porównaniu do kultury w super cienkim filmie. Taka tendencja, podobnie jak w przypadku metody sterylizacji alginianu, była obserwowana dla wszystkich badanych obiektów i jedynie dla *D. aureus* obserwowane wartości nie różniły się statystycznie. Dla zmniejszenia grubości błonek w systemie ETAF w porównaniu z systemem TAL, były one przygotowywane z 3-krotnie mniejszej objętości mieszaniny alginianu i protoplastów (100 μ l vs. 300 μ l), w efekcie czego zawierały jedną warstwę komórek. I mimo tego, że w obu systemach stosowano zawiesinę o tej samej gęstości protoplastów, to najprawdopodobniej wzajemny stymulujący efekt dzielących się komórek na sąsiadujące komórki niepodzielone był większy, a zatem korzystniejszy w wielowarstwowej błonce systemu TAL. Aplikacja PSK do pożywki, podobnie jak w przypadku protoplastów liściowych buraka, korzystnie wpłynęła na podziały komórkowe podnosząc wartości wydajności posiewu o ponad 10% w stosunku do kombinacji kontrolnych, tj. nie zawierających PSK. Niemniej jednak w przypadku dwóch gatunków tj. *D. montevidensis* i *D. pussilus* to pozytywne działanie PSK obserwowano jedynie we wczesnych etapach kultury, po czym podziały mitotyczne stopniowo ustawały i w efekcie nie formowała się masa prioembriogenna ani tkanka kalusowa. To może sugerować, że zastosowane stężenie PSK (100 nM) dla tych dwóch obiektów mogło być zbyt niskie aby stymulować komórki do ciągłej aktywności podziałowej. W efekcie przyjętych warunków izolacji i kultury protoplastów udało się zregenerować rośliny dla pozostałych czterech dzikich form *Daucus* z wydajnością nie niższą niż dla marchwi jadalnej. Otrzymane wyniki wskazują zatem, że te formy *Daucus*, jak i opracowany dla nich protokół regeneracji protoplastów mogą być wykorzystane w somatycznej hybrydyzacji dla poszerzenia zmienności marchwi jadalnej.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie nowych wyników, które mogą być wykorzystane w przyszłych badaniach zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym. Do najważniejszych osiągnięć można zaliczyć:

1. opracowanie wydajnej metodyki regeneracji roślin marchwi z kultur protoplastów liściowych i hipokotylowych (praca **4b.1**),
2. określenie warunków selekcji protoplastów marchwi w obecności filtratu pokulturowego z *Alternaria radicina* oraz otrzymanie regenerantów o zwiększonej tolerancji na porażenie tym patogenem (praca **4b.2**),
3. określenie pozytywnego wpływu fitosulfokiny w przerwaniu latencji podziałowej protoplastów liściowych buraka i dzikich taksonów *Daucus* (praca **4b.3** i **4b.4**),
4. wykazanie przydatności filtrowania alginianu jako metody jego sterylizacji w zwiększeniu wydajności posiewu w kulturach protoplastów (praca **4b.4**),
5. wykazanie możliwości regeneracji roślin z kultur protoplastów wybranych dzikich taksonów *Daucus* (praca **4b.4**).

Wykaz stosowanych skrótów

CPP – pożywka do protoplastów z ogonków liściowych marchwi (carrot petiole protoplast medium) · **ETAF** – super cienki film alginianowy (extra thin alginate film) · **FCF** – grzybowy filtrat pokulturowy (fungal culture filtrate) · **FDA** – dioctan fluoresceiny (fluorescein diacetate) · **PSK** – fitosulfokina (phytosulfokine) · **TAL** – cienka błonka alginianowa (thin alginate layer)

Literatura uzupełniająca

- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147-173
- Barański R., Nowak E., Grzebelus D., Szklarczyk M., Michalik B. (1997) Development of carrot callus in the presence of the crude extract from *Erwinia carotovora* culture. *J Appl Genet* 38A: 91-99
- Breiman A, Galun E (1981) Plant protoplasts as tools in quantitative assays of phytotoxic compounds from culture filtrates of *Phytophthora citrophthora*. *Physiol Plant Path* 19:181-191
- Cocking EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:927-929
- Damm B, Willmitzer L (1988) Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Mol Gen Genet* 213:15-20
- Damm B, Schmidt R, Willmitzer L (1989) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 217:6-12
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005a) Plant protoplast technology: current status. *Acta Physiol Plantarum* 27:117-129
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005b) 2004 SIVB congress symposium proceedings “Thinking outside the cell”: plant protoplast technology: status and applications. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:202-212
- Dirks R, Sidorov V, Tulmans C (1996) A new protoplast culture system in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation. *Theor Appl Genet* 93:809-815
- Dovzhenko A, Bergen U, Koop HU (1998) Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204:114-118
- Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop HU (2003) Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 222:107-111
- Dovzhenko A, Koop HU (2003) Sugar beet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. *Planta* 217:374-381
- Draget KI, Myhre S, Østgaard K (1988) Regeneration, cultivation and differentiation of plant protoplasts immobilized in Ca-alginate beads. *J Plant Physiol* 132:552-556
- Dudits D, Hadlaczky G, Lévi E, Fejér O, Haydu Z, Lázár G (1977) Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 51:127-132
- Dudits D, Maroy E, Praznovszky T, Olah Z, Gyorgyey J, Cella R (1987) Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. *Proc Natl Acad Sci* 84:8434-8438
- Eeckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D, Van Bockstaele E, Van Huylenbroeck J (2013) Progress in plant protoplast research. *Planta* 238:991-1003
- Fernández M.T., Fernández M., Centeno M.L., Cañal M.J., Rodriguez R. (2000) Reaction of common bean callus to culture filtrate of *Colletotrichum lindemuthianum*: differences in the composition and toxic activity of fungal culture filtrates. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* 61: 41-49
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Ganesan M, Jayabalan N (2006) Isolation of disease-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2) plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87:273-284
- Gautheret RJ (1939) Sur la possibilité de réaliser a culture indefinite des tissus de tubercules de carotte. *C R Hebd Seances Acad Sc* 208:118-120
- Gentile A, Tribulato E, Continella G, Vardi A (1992) Differential responses of citrus calli and protoplasts to culture filtrate and toxin of *Phoma tracheiphila*. *Theor Appl Genet* 83:759-764
- Grambow HJ, Kao KN, Miller RA, Gamborg OL (1972) Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta* 103:348-355
- Han L, Zhou Ch, Shi J, Zhi D, Xia G (2009) Ginsenoside Rb1 in asymmetric somatic hybrid calli of *Daucus carota* with *Panax quinquefolius*. *Plant Cell Rep* 28:627-638

- Hartman CL, McCoy TJ, Knows TR (1984) Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxins produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Plant Sci Lett 34:183-194
- Hall RD, Pedersen Ch, Krens FA (1993) Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugar beet). Plant Cell Rep 12:339-342
- Hall RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens G, Lefe`bvre M, Dunwell JM, van Tunen A, Krens FA (1997) Sugar beet guard cell protoplasts demonstrate a remarkable capacity for cell division enabling applications in stomatal physiology and molecular breeding. J Exp Bot 28:255-263
- Ichikawa H, Tanno-Suenaga L, Imamura J (1987) Selection of *Daucus* cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated *D. capillifolius* and iodoacetamide-treated *D. carota* by somatic cell fusion. Theor Appl Genet 74:746-752
- Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K (2003) Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. Plant Cell Physiol 44:1412-1416
- Jiang F, Zhu J, Liu H-L (2013) Protoplasts: a useful research system for plant cell biology, especially dedifferentiation. Protoplasma 250:1231-1238
- Kumar S, Kumar S, Negi SP, Kanwar JK (2008) In vitro selection and regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzelev) plants resistant to culture filtrate of *Septoria obesa* Syd. In Vitro Cell Dev Biol Plant 44:474-479
- Kameya T, Uchimiya H (1972) Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. Planta 103:356-360
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126:105-110
- Klercker JAF (1892) Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. Ofvers Vetensk Akad Forh Stokh:463-475
- Krens FA, Jamar D, Rouwendal GJA, Hall RD (1990) Transfer of cytoplasm from new Beta CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. 1. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. Theor Appl Genet 79:390-396
- Latunde Dada AO, Lucas JA (1983) Somaclonal variation and reaction to *Verticillium wilt* in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplasts. Plant Sci Lett 32:205-211
- Leo WJ, McLoughlin AJ, Malne DM (1990) Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. Biotechnol Prog 6:51-53
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ, Watt MP (2013) In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. Plant Cell Rep 32:249-262
- Majewska-Sawka A (2009) Struktura i właściwości komórek roślinnych. W: S Malepszy (red.) Biotechnologia roślin, PWN, Warszawa, 12-20
- Majewska-Sawka A, Niklas A, Jażdżewska E (1997) The effect of polyamines on the development of sugar beet protoplasts. Biol Plant 39:561-567
- Malepszy S, Burza W (2010) Kultura *in vitro* i biotechnologia – spełnione nadzieje? Biotechnologia 2(89):10-17
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. Proc Natl Acad Sci USA 93:7623-7627
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y (1997) Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. Proc Natl Acad Sci USA 94:13357-13362
- Matsubayashi Y, Goto T, Sakagami Y (2004) Chemical nursing: phytosulfokine improves genetic transformation efficiency by promoting the proliferation of surviving cells on selective media. Plant Cell Rep 23:155-158
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 18:100-127
- Oh MH, Clouse SD (1998) Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. Plant Cell Rep 17:921-924
- Orczyk W (2009) Otrzymywanie i znaczenie mieszańców somatycznych. W: S Malepszy (red.) Biotechnologia roślin, PWN, Warszawa, 101-121
- Pan ZG, Liu CZ, Murch SJ, El-Demerdash M, Saxena PK (2003) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L. and *Echinops spinosissimus* Turra. Plant Sci 165:681-687
- Pati PK, Sharma M, Ahuja PS (2005) Extra thin alginate film: an efficient technique for protoplast culture. Protoplasma 226:217-221

- Piwowarczyk W (1980) Hodowla protoplastów roślin wyższych *in vitro*. Wiadomości Botaniczne 24:127-138
- Power JB, Cocking EC (1970) Isolation of leaf protoplasts: macromolecular uptake and growth substance response. J Exp Bot 21:64-70
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection - an overview of the recent progress. Environ Exp Botany 71:89-98
- Ryan CA, Pearce G (2001) Polypeptide hormones. Plant Physiol 125:65-68
- Rákósy-Tican E, Aurori A, Vesa S, Kovacs KM (2007) *In vitro* morphogenesis of sunflower (*Helianthus annuus*) hypocotyls protoplasts: the effects of protoplast density, haemoglobin and spermidine. Plant Cell Tiss Organ Cult 90: 55-62
- Remotti PC, Löffler HJM, van Vloten-Doting L (1997) Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. Euphytica 96:237-245
- Savita, Virk GS, Nagpal A (2011) *In vitro* selection of calli of *Citrus jambhiri* Lush. for tolerance to culture filtrate of *Phytophthora parasitica* and their regeneration. Physiol Mol Biol Plants 17:41-47
- Schlangstedt M, Hermans B, Zoglauer K, Schieder O (1992) Culture of sugar beet protoplasts in alginate - callus formation and root organogenesis. J Plant Physiol 140:339-344
- Sjödin C, Glimelius K (1989) Differences in response to the toxin sirodesmin PL produced by *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. on protoplasts, cell aggregates and intact plants of resistant and susceptible *Brassica* accessions. Theor Appl Genet 77:76-80
- Solfrizzo M, Vitti C, De Girolamo A, Visconti A, Logrieco A, Fanizzi FP (2004) Radicinols and radicinol phytotoxins produced by *Alternaria radicina* on carrots. J Agric Food Chem 52:3655-3660
- Spooner D, Rojas P, Bonierbale M, Mueller LA, Srivastav M, Senalik D, Simon P (2013) Molecular phylogeny of *Daucus* (Apiaceae). Systematic Botany 38:850-857
- Steward FC (1958) Growth and organized development at cultured cells. II. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant. Am J Bot 45:709-713
- Takebe I, Otsuki Y, Aoki S (1968) Isolation of tobacco mesophyll protoplasts in intact and active state. Plant Cell Physiol 9:115-124
- Thakur M, Sharma DR, Sharma SK (2002) *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Plant Cell Rep 20:825-828
- Wiśniewska E, Majewska-Sawka A (2007) Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. Plant Cell Rep 26:1457-1467

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Oprócz czterech prac omówionych powyżej, stanowiących treść osiągnięcia naukowego, jestem współautorem 7 publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (wykaz poz. IIA 1-7), 21 publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych i krajowych spoza bazy Journal Citation Reports lub materiałach pokonferencyjnych (wykaz poz. IID 1-21) oraz 66 doniesień konferencyjnych (33 krajowych i 33 międzynarodowych, wykaz poz. IIK 1-5, IIIB 1-61).

Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się głównie wokół trzech obszarów badawczych i obejmowały zagadnienia związane z (1) indukcją gametycznej embriogenezy u roślin warzywnych, (2) stymulacją rozwoju protoplastów w różnych warunkach kultury oraz (3) analizą chromosomów roślinnych z wykorzystaniem technik cytogenetyki molekularnej. Pierwsze eksperymenty naukowe w jakich brałam udział dotyczyły stymulacji androgenyzy w kulturach pylnikowych rzodkwi (*Raphanus sativus* L. var. *major*) i brokuła (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) - otrzymane wyniki zostały przedstawione w mojej pracy magisterskiej. Po zakończeniu studiów, pod kierunkiem Pani prof. Barbary Michalik i Pani prof. Adeli Adamus rozpoczęłam badania nad gynogenezą u cebuli. Ich celem było opracowanie warunków

rozwoju roślin haploidalnych w kulturach pąków kwiatowych polskich odmian i materiałów hodowlanych. Analizowano wpływ różnych czynników na indukcję gynogenezy, m.in. składników pożywki (zarówno regulatorów wzrostu, jak i związków bazowych tj. mikro- i makroelementów), stopnia rozwoju gametofitu żeńskiego, genotypu czy warunków wzrostu roślin donorowych. Wyniki tych badań zostały szczegółowo omówione w publikacjach: IIA 1, IID 2, 4-5, 8-9 (wykaz). Kolejnym aspektem badań nad gynogenezą u cebuli była regeneracja i diploidyzacja gynogenicznych roślin. Prowadziłam je po rozpoczęciu w 1996 r studiów doktoranckich z Biologii Stosowanej na Akademii Rolniczej w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. A. Adamus. Badania te zostały podjęte ze względu na obserwowany niski stopień przeżywalności rozwijających się gynogenicznych zarodków oraz małą częstotliwość występowania spontanicznej diploidyzacji. Badania przeprowadziłam m.in. dzięki funduszom przyznanim w ramach projektu promotorskiego KBN (1998-2000), którego byłam głównym wykonawcą. W efekcie testowania różnych wariantów pożywek zoptymalizowałam warunki regeneracji i mikrorozmnażania gynogenicznych zarodków. Stosując takie związki c-mitotyczne jak kolchicina, trifluralin, oryzalina czy amiprofos metylu w różnych stadiach rozwojowych roślin gynogenicznych (stadium wykształconych roślin w *in vitro* lub *ex vitro*, stadium zarodków) opracowałam efektywny sposób diploidyzacji form haploidalnych. Otrzymane wyniki stanowiły podstawę przedstawionej przeze mnie pracy doktorskiej (2001) oraz zostały zaprezentowane w kilku publikacjach: IIA 2, IID 8, 10-12 (wykaz). Ponadto opracowane protokoły indukcji gynogenezy, regeneracji roślin i diploidyzacji form haploidalnych zostały włączone w programy hodowlane cebuli polskich spółek hodowlano-nasiennych dla szybszego wyprowadzenia linii homozygotycznych do produkcji mieszańców.

W trakcie studiów doktoranckich otrzymałam roczne stypendium badawcze z Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (DAAD) na pobyt w Institute of Horticultural Crops (obecnie Institute for Breeding Research on Horticultural Crops/Julius Kühn Institut) w Quedlinburgu. Zdobyłam tam doświadczenie w badaniach aplikacyjnych wykorzystujących kultury protoplastów do wdrożenia postępu w hodowli roślin uprawnych. Przedmiotem badań prowadzonych przeze mnie w instytucie było poszukiwanie czynników przełamujących latencję podziałową protoplastów czosnku – gatunku bardzo opornego w tego typu kulturze. Jednym z elementów wspomagających rozpoczęcie podziałów mitotycznych jest izolacja protoplastów z komórek o wysokim potencjale regeneracyjnym. Stąd podjęte przez mnie badania nad indukcją kruchej tkanki kalusowej pora, które zostały przedstawione w pracy IID 6 (wykaz). Ponadto zdobytą wiedzę z zakresu izolacji i kultury protoplastów pora wykorzystywałam nieco później włączając się jako wykonawca w badania kierowane przez Panią prof. B. Michalik nad uzyskaniem nośników odporności na mączniaka rzekomego cebuli (wykaz poz. II I13). Jedną z zaproponowanych metod było wykorzystanie fuzji protoplastów do wprowadzenia tej cechy. Materialną korzyścią z pobytu badawczego w Niemczech było przyznanie mi funduszy na zakup bardzo nowoczesnego jak na tamte czasy (2000 r) fluorescencyjnego mikroskopu odwróconego z systemem do archiwizacji obrazu w ramach programu pomocowego dla byłych stypendystów DAAD (wykaz poz. II I14). Fundusze udało się pozyskać dzięki wsparciu i zaangażowaniu partnera niemieckiego (Institute for Breeding Research on Horticultural Crops), u którego realizowałam stypendium. Zakup ten umożliwił badania Katedry (obecnie Zakładu) w zakresie kultur mikrospor i moje przyszłe prace nad

izolacją, fuzją i kulturą protoplastów. Pierwsze eksperymenty z zakresu protoplastów marchwi realizowałam wspólnie z moimi magiistrantkami. Niektóre z nich zostały opublikowane (wykaz poz. IID 14). Te wstępne prace pozwoliły na opanowanie warsztatu i pozyskanie funduszy na ich kontynuację. Badania kontynuowałam w ramach czterech projektów badawczych – w dwóch byłam kierownikiem, w dwóch wykonawcą (wykaz odpowiednio poz. II I5, 8 oraz II I6, 11, 13). Wyniki tych badań w części zostały włączone do cyklu publikacji, które są przedmiotem niniejszego postępowania habilitacyjnego. Pozostałe, dotyczące wykorzystania antybiotyków do kontroli czystości mikrobiologicznej kultur protoplastów marchwi i zastosowania hemoglobiny do zwiększenia wydajności posiewu w kulturach protoplastów dzikich taksonów *Daucus*, zostały częściowo opublikowane (wykaz odpowiednio poz. IID 16 i 21). Ponadto manuskrypt publikacji prezentującej wpływ antybiotyków β -laktamowych na regenerację protoplastów marchwi został po recenzjach odesłany do czasopisma z listy JCR i oczekuje na akceptację. Obecnie opracowuję wyniki otrzymane z badań realizowanych w ramach projektu badawczego finansowanego przez MRiRW (wykaz poz. II I11) nad wprowadzaniem cechy męskiej sterylności do marchwi poprzez fuzję protoplastów.

W latach 2002 i 2004 przebywałam na University of Wisconsin-Madison, USA (łącznie 11 miesięcy), gdzie pracowałam w laboratorium prof. P.W. Simona. Głównym nurtem prowadzonych tam przeze mnie badań była identyfikacja chromosomowych markerów cytogenetycznych u różnych gatunków w rodzaju *Daucus* w oparciu o technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Warsztatu do przeprowadzania tego typu eksperymentów miałam okazję uczyć się w laboratorium prof. J. Jianga – pioniera w kariotypowaniu roślin z wykorzystaniem technik molekularnych. Marchew i inne gatunki *Daucus* charakteryzują się stosunkowo małymi i niezróżnicowanymi pod względem morfologicznym chromosomami, praktycznie nierozróżnialnymi w klasycznym barwieniu prążkowym. Przeprowadzone przeze mnie badania w USA były pierwszą próbą analizy kariotypu u ośmiu gatunków *Daucus* (w tym marchwi jadalnej) z wykorzystaniem typowych markerów cytogenetycznych tj. sond rybosomalnego DNA (5S rDNA i 45S rDNA). Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacjach IIA 3 i IID 13 (wykaz). Badania cytogenetyczne w kraju mogłam rozwinąć na szerszą skalę po zdobyciu funduszy na zakup mikroskopu automatycznego z fluorescencją wielokanałową i z akcesoriami do archiwizacji i obróbki obrazu (specjalistyczna czarno-biała kamera cyfrowa wysokiej czułości i program do archiwizacji i obróbki obrazów z FISH) – wykaz poz. II I15. W dalszych prowadzonych przeze mnie pracach nad strukturą kariotypu marchwi udało się zidentyfikować sondy chromosomowo specyficzne (wykaz poz. IIA 6, IID 15, 18), sondy centromerowo specyficzne (wykaz poz. IIA 6, IID 19) oraz zwizualizować na chromosomach rozmieszczenie transpozonów *DcSto* z rodziny *Stowaway* (wykaz poz. IIA 7). Są to pierwsze doniesienia przedstawiające charakterystykę chromosomów marchwi w oparciu o tak szeroki zestaw markerów cytogenetycznych. Badania struktury genomu marchwi w oparciu o diagnostykę cytogenetyczną kontynuuję uczestnicząc w aktualnie realizowanych projektach badawczych (wykaz poz. II I10).

Równolegle, uczestnicząc w innych projektach (wykaz poz. II I3, 9), prowadziłam badania cytogenetyczne obiektów o małych i podobnych morfologicznie chromosomach, poszerzając zakres analizowanych gatunków o przedstawicieli roślin ozdobnych

(rododendron) i sadowniczych (borówka). W efekcie prac nad rododendronem opracowano warunki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do weryfikacji mieszańcowego charakteru roślin uzyskanych w toku krzyżowań międzygatunkowych (wykaz poz. IIA 4, IID 20). Natomiast w badaniach nad borówką podjęto próby analiz filogenetycznych m.in. w oparciu o diagnostykę cytogenetyczną.

Innym aspektem badań, do których wracałam w różnych momentach swojej działalności naukowej były zagadnienia związane ze stymulacją odporności marchwi na patogeny w warunkach *in vitro*. W początkowym okresie były to prace nad indukcją odporności w kulturach kalusa marchwi na *Erwinia carotovora* (wykaz poz. IID 1, 3). Potem badania nad poszukiwaniami odporności na *Alternaria radicina* czy *Botrytis cinerea* w kulturach protoplastów (wykaz poz. IB 2, II 11, 5) lub poprzez transformacje kultur zawiesinowych (wykaz poz. II 14). Podjęłam również badania dotyczące biologii kwitnienia m.in. lachenalii (wykaz poz. II 17) oraz dzikich gatunków *Daucus* (wykaz poz. IID 17) obejmujące analizę fazy progamicznej i żywotności pyłku.

LICZBOWE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

	<i>PRZED DOKTORATEM</i>			<i>PO DOKTORACIE</i>			<i>ŁĄCZNIE</i>		
	LICZBA	PKT (MNIŚW)	IF	LICZBA	PKT (MNIŚW)	IF	LICZBA	PKT (MNIŚW)	IF
1. Oryginalne prace twórcze									
- wykorzystane w monotematycznym cyklu publikacji									
a. publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports (JCR)</i>				4	125	12,569	4	125	12,569
- publikacje poza monotematycznym cyklem									
a. publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports (JCR)</i>	1	16	0,943	6	139	10,692	7	155	11,635
b. publikacje w innych czasopismach recenzowanych	4	11		7	26		11	37	
2. Pozostałe publikacje naukowe									
- prace konferencyjne									
a. opublikowane w materiałach z konferencji międzynarodowych	4						4		
b. opublikowane w materiałach z konferencji krajowych	3			3			6		
- komunikaty naukowe									
a. opublikowane w materiałach z konferencji międzynarodowych	7			7			33		
b. opublikowane w materiałach z konferencji krajowych	26			26			33		
RAZEM	45	27	0,943	53	290	23,261	98	317	24,204

ZESTAWIENIE CYTOWAŃ (wg Web of Knowledge na dzień 22.05.2014)

Kategoria	Ogółem	Bez autocytowań
Liczba prac w bazie	17	
Liczba cytowań	59	52
Liczba artykułów cytujących	51	46
Średnia liczba cytowań jednego artykułu	3,47	
Indeks H	4	

Kraków, 26 maja 2014

