

DR INŻ. AGNIESZKA KIEŁKOWSKA

Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

ZAŁĄCZNIK NR 3

AUTOREFERAT

Kraków, 2019

1. Imię i nazwisko

AGNIESZKA KIEŁKOWSKA (panieńskie Ciepichał)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Dyplom magistra inżyniera ogrodnictwa, specjalizacja genetyka i hodowla roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 2002

Tytuł pracy: Indukcja androgenezy u kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* var. *capitata*) z użyciem technik *in vitro* pylników i izolowanych mikrospor

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Adela Adamus

Recenzent: prof. dr hab. Barbara Michalik

Dyplom doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, specjalność naukowa: genetyka i hodowla roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 2007

Tytuł rozprawy: Wykorzystanie indukowanej partenogenezy do otrzymywania haploidów marchwi (*Daucus carota* L.)

Promotor: prof. dr hab. Adela Adamus

Recenzenci: prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Szczytt
prof. dr hab. Barbara Michalik

Dyplom Studium Pedagogicznego dla nauczycieli akademickich, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie, Studium Pedagogiki i Psychologii, 2012

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2007-2009	asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza w Krakowie (od 2008 r. Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)
2009-2010	adiunkt, Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
2010-2011	research associate, United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service Vegetable Crops Research Unit (USDA-ARS VCRU), Madison, Wisconsin, USA
od 2011	adiunkt, Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa (od 2014 Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa), Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

W latach 2014-2015 przebywałam na urloпах macierzyńskim i rodzicielskim (łącznie 12 miesięcy)

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. 2018 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji pt.: **Stymulacja aktywności mitotycznej oraz regeneracji roślin w kulturach protoplastów kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* L.)**

b) publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego:

1. **Kiełkowska A.**, Adamus A., 2012. An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 48: 265–273
(IF₂₀₁₂: 1,139¹; punkty MNiSW₂₀₁₂: 20², udział własny 80%)
2. **Kiełkowska A.**, Adamus A., 2014. Embedding in filter sterilized alginate enhances *Brassica oleracea* L. protoplast culture. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 56/2: 20–26
(IF₂₀₁₄: 0,730; punkty MNiSW₂₀₁₄: 20, udział własny 80%)
3. **Kiełkowska A.**, Adamus A., 2017. Early studies on the effect of peptide growth factor phytosulfokine- α on *Brassica oleracea* var. *capitata* L. protoplasts. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86(3):3558, <https://doi.org/10.5586/asbp.3558>
(IF₂₀₁₇: 0,876; punkty MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: 25, udział własny 80%)
4. **Kiełkowska A.**, Adamus A., 2018. Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation* <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9903-y>
(IF_{2017, 5-letni}: 2,333; punkty MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: 35, udział własny 80%)³

¹ Liczbę punktów za publikację podano wg roku opublikowania na podstawie wykazu czasopism naukowych MNiSW; w przypadku braku danych (lata 2017 i 2018) podano liczbę punktów wg listy MNiSW 'Ujednolicony wykaz czasopism naukowych za lata 2013-2016' z dnia 26 stycznia 2017 r.

² Impact Factor (IF) wg bazy *Journal Citation Reports (JCR)* podano zgodnie z rokiem ukazania się pracy; w przypadku braku danych (2018 r.) podano aktualny sumaryczny 5 – letni Impact Factor (IF) dla czasopisma

³ praca w wersji on-line ukazała się na stronie wydawcy 28.12.2019 ale nie jest jeszcze widoczna w bazie Web of Science, niemniej jednak czasopismo jest uwzględnione w JCR (stan na 2 kwietnia 2019)

Suma punktów MNiSW: **100**

Sumaryczny IF = **5,078**

* Oświadczenie współautorki powyższych prac określające indywidualny wkład w powstanie w/w publikacji stanowi załącznik 7 do niniejszego wniosku.

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

Wprowadzenie

Kapusta głowiasta (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) należy do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) i jest jednym z najważniejszych warzyw uprawianych zarówno w Polsce jak i na świecie. Polska znajduje się w pierwszej dziesiątce największych producentów kapusty, a na czele listy plasują się Chiny, Indie i Rosja (FAO Stat 2017). Kapusta głowiasta jest gatunkiem wysoce zróżnicowanym pod względem budowy morfologicznej i obejmuje wiele cenionych przez konsumentów warzyw takich jak brokuł, brukselka, jarmuż, kalafior czy kalarepa. Kapusta głowiasta odgrywa istotną rolę w diecie człowieka ze względu na bogactwo witamin (A, B i C), wysoką zawartość związków mineralnych, glukozyolanów, kwasów organicznych czy błonnika pokarmowego. Jest stosowana również w fitoterapii m.in. przy leczeniu stanów zapalnych i nieżytu przewodu pokarmowego, bólach reumatycznych mięśni i stawów (Orłowski 2000).

Konwencjonalne metody hodowli gatunków z rodzaju *Brassica* przyczyniły się do poprawy zarówno plonu jak i jego jakości, jednakże problemem pozostaje poprawa cech związanych z odpornością na choroby (szczególnie kiłę kapusty) i szkodniki, jak i introdukcja cech przenoszonych cytoplazmatycznie (np. cytoplazmatyczna męska sterylność, CMS). Przyczyn takiego stanu upatruje się głównie w zawężonej puli genowej gatunku, skomplikowanym schemacie dziedziczenia (cechy wielogenowe, serie alleli) lub problemami związanymi z transferem cech (np. bariery krzyżowalnicze) (Radchuk i in. 2002). Rozwój metod biotechnologicznych, znajdujących zastosowanie w hodowli roślin, stwarza nowe możliwości rozwiązania tych problemów. Do takich można zaliczyć techniki stosowane w kulturach *in vitro*, z których przydatną w przypadku transferu genów, jest fuzja protoplastów i uzyskanie somatycznych mieszańców.

Protoplasty roślinne to pozbawione ściany komórkowej żywe komórki otoczone błoną komórkową - plazmolemmą (Fehér i Dudits 1994). W wyniku usunięcia ściany komórkowej, komórki tracą swój pierwotny kształt stając się sferycznymi jednokomórkowymi eksplantatami (Navrátilová 2004). W wyniku indukowanej fuzji protoplastów istnieje możliwość uzyskania komórek hybrydowych łączących w sobie cechy ważne dla hodowli odpornościowej czy heterozyjnej. Zregenerowane z takich protoplastów rośliny mogą stanowić cenny materiał wyjściowy do dalszych badań nad zwiększaniem bioróżnorodności. W kontekście aplikacyjnym, zastosowanie technologii opartych na wykorzystaniu protoplastów musi być poprzedzone opracowaniem wydajnej metodyki obejmującej zarówno etap izolacji protoplastów, prowadzenia kultury jak i regeneracji roślin. Pomimo iż w literaturze światowej dostępne są liczne protokoły izolacji i prowadzenia kultur protoplastów, to dla wielu gatunków roślin uprawnych wydajność regeneracji wciąż jest problematyczna (Davey i in. 2010, Eeckahut i in. 2013).

Badania nad kulturami protoplastów roślin z rodzaju *Brassica* rozpoczęły się w latach 80-tych ubiegłego wieku i dotyczyły głównie gatunku o największym ekonomicznym

znaczeniu, a mianowicie rzepaku. Badania prowadzono w kierunku optymalizacji metodyki izolacji protoplastów oraz prowadzenia fuzji w celu uzyskiwania mieszańców somatycznych rzepaku z różnymi przedstawicielami gatunku jak i dzikimi krewnymi (Yarrow i in. 1990, Heath i Earle 1997, Yamagishi i in. 2002). Metodyka izolacji protoplastów opracowana dla rzepaku znalazła tylko częściowe zastosowanie dla innych gatunków z rodzaju *Brassica* (Glimelius 1984), co stało się przyczyną do opracowywania protokołów dedykowanych konkretnym gatunkom z tego rodzaju. Badania takie prowadzono również dla kapusty głowiastej. Opracowane metodyki umożliwiały wydajną izolację protoplastów i przeprowadzenie fuzji. Znane są przypadki transferu genów odporności do kapusty głowiastej np. na alternariozę z gorczycy białej (Hansen i Earle 1997) czy tasznika pospolitego (Sigareva i Earle 1999), odporności na *Xanthomonas campestris* z rzepaku (Hansen i Earle 1995), czy odporności na *Erwinia carotovora* z rzepy (Ren i in. 2000). Istnieją również doniesienia na temat transferu CMS typu Ogura z kalafiora do kapusty (Walters i in. 1992). Jednakże praktyczne rezultaty uzyskano dla wyselekcjonowanych materiałów o wysokim potencjale regeneracyjnym tzw. 'high responsive genotypes' (Jourdan i Earle 1989, Sigareva i Earle 1997, Sigareva i Earle 1999, Holme i in. 2004). W wielu przypadkach, pomimo wysiłków różnych zespołów badawczych z całego świata potencjał do regeneracji z kultur protoplastów u badanych obiektów kapusty głowiastej był niewystarczający, co skutkowało brakiem uzyskania roślin (Glimelius 1984, Zhao i in. 1995, Hansen i in. 1999, Kirti i in. 2001). Głównych przyczyn takiego stanu upatruje się w czynniku genotypowym. Badania genetycznych podstaw regeneracji u kapusty głowiastej wskazały na ilościowe dziedziczenie tej cechy (Holme i in. 2004), co znacznie utrudnia jej transfer drogą generatywną do innych materiałów i tym samym jej rozpowszechnienie.

Z teorii wiadomo, że protoplasty roślinne są totipotentne, co oznacza, że posiadają zdolność do odróżnicowania się (dedyferencjacji), ponownego wejścia w cykl komórkowy i przejścia przez kolejne podziały mitotyczne a w końcu do regeneracji całej rośliny (Eeckhaut i in. 2013). Odróżnicowanie komórki zachodzi w specyficznym środowisku, które określane jest mianem warunków kultury. Warunki kultury w kontekście protoplastów obejmują m.in. takie czynniki jak: procedura izolacji (plazmoliza, maceracja enzymatyczna), osmotikum użytych roztworów, skład medium do hodowli, sposób prowadzenia kultury, światło (natężenie, barwa, długość ekspozycji) czy temperatura. Warunki prowadzenia kultur protoplastów nie są uniwersalne i wykazują dużą specyficzność w odniesieniu do gatunku a nawet typu eksplantatu (Davey i in. 2010, Malepszy i Burza 2010). Owe warunki kultury są czynnikiem inicjującym zmianę pierwotnej determinacji komórek. Proces rozpoczyna się od dekondensacji chromatyny, co skutkuje zmianą wzorca ekspresji genów oraz inicjuje aktywację genów, które kodują białka związane z procesami różnicowania i totipotencji np. czynniki transkrypcyjne NAC (Avivi i in. 2004), białka odgrywające rolę w regulacji cyklu komórkowego, czy sygnalizacji hormonalnej (Zhao i in. 2001). Ekspresji ulegają również geny inicjujące odbudowę ściany komórkowej, co jest warunkiem koniecznym do włączenia się komórki w ponowny cykl podziałów mitotycznych. Efektem kolejnych mitoz są komórki potomne, które z czasem realizują różne modele cytodyferencjacji, co prowadzi do indukcji

organów czy zarodków somatycznych. Mając na uwadze fakt, że efekt genotypu jest szczególnie silny, kiedy regeneracja związana jest ze zmianą pierwotnej determinacji rozwojowej, co ma miejsce w kulturach protoplastów, istotnym działaniem jest poprawa warunków kultury zmierzająca do intensyfikacji aktywności mitotycznej protoplastów, a co za tym idzie również regeneracji roślin.

Cel badań

Głównym celem cyklu publikacji stanowiących treść niniejszego osiągnięcia naukowego była stymulacja aktywności mitotycznej oraz regeneracji roślin z kultur protoplastów u kapusty głowiastej. W doświadczeniach wykorzystano zróżnicowany materiał roślinny obejmujący odmiany populacyjne, mieszańcowe jak również linie hodowlane. Protoplasty izolowano zarówno z hipokotyli siewek jak i z liści młodych roślin.

Realizacja założonego celu obejmowała:

- opracowanie efektywnego systemu prowadzenia kultury i regeneracji roślin z protoplastów
- analizę wpływu immobilizacji na aktywność mitotyczną protoplastów
- analizę wpływu fitosulfokiny na resyntezę ściany komórkowej, aktywność mitotyczną protoplastów oraz na proces regeneracji roślin

Omówienie otrzymanych wyników

Moje zainteresowanie kulturami protoplastów jest efektem odpowiedzi na zapotrzebowanie ze strony polskich firm hodowlanych, poszukujących skutecznych metod poszerzenia zmienności w swoich materiałach wyjściowych kapusty głowiastej. Efektem wspólnych wysiłków był projekt finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (MRiRW) w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego hodowli w produkcji roślinnej (zał. 5, poz. II-I 10), w którym byłam głównym wykonawcą zadania badawczego dotyczącego kultur protoplastów. Prace wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego w dużej mierze są efektem działań podjętych w ramach wymienionego projektu. Prace rozpoczęto od wykorzystania standardowych metod izolacji i prowadzenia kultur protoplastów dla rodzaju *Brassica* opracowanych przez Pelletier i in. (1983) oraz Glimelius (1984). Do izolacji, wykorzystano materiał prowadzony w warunkach kultur *in vitro*, co zmniejszało ryzyko zakażeń. Obie metodyki opierają się na najprostszym systemie prowadzenia kultur protoplastów, gdzie zawieszony po izolacji umieszcza się w płynnej pożywce na szlacie Petriego. Prowadzenie kultury tym sposobem powodowało jednak silną agregację komórek. Ponadto powstające agregaty miały skłonność do opadania na dno szalki, co wiązało się z niską aktywnością mitotyczną komórek (dane niepublikowane). Agregacja komórek jest zjawiskiem obserwowanym w kulturach protoplastów innych gatunków, a skutkiem tego zjawiska jest gorsze natlenienie, większe narażenie na toksyczne produkty przemiany materii a w efekcie zamieranie kultury (Davey i in. 2005). Dodatkowo metodyka zaproponowana przez Pelletier i in. (1983) opierała się na częstej zmianie pożywki do kultury (czterokrotnie w trakcie fazy płynnej). To postępowanie skutkowało zakażeniami i koniecznością eliminacji kultur (dane niepublikowane). W związku

z tym podjęto prace zmierzające do opracowania efektywnego systemu prowadzenia kultury i regeneracji roślin z protoplastów oraz po raz pierwszy u kapusty głowiastej, wykonano analizę wpływu immobilizacji na aktywność mitotyczną protoplastów (**publikacje 1 i 2**).

Badania przeprowadzono na 10 zróżnicowanych obiektach kapusty głowiastej obejmujących odmiany populacyjne, mieszańcowe oraz linie podwojonych haploidów (**publikacja 1**). Protoplasty liściowe izolowano z roślin wyprowadzonych z nasion, natomiast protoplasty hipokotylowe izolowano z etiolowanych siewek. W badaniach dokonano modyfikacji procedur izolacji proponowanych w pracach Pelletier i in. (1983) oraz Glimelius (1984). Modyfikacje polegały na uproszczeniu składu roztworu do plazmolizy (sam mannitol, bez dodatków), zmianie składu mieszaniny enzymatycznej, uproszczeniu metodyki - 4 krotną wymianę na pożywki o różnym składzie (Pelletier i in. 1983) zamieniono na jednokrotną wymianę pożywki oraz zastosowaniu immobilizacji w alginianie jako sposobu prowadzenia kultury. W skrócie, protoplasty izolowano poprzez plazmolizowanie pofragmentowanej tkanki a następnie poddaniu jej całonocnej maceracji w trzech mieszaninach enzymatycznych różniących się typem (celulaza, macerozym, driselaza, pektoliza) i stężeniem (0,1 - 1,0%) enzymów. Mieszaninę po maceracji oczyszczano poprzez wirowanie w gradiencie gęstości. W efekcie zastosowania takiej procedury uzyskano stosunkowo wysoki plon protoplastów zarówno z liści ($1,4 - 3,2 \times 10^6$ z g świeżej masy) jak i hipokotyli ($0,6 - 0,8 \times 10^6$ z g świeżej masy). Otrzymany plon protoplastów był wystarczający do założenia kultury i nie odbiegał od wartości cytowanych w literaturze (Klimaszewska i Keller 1987, Chikkala 2009). Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ mieszaniny enzymatycznej na plon protoplastów. Mieszanina zawierająca drizelazę rekomendowana przez Robertson i Earle (1986) okazała się być najmniej wydajna. Podwyższenie stężenia celulazy z 0,2% (Pelletier i in. 1983) do 1% zastosowane w niniejszym protokole również miało korzystny wpływ na wydajność izolacji. Wyizolowane protoplasty poddano immobilizacji w alginianie sodu.

Immobilizacja, czyli unieruchomienie w żelowej matrycy zapewnia mechaniczne wsparcie pozbawionym ściany komórkowej protoplastom oraz zapobiega ich agregacji, co ma miejsce w kulturach płynnych (Pati i in. 2005), jak również wpływa korzystnie na podziały komórkowe (Niedz 1993). Immobilizację można prowadzić w żelach utwardzanych termicznie (po schłodzeniu, np. agar, agaroz) lub na zasadzie wymiany jonowej (alginiany). Żele utwardzane termicznie są szeroko używane w kulturach tkankowych roślin, niemniej jednak ich wykorzystanie do immobilizacji jest obarczone ryzykiem. Ze względu na wysoką temperaturę żelowania agaru (35 - 39°C) komórki podczas immobilizacji miesza się z agarem o temperaturze około 40°C. Dodatkowo wykazano, że niewłaściwie oczyszczony agar może być toksyczny, co ma szczególne znaczenie w przypadku niechronionych ścianą komórkową protoplastów (Shillito i in. 1983). Wykorzystanie agarozy pozwala na obniżenie temperatury podczas immobilizacji do 32°C, co jednak ciągle pociąga za sobą duże ryzyko szoku termicznego dla komórek poddanych tym procedurom (Hunter 1994).

Alginiany to polisacharydowe kopolimery zbudowane z reszt kwasu β -D-mannuronowego (bloki M) i α -L-guluronowego (bloki G), których proces sieciowania jest indukowany dwuwartościowymi kationami (np. Ca^{2+}). Niezależny od temperatury proces

polimeryzacji alginianu oraz jego nietoksyczność sprawia, że jest popularnym medium wykorzystywanym np. do kapsułkowania podczas krioprezerwacji, przy tworzeniu sztucznych nasion, czy do unieruchamiania komórek w bioreaktorach (Patel i in. 2000). Dodatkowym atutem jest to, że żel alginianowy łatwo rozpuszcza się pod wpływem środków chelatujących (np. cytrynian), co ułatwia procedurę uwolnienia regenerującej tkanki (Fehér i Dudits 1994). Proces immobilizacji w alginianie zazwyczaj przeprowadza się poprzez zmieszanie zawiesiny protoplastów z rozpuszczonym w wodzie polimerem, a następnie, w obecności środków sieciujących - kationów dochodzi do jego polimeryzacji, a przez to unieruchomienia komórek (Thu i in. 1996). W trakcie procesu można formować krople lub różnej grubości warstwy, które następnie umieszcza się w medium hodowlanym a otwarta struktura porów żeli alginianowych zapewnia swobodną dyfuzję cząsteczek z pożywki (Fehér i Dudits 1994).

W prezentowanych badaniach zastosowano procedurę immobilizacji opisaną przez Damm i Wilmitzer (1988), gdzie roztwór alginianu poddano sterylizacji w autoklawie, z modyfikacją Grzebelus i in. (2012) dotyczącą sposobu formowania błonek alginianowych. Zawiesinę protoplastów o określonej gęstości mieszano z roztworem alginianu sodu. Następnie otrzymany mix nakrapiano na pożywkę wapniowo-agarową. Aby otrzymać cienkie błonki zawiesinę rozprawdzano kolistymi ruchami na powierzchni pożywki, a następnie pozostawiano przez godzinę w temperaturze pokojowej w celu polimeryzacji. Uformowane błonki z unieruchomionymi protoplastami umieszczano w szalkach z pożywką. Zastosowano dwie pożywki do kultury bazujące na przepisie Kao i Michayluk (1975): pożywkę standardową do kultur protoplastów 8p (Glimelius 1984) wzbogaconą o 2,4-D, NAA oraz BAP oraz niestosowaną dotychczas dla kapusty pożywkę CPP (Dirks i in. 1996) zawierającą 2,4-D i zeatynę. Kulturę prowadzono w ciemności. Następnie wykonano ocenę żywotności komórek. Do oceny żywotności wykorzystuje się barwniki pozwalające na odróżnienie komórek martwych lub z uszkodzoną błoną komórkową od nieuszkodzonych i żywotnych (Eeckhaut i in. 2013). W prezentowanych doświadczeniach żywotność komórek oceniano przy pomocy przyżyciowego fluorochromu - diocjanu fluoresceiny (FDA). Żywe, metabolizujące protoplasty zawierają enzymy - esterazy zlokalizowane w błonie komórkowej, które odcinają grupy octanowe z cząsteczek FDA, uwalniając fluoresceinę. Po wzbudzeniu fluorochromu światłem UV, żywe protoplasty cechowała zielona fluorescencja. Żywotność monitorowano w trzech przedziałach czasu t.j w dniu założenia kultury, oraz po 24 i 48 godzinach kultury. Ogółem żywotność komórek w dniu izolacji była wysoka i wynosiła od 85 do 90% w zależności od obiektu, natomiast w kolejnych dobach uległa obniżeniu. Spadek żywotności protoplastów w pierwszych dniach kultury jest zjawiskiem powszechnym, spowodowanym głównie stresem związanym z procesem izolacji oraz zakładaniem kultury (Davey i in. 2005).

W prawidłowo prowadzonej kulturze, zazwyczaj po kilku dniach dochodzi do indukcji podziałów, tworzą się agregaty kilku-, następnie kilkunastokomórkowe. Wskaźnik wydajności kultury określa procentowy udział komórek dzielących się do ich ogólnej liczby. W niniejszych doświadczeniach po zastosowaniu immobilizacji komórek w alginianie pierwszy podział obserwowano w 3 i 4 dobie kultury. Były to wyniki zgodne z obserwacjami innych badaczy prowadzących kultury systemie pożywek płynnych (Robertson i Earle 1986, Kaur i in. 2006),

co sugeruje, że immobilizacja w alginianie nie zaburzała procesu włączenia się protoplastów kapusty w cykl podziałów mitotycznych. Badania wykazały, że zastosowanie pożywki CPP zawierającej niższe stężenie 2,4-D (0,1 mg/l) w porównaniu ze standardową pożywką 8p (1,0 mg/l), wpłynęło korzystnie na aktywność mitotyczną komórek. Prezentowane w literaturze doniesienia dotyczące aktywności mitotycznej protoplastów kapusty głowiastej wskazują że waha się ona w systemie kultur płynnych od 0 do około 30% w zależności od obiektu (Glimelius 1984, Zhao i in. 1995, Chen i in. 2004). Zastosowany w prezentowanych badaniach system kultur immobilizowanych w alginianie pozwolił na indukcję podziałów u wszystkich badanych obiektów, co jest wynikiem wartym podkreślenia, biorąc pod uwagę zróżnicowanie genetyczne użytych materiałów. Ogółem wyższym współczynnikiem podziałów (7-30%) charakteryzowały się odmiany mieszańcowe, a kolejno odmiany populacyjne (8-14%), oraz linie DH (1-6%).

Regeneracja w warunkach *in vitro* może przebiegać za pośrednictwem dwóch ścieżek rozwojowych: embriogenezy somatycznej lub organogenezy (Orczyk 2009). Somatyczna embriogeneza nie była notowana w kulturach protoplastów kapusty głowiastej, natomiast, obserwowano ją w kulturach protoplastów *B. nigra*, *B. juncea* czy *B. napus* (Klimaszewska i Keller 1986, Kirti i in. 1988, Pua 1990). W przypadku organogenezy powstaje struktura jednobiegunowa, z której rozwija się pęd lub korzenie. Zarówno organogeneza jak i somatyczna embriogeneza mogą zachodzić bezpośrednio na eksplantacie lub też przebiegać pośrednio przez fazę kalusa. W kulturach protoplastów rozwój roślin zachodzi najczęściej pośrednio poprzez rozwój kalusa (Fehér i Dudits 1994, Orczyk 2009). W prezentowanych doświadczeniach niezaburzone podziały komórkowe skutkowały powstaniem mikrokalusa, który po uwolnieniu z błonki alginianowej został przeniesiony na stałe pożywki regeneracyjne. Regenerację uzyskano u sześciu z dziesięciu badanych obiektów. Nie uzyskano roślin z kultur protoplastów linii DH oraz jednej odmiany populacyjnej. Stan taki był konsekwencją niskiej aktywności mitotycznej komórek tych obiektów, która nie przekraczała 8%.

Badania przedstawione w **publikacji 2** są kontynuacją tematyki opisanej powyższej i zostały podjęte, jako efekt analizy danych literaturowych odnośnie zmian właściwości fizykochemicznych alginianów pod wpływem wysokiej temperatury. Badania wykazały, że działanie na roztwór wodny alginianu sodu temperaturą powyżej 100°C i ciśnieniem rzędu 0,7-0,8 Pa powodowało jego zwiększoną depolimeryzację oraz wpływało na jego lepkość. Z kolei zmiany w lepkości żelu wpływały na rozwój immobilizowanej w nim biomasy *Penicillium chrysogenum* (Leo i in. 1990). Późniejsze badania wykazały, że zmiany w lepkości żelu pod wpływem wysokiej temperatury w połączeniu z ciśnieniem, spowodowane są przez naruszenie równowagi pomiędzy resztami kwasu β -D-mannuronowego (bloki M) i α -L-guluronowego (bloki G) wchodzących w skład tego kopolimeru. Wysoka zawartość bloków G w alginianie wpływa na jego stabilność mechaniczną, natomiast wysoka temperatura podczas autoklawowania powoduje 50-60% spadek zawartości bloków G w strukturze tego kopolimeru. Jako alternatywę do autoklawowania autorzy wskazywali mechaniczną filtrację alginianu, gdyż ta nie zaburzała jego równowagi strukturalnej (Wong i in. 2001). W

publikacjach dotyczących wykorzystania alginianów do immobilizacji protoplastów w wielu przypadkach metoda jego sterylizacji nie była podana (Linsefors i Brodelius 1985, Damm i Willmitzer 1988, Dirks i in. 1996). W pozostałych badaniach najczęstszym sposobem sterylizacji było autoklawowanie (Niedz 1993, Hall i in. 1993) i tylko w nielicznych przypadkach alginian był poddany filtrowaniu (Draget i in. 1988; Dovzhenko i in. 2003). Wyniki te bazują na różnych gatunkach, metodach izolacji i sposobach prowadzenia kultury, w związku z czym ich porównanie jest trudne. Badania prezentowane w publikacji 2 dotyczyły porównania wpływu sposobu sterylizacji alginianu sodu (autoklawowanie lub filtrowanie) na rozwój protoplastów kapusty. Do badań użyto trzech obiektów kapusty głowiastej. Protoplasty izolowano zarówno z liści jak hipokotyli. Izolację protoplastów prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w publikacji 1. Alginian poddany autoklawowaniu był mętny, natomiast filtracja spowodowała otrzymanie klarownego transparentnego roztworu. Obydwie formy alginianu polimeryzowały na pożywkach wapniowo-agarowych umożliwiając założenie kultury i prowadzenie obserwacji. Filtracja alginianu wpłynęła pozytywnie na żywotność protoplastów a także na aktywność mitotyczną komórek otrzymanych z protoplastów. Obserwowano istotny wzrost liczby dzielących się komórek immobilizowanych w alginianie filtrowanym (13-36%) w porównaniu do alginianu autoklawowanego (2-26%) u wszystkich badanych obiektów. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami Maćkowskiej i in. (2014), którzy po zastosowaniu alginianu filtrowanego obserwowali ponad 10% więcej agregatów komórkowych w porównaniu do kultur immobilizowanych w alginianie autoklawowanym. Jednak ci autorzy zwracali również uwagę na duży wpływ genotypu (różne obiekty rodzaju *Daucus*) na uzyskane wyniki. W prezentowanej pracy wszystkie badane genotypy kapusty zareagowały podobnie, co wskazuje jednoznacznie na korzystne działanie alginianu filtrowanego na kultury protoplastów kapusty. Opisaną modyfikację metodyki okazała się również korzystna z innych względów, a mianowicie była bardzo łatwa w wykonaniu i nie wydłużała procedury, formowane błonki filtrowanego alginianu były transparentne, co ułatwiało znacznie obserwacje mikroskopowe kultury oraz umożliwiało jednoznaczną i szybką identyfikację zakażeń.

Kultury izolowanych protoplastów prowadzi się na specjalnie przygotowanych pożywkach, których zadaniem jest dostarczenie niezbędnych do życia substancji oraz zapewnienie odpowiednich warunków fizyko-chemicznych dla wzrostu i rozwoju komórek. Optymalny skład pożywki jest specyficzny dla każdego gatunku roślin, niemniej jednak w celu indukcji proliferacji komórek zawsze pożywki te są suplementowane regulatorami wzrostu, spośród których szczególne znaczenie odgrywają auksyny i cytokininy. Istnieje również szereg doniesień o suplementowaniu pożywek do kultur protoplastów innymi związkami np. glutationem, kwasem askorbinowym czy polivinylopyrrolidone m łagodzącymi stres oksydacyjny wywołany procedurą izolacji (Kennedy i in. 2004, Parkash i in. 1997), hemoglobina lub perfluorodekalina poprawiającymi natlenienie kultury (Anthony i in. 1994, Power et al. 2003), brassinosteriodami (Nakajima i in. 1996) czy egzogennymi poliaminami (Majewska-Sawka i in. 1997) stymulującymi podziały komórkowe. Badania prowadzone nad

zawiesinami komórek mezofilu *Asparagus officinalis* (Matsubayashi i Sakagami 1996) wykazały, że czynnikiem mitogennym mogą być również białkowe cząsteczki sygnałowe – fitosulfokiny (PSK). Zidentyfikowano dwa typy tych oligopeptydów: fitosulfokinę- α (PSK- α i fitosulfokinę- β (PSK- β), przy czym PSK- α charakteryzuje się wyższą aktywnością biologiczną. Egzogenny PSK- α dodawany do pożywki w niskich stężeniach (10^{-7} M) wpływał na odróżnicowanie komórek mezofilu w wiązki naczyniowe w kulturze zawieszinowej (Matsubayashi i in. 1999), stymulował somatyczną embriogenezę (Igasaki i in. 2003) oraz embriogenezę mikrospor (Asif i in. 2014). Odnotowano również pozytywny wpływ tego oligopeptydu na kultury protoplastów u ryżu (Matsubayashi et al. 1997), buraka (Grzebelus i in. 2012) czy marchwi (Maćkowska i in. 2014).

W związku z faktem, że w trakcie badań nad kulturami protoplastów obiekty kapusty głowiastej będące nośnikami pożądaných cech (odporności, CMS), pomimo zastosowanych modyfikacji (publikacja 1 i 2), charakteryzowały się stosunkowo niskim odsetkiem podziałów, zaplanowano wstępne doświadczenie, aby zbadać wpływ tego oligopeptydu na kultury protoplastów u tego gatunku (**publikacja 3**). Badania takie nie były dotychczas prowadzone u kapusty głowiastej, ani u żadnego innego przedstawiciela rodzaju *Brassica*. W celu sprawdzenia uniwersalności działania PSK- α do badań wytypowano siedem obiektów, z czego dwa (Badger Shipper i Oregon 123), jak wykazały wcześniejsze niepublikowane badania, to genotypy odporne na kultury protoplastów. Protoplasty izolowano zarówno z hipokotyli jak i liści. Izolację i kulturę prowadzono według ustalonej wcześniej metodyki (publikacje 1 i 2), pożywkę do kultury wzbogacono w $0,1 \mu\text{M}$ PSK- α . Oligopeptyd był obecny w pożywce przez cały okres kultury płynnej (ok. 4 tygodnie). Uzyskane wyniki sugerowały korzystny wpływ PSK- α na żywotność protoplastów. Stan taki można tłumaczyć tym, że PSK- α bierze udział w procesie osmoregulacji w komórce (Stührwohltd i in. 2011), która jest kluczowa w przypadku niechronionych ścianą komórkową protoplastów. Wyniki wskazały na różnice w aktywności mitotycznej komórek uzyskanych z protoplastów w zależności od obiektu oraz obecności PSK w pożywce. U większości badanych genotypów obserwowano wzrost aktywności mitotycznej na pożywce wzbogaconej w PSK- α , w porównaniu do kontroli. Efekt ten był szczególnie silny u genotypów o przeciętnej aktywności mitotycznej. Jednak w przypadku obiektów opornych, pomimo zastosowania PSK- α w pożywce, nie obserwowano znaczącego wzrostu aktywności mitotycznej, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje o dominującej roli genotypu w procesie protoplastyzacji u kapusty (Hansen i in. 1999, Holme i in. 2004). W pracy obserwowano pośredni efekt zastosowania PSK- α na proces regeneracji roślin. W kontroli bez PSK- α , mimo zaindukowania mitoz na etapie kultury płynnej odsetek rozwijających się z kalusa pędów był niski (poniżej 5%). Natomiast w przypadku kultur suplementowanych PSK- α , podziały zaindukowane na etapie kultury płynnej prowadziły do otrzymania kalusa, który po przeniesieniu na stałe pożywki regeneracyjne, nie utracił embriogenego potencjału, co skutkowało wyższą efektywnością regeneracji (10-21%). W świetle tych obiecujących wyników, zaplanowano i wykonano kolejną serię eksperymentów zmierzających do uzyskania odpowiedzi na następujące pytania: (I) czy krótkotrwała (10 dniowa) suplementacja pożywki w PSK- α będzie wystarczająca do

utrzymania zaindukowanego potencjału do podziałów; (II) czy efektywność PSK- α w kulturach protoplastów kapusty zależy od dawki; (III) czy PSK- α odgrywa rolę w procesie odbudowy ściany komórkowej przez protoplasty; (IV) czy PSK- α ma bezpośredni wpływ na organogenezę z kalusa otrzymanego z kultur protoplastów. Przytoczone aspekty nie były obiektem wcześniejszych badań, są nowatorskie i zostały zaprezentowane w **publikacji 4**. W doświadczeniach użyto sześciu obiektów kapusty głowiastej, intencjonalnie wykorzystując niektóre badane wcześniej objekty (Sława z Gołębiewa, Oregon 123, LM, LM98) w celu sprawdzenia ich odpowiedzi w nowych warunkach eksperymentu. Protoplasty izolowano z liści według wcześniej opracowanej metodyki. Po izolacji protoplasty unieruchomiono w alginianowych błonkach umieszczono w szalkach z pożywką do kultury wzbogaconą w trzy różne stężenia PSK- α , kontrolą była pożywka bez dodatku tego oligopeptydu. Po 10 dniach kultury wymieniono pożywkę na świeżą, bez dodatku PSK- α . W toku badań potwierdzono wcześniejsze obserwacje (publikacja 3), że dodatek PSK- α do pożywki pozytywnie wpływa na żywotność komórek oraz aktywność mitotyczną komórek w kulturze protoplastów. Do zajścia podziałów mitotycznych w kulturach protoplastów niezbędna jest regeneracja ściany komórkowej (Navrátilová 2004). U niektórych gatunków pojawienie się składników nowej ściany obserwowano już kilka godzin po umieszczeniu wyizolowanych protoplastów w pożywce hodowlanej. Indukcja pierwszych podziałów mitotycznych, a także podtrzymanie aktywności jest kluczowe w kontekście procesu regeneracji roślin z kultur. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano zaangażowanie PSK- α w proces regeneracji celulozowej ściany komórkowej. Analizę regeneracji ściany komórkowej w kulturze protoplastów kapusty prowadzono z wykorzystaniem fluorochromu Calcofluor White. Regeneracja ściany była procesem zachodzącym niesynchronicznie i w danym przedziale czasowym obserwowano komórki w początkowych stadiach regeneracji i jednocześnie z niemal całkowicie zregenerowaną ścianą komórkową. Porównanie dynamiki regeneracji ściany komórkowej wykonane dla obiektów o skrajnej reakcji na warunki kultury (reagujący i oporny) wykazało, że dodatek PSK- α stymuluje proces regeneracji poprzez szybsze jego rozpoczęcie, co skutkowało większą liczbą komórek z całkowicie odbudowaną ścianą w porównaniu do kultur kontrolnych.

Aktywność mitotyczna komórek w kulturach protoplastów badanych obiektów kapusty zależała od genotypu i stężenia PSK- α w pożywce. U obiektu o wysokim potencjale mitotycznym efekt PSK- α nie był znaczący, natomiast u obiektów słabiej reagujących najczęściej pozytywny wpływ obserwowano po zastosowaniu 0,1 μ M PSK- α . Ponadto badania wykazały, że 10 dniowa suplementacja pożywki do kultury protoplastów jest wystarczająca do indukcji mitoz. Obecność PSK- α w kulturze jest konieczna do zajścia pierwszych podziałów i wpływa korzystnie na formowanie się małych agregatów komórkowych (20-40 komórek), natomiast w późniejszej kulturze nie jest konieczna.

Jak wspomniano na wstępie, regeneracja roślin z kultur protoplastów jest szczególnie trudnym etapem w przypadku kapusty głowiastej. Badania wykazały wielokrotnie, że podziały komórek otrzymanych z protoplastów prowadzą do powstania agregatów komórkowych, które rozwijając się dalej tworzą mikrokalus, co trwa zazwyczaj około 3-4

tygodni. Po następnych 4-9 tygodniach dochodzi do organogenezy i rozwoju pędów. Regeneracja w kompletne rośliny trwa minimum około 4-6 tygodni, a jak wykazały badania, jej wydajność często bywa zbyt niska dla praktycznego wykorzystania (Glimelius 1984, Zhao i in. 1995, Chen i in. 2004). W celu zwiększenia wydajności regeneracji roślin z kultur protoplastów kapusty głowiastej, w niniejszych badaniach zastosowano suplementację PSK- α bezpośrednio do pożywki regeneracyjnej. Ogółem organogenezę odnotowano u pięciu z sześciu badanych obiektów. Wyniki wykazały około 3- do 5-krotny wzrost efektywności regeneracji na pożywkach zawierających PSK- α , w porównaniu z pożywkami kontrolnymi. Ponadto najbardziej wydajną regenerację obserwowano w kombinacji, gdzie protoplasty hodowano na pożywce z tym oligopeptydem, a następnie uzyskane mikrokalusy przenoszono na pożywkę regeneracyjną również suplementowaną PSK- α .

Podsumowanie

Przeprowadzone badania przedstawiają nowe wyniki dotyczące optymalizacji wydajności kultur protoplastów poprzez zmianę sposobu prowadzenia kultury oraz poprzez suplementację pożywek do kultur w stosunkowo niedawno odkryty związek o charakterze cząsteczki sygnałowej jakim jest PSK- α . Zastosowanie alginianu w postaci cienkich błonek, jako medium do immobilizacji protoplastów nie było dotychczas stosowane u kapusty głowiastej, a uzyskane wyniki wskazały jednoznacznie na korzyści płynące z wykorzystania takiego systemu, związane ze stymulacją podziałów komórkowych a także uproszczeniem prowadzenia kultury i ułatwieniem obserwacji w kulturze. W literaturze światowej niewiele jest publikacji poświęconych działaniu PSK- α na kultury pojedynczych komórek, a badania na protoplastach są znikomo reprezentowane. Przedstawione wyniki poszerzają stan wiedzy dotyczących mitogennych właściwości tego oligopeptydu, jak również jego wpływu na dyferencjację i organogenezę w kulturach *in vitro*.

Do najważniejszych osiągnięć wynikających z podjętych badań można zaliczyć:

- opracowanie prostej i wydajnej metodyki prowadzenia kultur protoplastów liściowych i hipokotylowych kapusty głowiastej
- wykazanie przydatności metody immobilizacji protoplastów w alginianie do stymulacji rozwoju protoplastów kapusty
- określenie wpływu egzogenego PSK- α na kultury protoplastów poprzez wykazanie, że:
 - krótkotrwała (10 dniowa) suplementacja oligopeptydu do pożywki do kultury jest wystarczająca do indukcji podziałów komórkowych
 - mitogenny efekt oligopeptydu jest związany z korzystnym wpływem na odbudowę ściany komórkowej protoplastów oraz zależy od genotypu i dawki
 - oligopeptyd stymuluje nie tylko proliferację komórek, ale również odróżnicowanie i organogenezę

Uzyskane w efekcie przedstawionych badań wyniki stały się bazą do dalszych prac nad praktycznym wykorzystaniem opracowanej metody poprzez generowanie mieszańców somatycznych na drodze elektrofuzji w celu transferu cech istotnych z punktu widzenia hodowli (np. odporności oraz CMS). Te prace są realizowane we współpracy z firmami

hodowlanymi Polan i PlantiCo w ramach projektu finansowanego przez MRiRW (zał. 5, poz. II-I 13). Obecnie trwają również prace nad wykorzystaniem tej techniki do przeprowadzenia fuzji protoplastów pozyskanych z obiektów kapusty o zróżnicowanej ploidalności np. haploidów czy diploidów. Z drugiej strony prowadzone są również badania, w których opracowana metodyka jest wykorzystana do edycji genomu kapusty z użyciem jednego z najnowszych narzędzi biotechnologicznych, jakim jest system CRISPR/Cas9. Celem badań jest opracowanie systemu do otrzymania tzw. induktorów haploidyacji (ang. haploid inducers lines), które mogą być wykorzystane do produkcji haploidów i przyspieszenia hodowli odmian mieszańcowych F1 u kapusty. Te badania są prowadzone we współpracy z Uniwersytetem w Ljublanie (Słowenia).

Wykaz stosowanych skrótów: **2,4-D** - kwas 2,4-dichlorofekoksyoctowy, **BA** - benzyladenine, **FDA** - dioctan fluoresceiny (fluorescein diacetate), **linie DH** - linie podwojonych haploidów, **NAA** - kwas 1-naftylooctowy, **PSK- α** - fitosulfokina alfa (phytosulfokine alpha)

Literatura

- Anthony P, Davey MR, Power JB, Washington C, Lowe KC. 1994. Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68. *Plant Cell Rep* 13:251-2555
- Asif M, Eudes F, Randhawa H, Amundsen E, Spaner D. 2014. Phytosulfokine alpha enhances microspore embryogenesis in both triticale and wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 116:125-130
- Avivi Y, Morad V, Ben-Meir H, Zhao J, Kashkush K, Tzfira T, Citovsky V, Grafi G. 2004. Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *Dev Dyn* 230:12-22
- Chen LP, Zhang MF, Xiao QB, Wu JG, Hirata Y. 2004. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:133-138
- Chikkala V, Nugent G, Dix P, Stevenson T. 2009. Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). *Scientia Hort* 119:330-334
- Damm B, Willmitzer L. 1988. Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Mol Gen Genet* 213:15-20
- Davey MR, Anthony P, Patel D, Power JB. 2010. Plant Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. [W:] *Plant Cell Culture*. Davey MR, Anthony P (eds.), Wiley-Blackwell, Anglia, pp. 153-174
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplast technology: current status. *Acta Physiol Plantarum* 27:117-129
- Dirks R, Sidorov V, Tulmans C. 1996. A new protoplast culture in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation. *Theor Appl Genet* 93:809-815
- Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop HU. 2003. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 222:107-111
- 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
- Eeckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D, Van Bockstaele E, Van Huylenbroeck J. 2013. Progress in plant protoplast research. *Planta* 238:991-1003
- FAOSTAT. 2017. Protokół dostępu: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Fehér A, Dudits D. 1994. Plant Protoplasts for Cell Fusion and Direct DNA Uptake: Culture and Regeneration Systems. [W:] *Plant Cell and Tissue Culture*. Vasil IK, Thorpe TA (eds.) Springer, Holandia, pp. 70-118
- Glimelius K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol Plant* 61:38-44
- Grzebelus E, Szklarczyk M, Barański R. 2012. An improved protocol for plant regeneration from leaf- and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:101-109

- Hall RD, Pedersen C, Krens FA. 1993. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. Plant Cell Rep 12:339-342
- Hansen LN, Earle ED. 1995. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion. Theor Appl Genet 91:1293-1300
- Hansen LN, Earle ED. 1997. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapsis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Theor Appl Genet 94:1078-1085
- Hansen LN, Ortiz R, Andersen SB. 1999. Genetic analysis of protoplast regeneration ability in *Brassica oleracea*. Plant Cell Tiss Organ Cult 58:127-132
- Heath DW, Earle ED. 1997. Synthesis of low linolenic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) through protoplast fusion. Euphytica 93:339-343
- Holme IB, Torp AM, Hansen LN, Andersen SB. 2004. Quantitative trait loci affecting plant regeneration from protoplasts of *Brassica oleracea*. Theor Appl Genet 108:1513-1520
- Hunter CF. 1994. Protoplast and haploid cultures. [W:] Hunter CF (ed.), In Vitro Cultivation of Plant Cells, Butterworth-Heinemann, Oxford, Anglia, pp. 87-112
- 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
- Jourdan PS, Earle ED. 1989. Genotypic variability in the frequency of plant regeneration from leaf protoplasts of four *Brassica* spp. and of *Raphanus sativus*. J Amer Soc Hort Sci 114:343-349
- 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
- Kaur ND, Vyvadilová M, Klíma M, Bechyně M. 2006. A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. Czech J Gen Plant Breed 42:103-110
- Kennedy BF, De Filippis LF. 2004. Tissue degradation and enzymatic activity observed during protoplast isolation in two ornamental *Grevillea* species In Vitro Cell Dev Biol-Plant 40: 119
- Kirti PB. 1988. Somatic embryogenesis in hypocotyl protoplast culture of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Breeding 100:222-224
- Kirti PB, Bhat SR, Kumar VD, Parkash S, Chopra VL. 2001. A simple protocol for regenerating mesophyll protoplasts of vegetable *Brassicas*. J Plant Biochem Biotechnol 10:49-51
- Klimaszewska K, Keller WA. 1987. Plant regeneration from stem cortex protoplasts of *Brassica napus*. Plant Cell Tiss Organ Cult 8:225-233
- Klimaszewska K, Keller WA. 1986. Somatic Embryogenesis in Cell Suspension and Protoplast Cultures of *Brassica nigra* (L.) Koch. J Plant Physiol 122:251-260
- Leo WJ, McLoughlin AJ, Malne DM. 1990. Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. Biotechnol Prog 6:51-53
- Linsefors I, Brodelius P. 1985. Immobilization of plant protoplasts: viability studies. Plant Cell Rep 4: 23-27
- 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 Tiss Organ Cult 117: 241-252
- 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 2:10-17
- 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, Omura N, Morita A, Sagakami Y. 1999. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. Plant Physiol 120:1043-1048
- 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
- Nakajima N, Shida A, Toyama S. 1996. Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. Japanese J Crop Sci 65:114-118
- Navrátilová B. 2004. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – a review. Horticult Scie 31: 140-157

- Niedz RP. 1993. Culturing embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 34:19-25
- Orczyk W. 2009. Otrzymywanie i znaczenie mieszańców somatycznych. [W:] Malepszy S (ed.) *Biotechnologia roślin*, PWN, Warszawa, pp. 101-121
- Orłowski M. (red.) 2000. *Polowa uprawa warzyw*. Wyd. BRASIKA, Szczecin.
- Patel AV, Pusch I, Mix-Wagner G, Vorlop KD. 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Rep* 19: 868-874
- Pati PK, Sharma M, Ahuja PS. 2005. Extra thin alginate film: an efficient technique for protoplast culture. *Protoplasma* 226:217–221
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rouselle P, Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191:244-250
- Power JB, Davey MR, Sadia B, Anthony P, Lowe KC. 2003. Haemoglobin-Enhanced mitosis in cultured plant protoplasts. [W:] Thorniley M, Harrison DK, James PE (eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 540. Springer, Boston, MA
- Prakash AH, Sankara Rao K, Udaya KM. 1997. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *J Biosci* 22:339-344
- Pua EC. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica juncea* L. Czern & Coss. *Plant Sci Limerick* 68:231-238
- Radchuk VV, Ryschka U, Schumann G, Klocke E. 2002. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. *Physiol Plant* 114:429-438
- Ren JP, Dickson MH, Earle ED. 2000. Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 100:810-819
- Robertson D, Earle ED. 1986. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* CV 'Green Comet broccoli'. *Plant Cell Rep* 5:61-64
- Shillito RD, Paszkowski J, Potrykus I. 1983. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep* 2:244-247
- Sigareva MA, Earle ED. 1997. Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 94:213-220
- Sigareva MA, Earle ED. 1999. Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa pastoris* and somatic hybridization with rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep* 18:412-417
- Stührwohldt N, Dahlke RI, Steffens B, Johnson A, Sauter M. 2011. Phytosulfokine-a controls hypocotyl length and cell expansion in *Arabidopsis thaliana* through Phytosulfokine receptor. *PLoS ONE* 6(6):e21054
- Thu B, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. 1996. Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. *Progress in Biotechnol* 11:19-30
- Walters TW, Mutschler MA, Earle ED. 1992. Protoplast fusion-derived *Ogura* male sterile cauliflower with cold tolerance. *Plant Cell Rep* 10:624-628
- Wong M, Siegrist M, Wang X, Hunziker E. 2001. Development of mechanically stable alginate/hondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. *J Orthopaedic Res* 19:493-499
- Yamagishi H, Landgren M, Forsberg J, Glimelius K. 2002. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor Appl Genet* 104:959-964
- Yarrow SA, Burnett LA, Wilderman RP, Kemble RJ. 1990. The transfer of 'Polima' cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion. *Plant Cell Rep* 9:185-188
- Zhao J, Morozova N, Williams L, Libs L, Avivi Y, Grafi G. 2001. Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells: distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *J Biol Chem* 276:22772-22778
- Zhao K-N, Bittisnich DJ, Halloran GM, Whitecross MI. 1995. Studies of cotyledon protoplast cultures from *B. napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. II: Callus formation and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 40:73-84

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Poza zagadnieniem dotyczącym kultur protoplastów kapusty głowiastej, stanowiącym treść przedstawionego do ewaluacji osiągnięcia, moje zainteresowania naukowe skupiały się na 4 obszarach t.j.:

- (I) haploidyżacja roślin warzywnych
- (II) indukcja i charakterystyka mieszańców międzygatunkowych w rodzaju *Allium*
- (III) kwitnienie *in vitro*
- (IV) wykorzystanie kultur *in vitro* w badaniach nad stresem abiotycznym

Moje zainteresowanie kulturami tkankowymi roślin rozwinęło się podczas studiów magisterskich. Ogromne wrażenie wywarły na mnie informacje usłyszane na jednym z wykładów na temat możliwości otrzymywania kompletnych roślin z niedojrzałego pyłku (gametyczna embriogeneza). Indukowanie w kulturach *in vitro* gametycznej embriogenezy prowadzi do otrzymania roślin haploidalnych a podwojenie liczby chromosomów takich roślin prowadzi do otrzymania podwojonych haploidów (ang. DH), będących całkowitymi homozygotami (ang. true homozygous plants). Haploidyżacja roślin ma znaczenie w kontekście przyspieszenia prac hodowlanych, gdyż zastępuje długotrwały chów wsobny. Rośliny DH są wykorzystywane, jako formy rodzicielskie do otrzymywania mieszańców heterozyjnych (mieszańce F1). Pierwsze eksperymenty naukowe, w których brałam udział prowadzone były pod kierunkiem Pani prof. Adeli Adamus i dotyczyły indukcji gametycznej embriogenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor u kapusty głowiastej (zał. 5, poz. II-I 8). Badaniami objęto blisko 50 obiektów kapusty. Analizowano wpływ genotypu oraz porównywano efektywność obu technik. Wyniki wykazały, że kultury izolowanych mikrospor były ponad trzykrotnie bardziej wydajne pod względem liczby otrzymanych zarodków. Częściowo, wyniki tych doświadczeń zostały przedstawione w mojej pracy magisterskiej oraz w publikacji, której jestem współautorem (zał. 5, poz. IID 1). Materiały uzyskane w toku kolejnych lat badań nad haploidyżacją kapusty zostały przekazane do wdrożenia w praktyce hodowlanej (zał. 5, poz. IIE 1). Po ukończeniu studiów rozpoczęłam prace dotyczące haploidyżacji u marchwi (zał. 5. poz. II-I 12 i 15). Marchew jest gatunkiem modelowym w kulturach *in vitro* w kontekście somatycznej embriogenezy, jednak indukcja gametycznej embriogenezy okazała się wyzwaniem. Badania z wykorzystaniem kultur pylników nie dały pozytywnego wyniku, gdyż regeneranty, uzyskane głównie z kalusa porastającego izolowane pylniki, okazały się być klonami roślin matecznych. Alternatywą pozostała indukcja haploidów z wykorzystaniem gametofitu żeńskiego. Kultura izolowanych załąźni (gynogeneza) nie była efektywna (wyniki niepublikowane), rozpoczęto, więc badania nad indukcją partenogenezy, po zapyleniu obcym pyłkiem. Analizowano możliwości wykorzystania różnych gatunków z rodziny *Apiaceae* (seler, pietruszka, pasternak) jak i innych (kapusta), jako potencjalnych induktorów partenogenezy. Po określonym czasie od zapylenia załążki izolowano z załąźni i wykładano na pożywki. Badania koncentrowały się nad poznaniem czynników wpływających na proces rozwoju gametofitycznego *in vitro* u

marchwi. Analizowano wpływ zabiegów w trakcie kwitnienia (np. oprysk auksyną) na skuteczność indukcji rozwoju. W doświadczeniach laboratoryjnych oceniano m. in. wpływ genotypu, składu pożywki czy warunków kultury (temperatura, światło) na efektywność rozwoju izolowanych zalążków. W kulturze obserwowano głównie embriogenezę z powiększonych zalążków i rozwój kalusa. Analiza cytometryczna regenerantów wykazała obecność roślin haploidalnych, ale również duży udział diploidów. W związku z tym w badaniach wykorzystano analizy molekularne w celu weryfikacji pochodzenia regenerantów. Aby uzyskać większą pewność w określaniu genetycznego statusu regenerantów, analizą markerową objęto również rośliny donorowe, z których izolowano zalążki. Wyniki kilkuletnich doświadczeń opisano w pracy doktorskiej oraz w szeregu publikacji o zasięgu międzynarodowym (zał. 5, poz. IIA 1 i 5; poz. IID 2, 5, 6, 9). W trakcie badań, opracowano protokół indukcji roślin podwojonych haploidów marchwi i przekazano polskim spółkom hodowlanym w formie instrukcji wdrożeniowej (zał. 5, poz. III M), której jestem współautorem, natomiast materiały roślinne uzyskane w wyniku badań zostały przekazane firmie hodowlanej POLAN (zał. 5, poz. IIE 2).

W roku 2004 wyjechałam na 6-miesięczny staż do Institute of Horticultural Crops (obecnie Julius Kühn Institut) w Quedlinburgu. W ramach realizacji Polsko-niemieckiego bilateralnego projektu współpracy naukowej i naukowo-technicznej (zał. 5, poz. II-I 1) zapoznałam się z nowymi technikami analiz molekularnych. Analizy markerowe prowadzono na populacji podwójnego mutantu marchwi (mutacja chlorofilowa (*yel*) i mutacja pokroju rośliny (*cola*)) oraz na obiektach rodzicielskich. Rośliny mutantu *yel-cola* charakteryzowały się dodatkowo unikatowymi defektami w obrębie kwiatu. Efektem podjętych badań była publikacja (zał. 5, poz. IIA 6) dotycząca mapowania genów związanych z architekturą kwiatu u marchwi.

Innym aspektem moich badań była analiza możliwości uzyskania mieszańców międzygatunkowych u cebuli (*Allium cepa* L.) (zał. 5, poz. II-I 9 i 11). Do krzyżowań wykorzystano m. in. dziki gatunek pokrewny *A. galanthum*. Otrzymanie mieszańców drogą generatywną było niezwykle trudne, dlatego w celu umożliwienia rozwoju zarodków mieszańcowych zastosowano technikę embryo-rescue. Mieszańce analizowano cytologicznie i morfologicznie. Wyniki wskazały na mateczny typ dziedziczenia chloroplastowego DNA u mieszańców. Ponadto wykazano, że cytoplazma *A. galanthum* powoduje częściową sterylność lub całkowitą roślin F1. Materiały roślinne będące efektem tych badań, w postaci mieszańców międzygatunkowych, zostały przekazane firmie hodowlanej (zał. 5, poz. IIE 4). Analizy cytologiczne procesu mikrosporogenezy u otrzymanych mieszańców wskazały, że przyczyną obserwowanej sterylności pyłku są najprawdopodobniej nieprawidłowości następujące w okresie pomejotycznym (zał. 5, poz. IID 3 i 8).

W roku 2010 wyjechałam na długoterminowy (17 miesięcy) staż zagraniczny na Uniwersytecie Wisconsin-Madison w Stanach Zjednoczonych, gdzie pracowałam w laboratorium prof. M.J. Havey'a. Podczas pobytu byłam zaangażowana w realizację badań w ramach dwóch projektów (zał. 5, poz. II-I 2 i 3). Z jednej strony badania dotyczyły opracowania systemu do genetycznej transformacji organelli u roślin wyższych z

wykorzystaniem kultur mikrospor. Ponadto prowadziłam badania nad molekularnym podłożem cytoplazmatycznej męskiej sterylności u cebuli. Podczas pobytu wykorzystałam posiadaną wiedzę z zakresu kultur *in vitro*, ale również zapoznałam się i wykorzystałam najnowocześniejsze wówczas metody (sekwencjonowanie na platformie 454 FLX) i narzędzia bioinformatyczne. Podczas tego pobytu wykonałam szereg doświadczeń nad indukcją embriogenezy z mikrospor ogórka. Opracowałam szczegółowy protokół do oceny stadiów mikrosporogenezy i mikrogametogenezy ogórka, protokół izolacji i oceny żywotności mikrospor u roślin uprawianych w szklarni. Pomimo testowania szeregu procedur i odczynników do odkażania materiału roślinnego, znaczna część kultur ulegała zakażeniu. W związku z tym rozpoczęłam prace nad indukcją kwitnienia ogórka w warunkach *in vitro*. Bazując na nielicznych publikacjach z tego zakresu, wykonałam doświadczenia dotyczące wpływu składu pożywki, regulatorów wzrostu, temperatury oraz światła na kwitnienie ogórka. W efekcie z sukcesem udało się zaindukować kwitnienie *in vitro* u roślin otrzymanych z nasion. Z tych roślin rozpoczęłam izolację mikrospor i ponowne testowanie warunków kultury w celu indukcji embriogenezy (zał. 5, poz. IID 4). Równolegle do doświadczeń w kulturach *in vitro* zajmowałam się opracowaniem protokołu izolacji organellarnego DNA ogórka oraz cebuli w celu uzyskania materiału do sekwencjonowania. Opracowałam szczegółowy protokół izolacji oparty o gradient perkolacji. Wyizolowane organellarne DNA obu gatunków sekwencjonowano przy użyciu platformy 454 firmy Roche w Biotech Center Madison, WI. Wyniki tych prac pozwoliły na charakterystykę potranskrypcyjnego wyciszania genów mitochondrialnych u ogórka oraz na identyfikację polimorfizmów chloroplastowego DNA różniących męsko-płodne (N) i męsko-sterylne (S) cytoplazmy u cebuli (zał. 5, poz. IIA 4 i 7).

Po powrocie do kraju kontynuowałam zainteresowanie tematyką indukcji kwitnienia ogórka w warunkach *in vitro*. Podjęte badania były realizowane z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) na wsparcie działalności młodych naukowców, jak i Funduszu Wsparcia Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa UR w Krakowie (zał. 5, poz. II-I 5 i 6). Analizowano możliwości indukcji kwitnienia u roślin pochodzących zarówno z nasion jak i z mikrorozmnożenia. Efektem podjętych badań były publikacje dotyczące szczegółowej charakterystyki procesu kwitnienia *in vitro* u jednopiennych roślin ogórka z uwzględnieniem przebiegu mikrosporogenezy, a także analiza ekspresji płci *in vitro* pod wpływem egzogennych hormonów roślinnych oraz, co było zagadnieniem nowatorskim - hormonów zwierzęcych (zał. 5, poz. IIA 2, 3, 8).

Moje zainteresowanie wzbudziły również zagadnienia związane z stresem abiotycznym wywołanym zasoleniem. Roślinne mechanizmy tolerancji nadmiernego zasolenia nie są w pełni poznane, co znacznie utrudnia opracowanie efektywnych metod łagodzenia jego skutków. Literatura z zakresu wpływu różnych związków chemicznych wywołujących stres zasolenia i wodny jest bardzo obszerna dla takich gatunków jak ryż, pszenica czy jęczmień, natomiast dla roślin warzywnych opracowań takich jest stosunkowo niewiele. Badania z tego zakresu skoncentrowane są głównie na ocenie wpływu omawianych stresów na morfologię i przemiany biochemiczne, natomiast prace traktujące o zmianach

cytologicznych są nieliczne. W swoich badaniach skupiłam się na wykorzystaniu kultur *in vitro* do badań nad stresem zasolenia. Uzyskane wyniki pozwoliły określić czy i w jaki sposób rodzaj soli i jej stężenie wpływa na typ oraz częstotliwość zaburzeń cytologicznych w stożkach wzrostu korzenia (zał. 5, poz. IIA 9 i 10 oraz II-I 4). Podjęłam również badania nad wykorzystaniem kultur *in vitro* do indukcji podwyższonej tolerancji na zasolenie i stres wodny u cebuli i marchwi. W przypadku cebuli, siewki poddano działaniu soli na stałych pożywkach, następnie rośliny, które przeżyły poddano działaniu zasolenia w warunkach szklarniowych. W dalszej kolejności rośliny te poddano samozapyleniu i cykl selekcji powtarzano na roślinach następnego pokolenia generatywnego (zał. 5, poz. IID 7). Badania te były realizowane z funduszy MRiRW (zał. 5, poz. II-I 11), a uzyskane w efekcie materiały roślinne zostały przekazane firmie hodowlanej (zał. 5, poz. IIE 3). W przypadku marchwi, selekcji w warunkach kultur *in vitro* poddano protoplasty. Protoplasty izolowane z liści marchwi prowadzono na pożywkach z dodatkiem szerokiego spektrum stężeń NaCl. Regeneranty otrzymane z kultur poddano następnie działaniu stresu zasolenia w warunkach szklarniowych. Badania w tym zakresie są unikatowe, gdyż selekcję *in vitro* na pojedynczych komórkach zazwyczaj prowadzi się wykorzystując kultury zawieszinowe. U marchwi takie badania prowadzono po raz pierwszy. Mechanizmy tolerancji na zasolenie u marchwi nie są poznane. Otrzymane wyniki wskazują, że tolerancja jest najprawdopodobniej związana z akumulacją antocyjanów oraz zwiększonym owłosieniem rośliny (zał. 5, poz. IIA 11).

W roku 2018 rozpoczęłam badania nad indukcją gametycznej embriogenezy u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*). Gatunki z rodzaju *Lupinus* są zaliczane do opornych w kulturach *in vitro* i na tle osiągnięć u innych gatunków próby uzyskania haploidów w tym rodzaju są ciągle na etapie badań wstępnych. W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano stres temperaturowy aplikowany zarówno na kwiatostany, jak i mikrospory w kulturze oraz testowano zróżnicowane pożywki do kultury. Pomimo tego w większości kultur obserwowano brak rozwoju mikrospor. W nielicznych przypadkach udało się zaindukować podziały mikrospor, które doprowadziły do otrzymania kalusa. Kalus ten jest obecnie na etapie regeneracji. Uzyskane wstępne wyniki są obiecujące, gdyż dotychczas opisane próby indukcji haploidów łubinu za pomocą androgenezy kończyły się otrzymaniem struktur wielojądrowych lub pra-zarodków, które nie podejmowały dalszego rozwoju. Badania te są prowadzone we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu (zał. 5, poz. II-I 14) i finansowane przez MRiRW.

Liczbowe zestawienie mojego dorobku publikacyjnego przedstawiono w tabelach 1-3 i załączniku 5. Ogółem jestem autorem lub współautorem 15 prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR) (poz. IB i IIA), 7 publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu krajowym i międzynarodowym spoza bazy JCR lub w materiałach konferencyjnych (poz. IID 1-7), 2 rozdziałów w monografiach (poz. IID 8-9) oraz 51 doniesień naukowych prezentowanych na konferencjach (22 międzynarodowych i 29 krajowych, poz. IIIB odpowiednio 1-22 i 1-29). Pozostałe osiągnięcia w zakresie pracy naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej zostały również przedstawione w załączniku 5 do niniejszego wniosku.

**TAB. 1. LICZBOWE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO WG RODZAJU PUBLIKACJI
(Z UWZGLĘDNIENIEM MONOTEMATYCZNEGO CYKLU)**

Typ publikacji	PRZED DOKTORATEM			PO DOKTORACIE			ŁĄCZNIE			
	LICZBA	IF	PKT	LICZBA	IF	PKT	LICZBA	IF ¹	PKT ²	
1. Oryginalne publikacje wykorzystane w monotematycznym cyklu:										
- w bazie <i>Journal Citation Reports</i>				4	5,078	100	4	5,078	100	
2. Oryginalne publikacje poza monotematycznym cyklem:										
- w bazie <i>Journal Citation Reports</i>				11	19,263	282	11	19,263	282	
- w innych czasopismach recenzowanych	2		3	2		6	4		9	
- rozdziały w monografiach				2		10	2		10	
3. Pozostałe publikacje naukowe:										
- artykuły opublikowane w materiałach z konferencji										
międzynarodowych	1			1		10	2		10	
krajowych	1						1			
- komunikaty naukowe opublikowane w materiałach z konferencji ³										
międzynarodowych	8			14			22			
krajowych	3			26			29			
	RAZEM	15	0	3	60	24,341	408	75	24,341	411

¹ Impact Factor (IF) wg bazy *Journal Citation Reports* (JCR) podano zgodnie z rokiem ukazania się pracy; w przypadku braku danych (2018 i 2019 r.) podano aktualny sumaryczny 5 – letni Impact Factor (IF) dla czasopisma

² Liczbę punktów za publikację podano wg roku opublikowania na podstawie wykazu czasopism naukowych MNiSW lub KBN; w przypadku braku danych (lata 2017- 2019) podano liczbę punktów wg listy MNiSW 'Ujednolicony wykaz czasopism naukowych za lata 2013-2016' z dnia 26 stycznia 2017 r.

³ Komunikaty wymienione w zał. 5 poz. IIIB, w punkcie 'komunikaty na konferencjach o zasięgu międzynarodowym' poz. 19 i w punkcie 'komunikaty na konferencjach o zasięgu krajowym' poz. 6 są indeksowane w bazie *Web of Science*

TAB 2. ZESTAWIENIE CYTOWAŃ (stan na dzień 2.04.2019)

Kategoria	Baza Web of Science		Baza SCOPUS
	CORE COLLECTION	ALL DATABASES	
Liczba prac w bazie	17	18	18
Liczba cytowań ogółem	68	72	87
Liczba cytowań bez autocytowań	57	61	69
Indeks Hirscha - h	5	5	7

**TAB 3. LICZBOWE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO WG CZASOPISM
(Z UWZGLĘDNIENIEM MONOTEMATYCZNEGO CYKLU)**

NAZWA CZASOPISMA	LISTA MNIŚW	ROK PUBLIKACJI	IF ¹	PUNKTACJA (KBN/MNIŚW) ²
Acta Biologica Cracoviensia Ser. Botanica	A	2014	0,730	20
Acta Botanica Croatica	A	2017	0,588	20
Acta Societatis Botanicorum Poloniae	A	2017	0,876	25
Biologia Plantarum	A	2013	1,740	25
Cytology and Genetics	A	2017	0,239	15
Frontiers in Plant Science, sect. Plant Genet Genomics	A	2014	3,948	40
G3-Genes Genomes Genetics	A	2015	2,910	30
Genome	A	2013	1,558	20
In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant	A	2012	1,139	20
		2014	0,981	20
Journal of Animal and Plant Sciences	A	2017	0,407	25
Journal of Plant Growth Regulation	A	2018	2,333	35
Plant Cell Tissue and Organ Culture		2010	1,243	27
	A	2012	3,633	25
		2019	2,016	35
BioTechnologia	B	2010	-	6
Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych	B	2002	-	3
Rozdział w monografii w języku angielskim	-	2012	-	5
		2018	-	5
Acta Horticulturae (ISHS)	-	2012	-	10
RAZEM		-	24,341	411

¹ Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) podano zgodnie z rokiem ukazania się pracy; w przypadku braku danych (2018 i 2019 r.) podano aktualny sumaryczny 5 – letni Impact Factor (IF) dla czasopisma

² Liczbę punktów za publikację podano wg roku opublikowania na podstawie wykazu czasopism naukowych MNIŚW lub KBN; w przypadku braku danych (lata 2017-2019) podano liczbę punktów wg listy MNIŚW 'Ujednolicony wykaz czasopism naukowych za lata 2013-2016' z dnia 26 stycznia 2017 r.

A. Kiełkowski

Kraków, 2 kwietnia 2019