

Dr inż. Dorota Weigt
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Autoreferat

w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego,
w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo



Poznań 2020

Spis treści

1.	Imię i nazwisko	3
2.	Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
4.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
4.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2.	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4.3.	Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego, które zostało opisane w ww. pracach	6
5.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	22
5.1.	Badania przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora oraz stanowiące wyniki otrzymane w ramach realizacji pracy doktorskiej	22
5.2.	Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	23
5.3.	Perspektywy dalszych badań	26
6.	Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	27
7.	Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	32

Autoreferat

Przebieg pracy zawodowej, opis dorobku oraz osiągnięć naukowo-badawczych

1. Imię i nazwisko: Dorota Weigt

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

14.09.2007 – uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk Rolniczych w dyscyplinie Agronomia nadany decyzją Rady Wydziału Rolniczego Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

Temat rozprawy doktorskiej: **Analiza morfologiczna, cytogenetyczna i molekularna mutantów kwiatostanu lucerny (*Medicago sativa* L. sl.).**

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Broda

Recenzenci: prof. dr hab. Tadeusz Zygmunt Staszewski
prof. dr hab. Andrzej Wojciechowski

14.06.1997 – uzyskanie tytułu zawodowego magistra inżyniera na kierunku Rolnictwo, o specjalności: Biotechnologia. Praca magisterska została wykonana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

Temat pracy magisterskiej: **Indukcja embriogenezy somatycznej u lucerny (*Medicago sativa Pers*).**

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Broda.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych:

1.10. 2009 – do chwili obecnej - adiunkt w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

1.10.1998 – 30.09.2009 - asystent w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu

1.10. 1997 – 30.10.1998 – asystent stażysta w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego – jednotematycznego cyklu publikacji pod wspólnym tytułem:

„Identyfikacja czynników zwiększających efektywność indukcji embriogenezy mikrospor oraz regeneracji roślin w kulturach pylnikowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”

4.2. Wykaz publikacji (P1-P6) wschodzących w skład osiągnięcia naukowego:

P1. Weigt D.***, Nawracała J., Popowska D., Nijak K. 2012. Examination of ability to androgenesis of spring wheat genotypes resistant to Fusarium. *BioTechnologia* 93(2): 116-122. doi:10.5114/bta.2012.46576.

MNiSW 2012: 5; MNiSW 2019: 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu doświadczeń i opracowaniu metodyki badań na podstawie przeprowadzonych przeze mnie analiz wstępnych oraz screeningu stosowanych przez inne ośrodki naukowe metod otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych pszenicy. Wykonałam większość analiz laboratoryjnych i nadzorowałam przebieg procesu badawczego. Moim zadaniem była także interpretacja otrzymanych wyników. Ponadto samodzielnie przygotowałam tekst maszynopisu i pełniłam funkcję autora korespondencyjnego.

P2. Weigt D.*, Kiel A., Nawracała J., Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Siatkowski I., Ługowska B. 2016. Obtaining doubled haploid lines of the *Lr19* gene using anther cultures of winter wheat genotypes. *BioTechnologia* 97(4): 285-293. doi:10.5114/bta.2016.6454.

MNiSW 2016: 13; MNiSW 2019: 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badawczej oraz metodologii. Pełniłam też nadzór nad przebiegiem prac badawczych i brałam udział w wykonaniu analiz laboratoryjnych. Moim zadaniem była także interpretacja i zestawienie otrzymanych rezultatów oraz opisanie wyników analiz statystycznych. Ponadto przygotowałam tekst maszynopisu wraz ze wszystkimi tabelami i dokumentacją fotograficzną. Byłam również autorem korespondencyjnym ww. pracy.

P3. Weigt D., Kiel A.* , Nawracała J., Pluta M., Łacka A. 2016. Solid-stemmed spring wheat cultivars give better androgenic response than hollow-stemmed cultivars in anther culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 52(6): 619-625. doi:10.1007/s11627-016-9793-2.

MNiSW 2016: 20; MNiSW 2019: 40
IF₂₀₁₆: 1,024; IF₂₀₂₀: 1,670

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaplanowaniu doświadczeń i opracowaniu koncepcji badawczej oraz modyfikacji wcześniej stosowanej metodologii. Wykonałam większość analiz laboratoryjnych koordynując jednocześnie przebieg procesu badawczego. Wykonałam dokumentację fotograficzną eksperymentu. Przeprowadziłam interpretację

otrzymanych wyników, zestawiałam je i opisałam uwzględniając wyniki analiz statystycznych. Przygotowałam manuskrypt i brałam udział w jego korekcie podczas procesu recenzowania.

P4. Weigt D., Kiel A. *, Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Tomkowiak A., Kwiatek M. 2020. Comparison of the Androgenic Response of Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants* 9(1): 49. doi:10.3390/plants9010049.

MNiSW 2019: **70**

IF2020: **2,762**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu problemu naukowego, opracowaniu strategii badawczej oraz wyborze zastosowanych metod. Brałam udział w wykonaniu analiz laboratoryjnych i jednocześnie pełniłam rolę koordynatora eksperymentu. Wykonałam dokumentację fotograficzną. Dokonałam interpretacji otrzymanych wyników oraz opracowań statystycznych. Przygotowałam tekst manuskryptu i brałam udział w korekcie ww. pracy oraz korespondencji z edytorami i recenzentami.

P5. Weigt D., Niemann J. *, Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Olejnik P., Kurasiak-Popowska D. 2019. Effect of Zearalenone and Hormone Regulators on Microspore Embryogenesis in Anther Culture of Wheat. *Plants* 8(11): 487. doi:10.3390/plants8110487.

MNiSW 2019: **70**

IF2019: **2,632**; **IF**2020: **2,762**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu nowego problemu badawczego oraz opracowaniu nowatorskiej koncepcji indukcji embriogenezy mikrospor. Opracowałam sposób przygotowania i suplementacji zearalenonu oraz zastosowałam stymulujący embriogenezę poziom stężeń tego związku w pożywkach indukujących. Ponadto koordynowałam prowadzenie analiz laboratoryjnych, nadzorowałam prawidłowy przebieg doświadczenia jednocześnie biorąc udział w jego realizacji. Wykonałam zestawienie uzyskanych wyników. Brałam udział w opracowaniu koncepcji analiz statystycznych i ich interpretacji. Napisałam samodzielnie manuskrypt i brałam udział w procesie jego edytowania oraz recenzowania.

P6. Weigt D.*, Siatkowski I., Magaj M., Tomkowiak A., Nawracała J. 2020. Impact of Ionic Liquids on Induction of Wheat Microspore Embryogenesis and plant Regeneration. *Agronomy* 10(6): 839. doi.org/10.3390/agronomy10060839.

MNiSW 2019: **100**

IF2020: **2,603**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu nowej strategii indukcji embriogenezy mikrospor i przelamywania oporności genotypowej, polegającej na zastosowaniu cieczy jonowych w kulturach pylnikowych pszenicy. Zaprojektowałam układ doświadczenia, sposób przygotowania cieczy jonowych oraz ich aplikacji do pożywek indukujących. Brałam udział we wszystkich etapach analiz laboratoryjnych, nadzorując przebieg doświadczenia. Wykonałam dokumentację fotograficzną. Opracowałam wyniki analiz biorąc także udział merytoryczny w interpretacji wyników analizy statystycznej. Samodzielnie napisałam manuskrypt i opracowałam graficzne zestawienie rycin i tabel. Ponadto wystąpiłam w roli autora korespondencyjnego ww. pracy.

Łącznie dla ww. cyklu publikacji suma punktów prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

MNiSW (w roku wydania): **278**

MNiSW (w roku 2019): **320**

IF (w roku wydania): **9,021**

IF (w roku 2020): **9,797**

Niezależnie od powyższego zestawienia, wykaz i kopie monotematycznego cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie tych publikacji zamieszczono w załącznikach nr 5 i nr 6.

* autor korespondencyjny

** publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zostały oznaczone literą **P** (publikacja) oraz cyframi arabskimi (**1, 2, 3, 4, 5, 6**) zgodnie z zamieszczonym powyżej wykazem publikacji (np. **P1** – publikacja pierwsza w wykazie).

4.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego, które zostało opisane w ww. pracach

Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest gatunkiem strategicznym, mającym podstawowe znaczenie dla bezpieczeństwa żywnościowego wielu krajów, w tym Polski. Jednocześnie jest najczęściej uprawianym zbożem na świecie i stanowi podstawowy produkt spożywczy dla 40% populacji ludzkiej. Zapewnia 21% kalorii z całkowitego pożywienia i 20% białka dla ponad 4,5 miliarda ludzi (CIMMYT <https://www.cimmyt.org/wheat-facts-and-fiction/>). Jej areał zasiewu w Polsce wynosi ponad 2 mln ha i stanowi 1/4 ogólnej powierzchni zbóż. Zaspokojenie potrzeb rosnącej populacji ludzkiej (zgodnie z prognozowanymi danymi jej liczebność będzie wynosiła ok. 9 mld do 2050 roku) oraz zmiana przyzwyczajeń żywieniowych, wymuszają wzrost światowej produkcji pszenicy o 2% rocznie (Goutam i in. 2013). Zaspokojenie ciągle rosnących potrzeb wymaga szybkiego postępu hodowlanego tego gatunku w kierunku zwiększenia potencjału plonowania i jakości ziarna, dostosowanie genotypu pszenicy do zmieniającego się klimatu, a także podniesienie odporności na patogeny (Chaudhary i in. 2015). Wysokie wymagania rolników i konsumentów stawiają wyzwanie dla hodowli twórczej tego gatunku. Tylko dzięki wdrożeniu nowoczesnych metod biotechnologicznych do hodowli pszenicy możliwe jest zaspokojenie tych potrzeb oraz przyspieszenie postępu poprzez wprowadzanie ulepszonych odmian.

Tworzenie odmian wymaga wyprowadzenia nowej zmienności przez krzyżowania, hodowlę mutacyjną (tradycyjną lub wykorzystującą najnowsze techniki inżynierii genetycznej) lub wprowadzanie nowych genów przez trans-, cis- lub intragenezę. Kolejnym krokiem jest wyrównanie otrzymanych roślin pod względem genetycznym oraz fenotypowym, a więc doprowadzenie do homozygotyczności. U roślin samopylnych można to osiągnąć metodą pojedynczych nasion (SSD - ang. single seed descent) lub w wyniku wielokrotnego samozapylenia. Ten etap każdego programu hodowlanego jest najbardziej czasochłonny i kosztowny, a pozyskane linie i tak nie są w pełni homozygotyczne. Alternatywne rozwiązanie stanowi technika hodowli tkanek i komórek roślinnych w warunkach *in vitro* pozwalająca na

otrzymanie w 100% homozygotycznych podwojonych haploidów (DH - ang. doubled haploids) w ciągu jednego sezonu wegetacyjnego. Linie DH pozyskiwane tą drogą mogą stanowić wartościowy materiał wyjściowy do hodowli obok linii wyprowadzanych w sposób tradycyjny, czyli poprzez samozapylenie (F_{6-10}). Rośliny jednej linii DH cechują się wyrównaniem, a ich fenotyp stanowi odzwierciedlenie genotypu. Dzięki ich wykorzystaniu można szybko wyselekcjonować rośliny o cechach recesywnych, np. po krzyżowaniu w celu introdukcji genów odporności (Datta, 2005). Podwojone haploidy wyprowadzone z pojedynczej rośliny powstają z mikrospor zrekombinowanych w procesie mejozy, a więc mają różny zestaw genów, co jest korzystnym zjawiskiem dla procesu tworzenia nowych odmian. Linie DH stanowią doskonały materiał do mapowania genomu, poszukiwania loci cech ilościowych (QTL - quantitative trait locus), badań nad mutagenезą i genetycznymi transformacjami (Marone i in. 2012, Datta 2005, Miha'ly i in. 2002). Są także cennym materiałem do badań nad fizjologią i epigenetyką roślin (Żur i in. 2019, Solís i in. 2015). Ponadto, dla przyspieszenia i udoskonalenia procesu tworzenia nowych odmian mogą być stosowane w połączeniu z innymi wartościowymi metodami jak np. selekcja materiałów hodowlanych z wykorzystaniem markerów molekularnych określana jako MAS (ang. marker-assisted selection) (Tyrka i in. 2018).

Linie DH powstają dzięki podwojeniu liczby chromosomów roślin haploidalnych, czyli form zawierających w komórkach somatycznych liczbę chromosomów charakterystyczną dla gamet danego gatunku, u pszenicy wynosi ona $n=21$. Podwojenie to może nastąpić w wyniku spontanicznej reakcji haploidalnych komórek na wczesnym etapie prowadzenia kultury (Seifert i in. 2016, Griggs i Zhenk 2016) lub jest stymulowane mutagenami zaburzającymi tworzenie i funkcje wrzeciona podziałowego. W tym celu najczęściej stosuje się kolchicynę będącą alkaloidem ekstrahowanym z ziemowita jesiennego.

Po raz pierwszy haploidy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) otrzymały na drodze androgenезy w kulturach pylnikowych trzy niezależne zespoły: Ouyang i in. (1973), Picard i De Buyser (1973) oraz Wang i in. (1973). Nieco później ten sam efekt uzyskano w kulturach izolowanych mikrospor (Wei 1982) oraz przez krzyżowania oddalone z dzikim jęczmieniem (*Hordeum bulbosum* L.) i z kukurydzą (*Zea mays* L.) (Barclay 1975, Laurie i Bennett 1988, Inagaki i Tahir 1990). Od tego czasu powstało wiele odmian pszenicy wyprowadzanych z linii DH. Pierwszą na świecie odmianą DH była Jinghua No-1 wyprowadzona przez chiński zespół Hu i in. (1986). Już rok później europejscy naukowcy De Buyser i in. (1987) otrzymali przy pomocy kultur pylnikowych odmianę Florin. W ostatnich dwóch dekadach rozwinięto hodowlę pszenicy w oparciu o linie DH otrzymując z nich odmiany, o których wspominają autorzy wielu prac: GK Délibáb (Pauk i in. 1995), SV Agaton (Tuvešson i in. 2003), McKenzi (Graf i in. 2003), AC Andrew (Sadasivaiah i in. 2004), Huapei 8 (Ming-hui i in. 2011), Kharoba (Elhaddoury i in. 2012), GK Déva (Pauk i in. 2020).

Obecnie, najbardziej rozpowszechnioną metodą wyprowadzania linii DH w polskich spółkach hodowlanych jest krzyżowania oddalone, na drodze eliminacji chromosomów pochodzących od zapylacza. W przypadku pszenicy w tym celu najczęściej wykonuje się krzyżowanie z kukurydzą. Eliminacja następuje już podczas pierwszych podziałów mitotycznych rozwijającego się zarodka oraz bielma (Laurie i Benett, 2011). Zaletą tej metody jest brak form albinotycznych oraz aneuploidalnych. Ponadto rzadko obserwowana jest oporność genotypowa. Wadą z kolei jest jej duża pracochłonność podczas kastrowania oraz

izolacji embrionów, a także brak spontanicznych podwojeń, a więc konieczność stosowania w tym celu mutagenów chemicznych.

Ze względu na pracochłonność wyżej opisanej metody hodowcy są zainteresowani wdrożeniem androgenezy jako podstawowej technologii pozyskiwania podwojonych haploidów. Obecnie androgeneza jest wykorzystywana w polskich spółkach hodowlanych na niewielką skalę. Głównym ograniczeniem jej wdrożenia, jest tzw. oporność genotypowa polegająca na trudności w otrzymaniu regenerantów z roślin donorowych o niekorzystnym genotypie. Poza tym część uzyskanych tą drogą roślin jest albinotyczna (Makowska i Oleszczuk 2014) i tym samym nie ma wartości hodowlanej. Pomimo to, androgeneza charakteryzuje się zdecydowanie najwyższą potencjalną produktywnością spośród wszystkich znanych technik otrzymywania podwojonych haploidów pszenicy. Powodem jest dostępność męskich gamet, z których otrzymywane są regeneranty - w pojedynczym pylniku pszenicy jest ich ponad 1000 (Touraev i in. 1996). Teoretycznie każda mikrospora może regenerować roślinę haploidalną lub spontanicznie podwojonego haploida. Metoda ta stanowi rodzaj aseksualnej embriogenezy z gamet męskich. Obejmuje zmiany w normalnym gametoficie prowadzące do przekierowania rozwoju z gametofitycznego w sporofityczny. Zmiana szlaku rozwojowego zachodzi pod wpływem różnych czynników stresu (Lantos i in. 2013).

Androgeneza może być indukowana w kulturach pylnikowych lub kulturach izolowanych mikrospor. W obu technikach podlegają jej jednojądrowe, niedojrzałe ziarna pyłku. Potencjał androgenezy oraz występowanie spontanicznych podwojeń liczby chromosomów i duże zainteresowanie polskich spółek hodowlanych techniką kultur pylnikowych, ukierunkowało moje zainteresowania naukowe na zwiększenie efektywności tej metody.

Złożoność procesów stojących u podstaw androgenezy pylnikowej powoduje, że na jej wydajność ma wpływ wiele czynników. Genotyp rośliny donorowej i jej kondycja oraz faza rozwojowa mikrospor wpływają na uzyskanie kompetencji do reagowania komórek na sygnały zewnętrzne (Rubtsova i in. 2013, Castillo i in. 2015, Broughton i in. 2020). Pod wpływem aplikowanych egzogenne czynników stresu komórki kompetentne mogą ulegać indukcji, polegającej na zmianie ich przeznaczenia. W tym momencie następuje zmiana ścieżki rozwojowej mikrospor z generatywnej w sporofityczną (Testillano 2019). Rodzaj czynnika stresu oraz czas ekspozycji są kluczowe w przebiegu tego etapu. Kolejnym etapem rozwoju jest proliferacja prowadząca do powstania kalusa o właściwościach embriogennych lub morfogennych. Typ morfogeny nie tworzy struktur embriogenicznych, ale może podlegać ryzogenezie. Efektywność androgenezy uwarunkowana jest także przez poziom endo i egzogennych hormonów roślinnych, skład pożywki indukującej oraz regeneracyjnej, a także warunki prowadzenia kultury (Lantos i in. 2013). W celu opracowania efektywnej metodyki kultur pylnikowych należy uwzględnić wieloetapowość tego procesu i liczne interakcje zachodzące pomiędzy genotypem i oddziałującym na eksplantaty środowiskiem (Konieczny i in., 2003).

Większość doniesień literaturowych na temat androgenezy pszenicy dotyczy odmian embriogennych, takich jak Pavon 76, Bobwhite, Chris, czy Svilena (Kim i in. 2003, Lantos i in. 2013, Castillo i in. 2015, Nielsen i in. 2015, Seifert i in. 2016) i nie uwzględnia materiałów roślinnych charakteryzujących się opornością genotypową. Pylniki rośliny odpornej, wyłożone na pożywkę indukującą, zamierają lub tworzą nieembriogeny kalus. Zjawisko to wynika z

niekorzystnego układu alleli dawcy, a także wg najnowszych doniesień literaturowych z modyfikacji epigenetycznych uniemożliwiających transkrypcję genów biorących udział w tym procesie (Ikeuchi i in. 2019). Są to zarówno geny odpowiedzialne za inicjację i przebieg embriogenezy, jak również procesy związane z prawidłowym funkcjonowaniem komórek poddanych kulturze np.: za modyfikacje chromatyny i ściany komórkowej, przebieg autofagocytozy, odporność komórek na stres oksydacyjny, czy prawidłowy transport auksyn (Testillano 2019). Wobec tych trudności, część autorów postuluje wręcz wprowadzanie do odmian genów zwiększających efektywność androgenezy przez krzyżowanie z odmianami wysoce embriogennymi (Bullock i in. 1982, Tuveesson i in. 2003, Dağüstü 2008,). Rozwiązanie to nie jest optymalne dla hodowców, ponieważ komponenty rodzicielskie są wybierane do krzyżowań ze względu na inne korzystne cechy i rzadko obserwuje się u nich wysoką wydajność regeneracji w kulturach pylnikowych. Ponadto nie uwzględnia ono mechanizmów epigenetycznych regulujących ekspresję genów. Przełamanie oporności genotypowej wydaje się jednak możliwe przy zastosowaniu wydajnych induktorów oraz zapewnieniu optymalnych warunków prowadzenia kultury.

Opracowanie uniwersalnej metodyki dla kultur pylnikowych pszenicy stanowi trudne wyzwanie badawcze, którego rozwiązanie pozwoliłoby na wdrożenie w spółkach hodowlanych androgenezy jako podstawowej metody otrzymywania linii DH, a także ułatwiłoby prowadzenie badań podstawowych z wykorzystaniem roślin haploidalnych. Z tego względu w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod moim kierownictwem merytorycznym, podjęto badania dotyczące zwiększenia wydajności androgenezy w kulturach pylnikowych pszenicy poprzez efektywną indukcję embriogenezy mikrospor (IEM) i wydajną regenerację roślin zielonych. Analizy były prowadzone na zróżnicowanym materiale roślinnym. W wyniku optymalizacji stosowanej metody, a następnie aplikacji egzogennych induktorów doprowadziły one do zwiększenia wydajności androgenezy i przełamania oporności genotypowej odmian, które wcześniej nie regenerowały roślin zielonych. Wyniki otrzymanych badań przedstawiłam jako zbiór sześciu, spójnych metodycznie, oryginalnych publikacji naukowych stanowiących osiągnięcie, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Hipoteza badawcza i cel badań

Główna **hipoteza badawcza** przedłożonych do oceny prac naukowych zakłada możliwość zwiększenia efektywności indukcji embriogenezy mikrospor oraz regeneracji roślin, a także przełamania oporności genotypowej w kulturach pylnikowych pszenicy w wyniku odpowiedniego doboru czynników egzogennych. Dążąc do rozstrzygnięcia postawionej hipotezy sformułowano pomniejsze **cele szczegółowe**:

1. Optymalizacja techniki kultur pylnikowych pszenicy jarej (**P1, P3**) oraz ozimej (**P2**) z uwzględnieniem genotypów opornych oraz charakteryzujących się niską zdolnością do androgenezy. Badanie wpływu genotypu, temperatury i długości szoku termicznego oraz kombinacji wybranych hormonów na wydajność tego procesu oraz na poziom ploidalności otrzymanych regenerantów.

2. Wskazanie różnic w efektywności tworzenia struktur embriogenicznych i regeneracji roślin pod wpływem składu hormonalnego pożywki indukującej u odmian pszenicy o fenotypie jarym oraz ozimym z wykorzystaniem opracowanej metody kultur pylnikowych (**P4**).
3. Identyfikacja nowych, wydajnych induktorów embriogenezy mikrospor pszenicy zwiększających efektywność regeneracji roślin i umożliwiających przełamanie oporności genotypowej:
 - 3.1. Analiza wpływu zearalenonu na efektywność androgenyzy i liczbę spontanicznych podwojeń genomu oraz opracowanie metodyki zastosowania tego związku w kulturach pylnikowych (**P5**).
 - 3.2. Badanie wpływu cieczy jonowych na kultury pylnikowe wyselekcjonowanych genotypów o zróżnicowanych zdolnościach do embriogenezy mikrospor i regeneracji roślin (**P6**).

Material roślinny

Material roślinny wykorzystany w poszczególnych publikacjach stanowiły odmiany, mieszańce pokolenia F₁ oraz rośliny pokolenia F₃ i linie hodowlane pszenicy jarej i ozimej:

P1 – genotypy będące źródłem odporności na *Fusarium*: 4 odmiany jare o zróżnicowanym pochodzeniu (Sumai 3, Ning 8331, Norin 52, Frontana,) oraz brazylijska linia hodowlana (8475-59), a także 3 dobrze plonujące odmiany polskie: Łagwa, Waluta i Zadra.

P2 – rośliny pokolenia F₃ otrzymane w wyniku krzyżowania dobrze plonujących odmian pszenicy ozimej (Hondia i KWS Ozon) z liniami z genem *Lr19* (T36 i T39) zwiększającym odporność na rdzę brunatną pszenicy.

P3 – 24 odmiany jare zróżnicowane pod względem wypełnienia rdzenia (z pełnym, średnio wypełnionym oraz pustym rdzeniem): CLTR 7027, Carola, Tybalt, Fortuna, Sawtana, AC Abbey, Tioga, Leda Collection, Glenman, Rescue, Chinook, Alentejano, Marquis, HN ROD 5 13 750, Arabella, 404, Solid Straw Tuscan Varia, Americano 44D, Ruzynska II, Ostka Smolicka, Parabola, Bombona).

P4 – 15 odmian jarych oraz 15 ozimych o zróżnicowanym pochodzeniu (odmiany o fenotypie jarym: Tybalt, Rescue, Fortuna, Leda Collection A47, Ostka Smolicka, Ruzynska II, Carola, AC Abbey, Tioga, Parabola, Chinook, Glenman, Arabella, Sawtana, Sumai 3; odmiany o fenotypie ozimym: Greer, KS96WGRC36, Wichita, Geneva, Freedom, Lr19, Augusta, Century, Antelope, Agrus, Clark, KWS Ozon, Hondia, Karl, Tam 107).

P5 – 13 mieszańców F₁ pszenicy ozimej oraz 6 mieszańców F₁ pszenicy jarej zróżnicowanych pod względem genetycznym (mieszańce o fenotypie ozimym: Thatcher x Chinese, GSTR 420 x Choptank, Wichita x KS96WGRC36, TAM 107 x Clark, Karl x Choptank, Clark x Choptank, KS96WGRC36 x NC8889, Century x Wichita, Geneva x Century, Augusta x TAM 107, Freedom x Ok 101, Antelope x Lr 1, Clark x Klasic; mieszańce o fenotypie jarym: T68 x DC356/08-4-5/09, T71 x DC356/08-4-5/09, Arabella x T71, Tybalt x T71, Mandaryna x T71, Toridon x T71).

P6 – genotypy o skrajnych właściwościach androgenicznych wyselekcjonowane na podstawie wcześniej prowadzonych i wielokrotnie powtarzanych doświadczeń: odmiany embriogenne (Ac Abbey i DC356/08-4-5/09) oraz odporne (HN ROD 513750 i CLTR 7027).

Zróźnicowanie puli genetycznej roślin donorowych umożliwiło szeroką analizę wydajności androgenyzy w kontekście zależności tego procesu od genotypu, a także pozwoliło na wyselekcjonowanie embriogennych oraz opornych odmian pszenicy. Wybrane odmiany wykorzystano w publikacji **P6** i aktualnie dalej służą one do podstawowych dotyczących wydajności IEM oraz ekspresji genów związanych z genetyczną i epigenetyczną regulacją tego procesu.

Metody badawcze

Metody badawcze zastosowane w publikacjach **P1-P6** bazują na podobnych założeniach. Wspólne elementy stosowanej metodyki to: pobieranie kłosów zawierających mikrospory w stadium jednojądrowym (faza ta była określana pod mikroskopem, za pomocą preparatów rozmazowych barwionych acetokarminem), szok termiczny w niskiej temperaturze, sterylizacja kłosów w podchlorynie sodu przez 5 min. i trzykrotne płukanie w sterylnej wodzie, wykładanie pylników na pożywkę indukującą C17 (Wang i Chen 1988), inkubacja w ciemności, pasaż kalusów ze strukturami embriogenicznymi na pożywkę regeneracyjną MS (Murashige i Skoog 1962), inkubacja w pokoju hodowlanym (faza jasna 16 godz./ faza ciemna 8 godz.). W pracach **P1-P3** określono optymalną, dla większości analizowanych genotypów, długość szoku termicznego oraz wysokość temperatury stosowanej celem traktowania wstępnego kłosów. W efekcie tych analiz w pracach **P4-P6** kłosa umieszczano w chłodni w 4°C przez 7 dni. Pożywka indukująca C17 została wybrana na podstawie wyników badań wstępnych. Na tym podłożu obserwowano zdecydowanie najwyższą efektywność IEM, a w efekcie również regeneracji roślin. W toku badań wstępnych wprowadzono modyfikacje w jej oryginalnym składzie polegające na zmianie źródła węglowodanów - w miejsce 30g/l sacharozy podłoże suplementowano maltozą w ilości 90g/l, a w celu zestalenia pożywki zamiast agaru stosowano Gelrite®. Ponadto w pracach **P1-P3** podjęto próbę ustalenia optymalnego składu hormonalnego, który następnie wykorzystano w kolejnych eksperymentach (**P4-P5**) i do dalszych badań nad uwarunkowaniami (epi)genetycznymi IEM prowadzonymi obecnie. W celu efektywnej regeneracji roślin pożywkę regeneracyjną MS suplementowano syntetyczną auksyną w postaci NAA (kwas 1-naftylooctowy) oraz kinetyną. Dodatek tych hormonów w ilości 0,5 mg/l zapewnia szybki wzrost zarówno liści, jak i korzeni regenerujących roślin.

W doświadczeniach opisanych w publikacjach **P1-P5** analizowano także poziom ploidalności otrzymanych regenerantów (wyniki tych analiz zawarto w pracach **P1, P2**, i **P5**, pozostałe dane nie były publikowane). W tym celu wykonano analizy cytometrem przepływowym Partec. Otrzymane regeneranty przesadzano do donic (genotypy ozime przedtem jarowizowano). Następnie spontanicznie podwojone haploidy umieszczano w szklarni, a rośliny haploidalne traktowano kolchicyną, kondycjonowano w pokoju hodowlanym i po okresie aklimatyzacji przenoszono do szklarni. Nasiona roślin otrzymanych w kulturach pylnikowych mieszańców (**P2**, **P5**) zbierano i następnie linie DH charakteryzowano w doświadczeniach polowych oraz badaniach molekularnych (ten etap badawczy nie jest opisany

w prezentowanych publikacjach naukowych stanowiących osiągnięcie o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy).

Określono liczbę kalusów embriogennych/struktur embriogenicznych (SE), liczbę roślin zielonych (RZ) oraz albinotycznych (RA). Wartości powyższych parametrów przeliczano na 100 wyłożonych pylników (/100WP) otrzymując odpowiednio efektywność: tworzenia kalusów embriogennych/struktur embriogenicznych (ESE), roślin zielonych (ERZ) i albinotycznych (ERA). Ponadto określano liczbę roślin haploidalnych i spontanicznie podwojonych haploidów, podając ich procentowy udział we wszystkich regenerantach badanych pod kątem ploidalności.

W przedstawionych publikacjach wyniki zostały opracowane przy pomocy testów statystycznych: dwuczynnikowej analizy wariancji z interakcją (**P2**, **P5-P6**), analizy składowych głównych (**P3-P6**), testu Shapiro-Wilka i Wilcoxona (**P4**) oraz testu Tuke'ya (**P6**). Szczegółowe metodyki badań statystycznych zostały opisane w załączonych publikacjach. Analizy statystyczne prowadzono przy użyciu oprogramowania R (R Core Team).

Wyniki prowadzonych badań

- 1. Optymalizacja techniki kultur pylnikowych pszenicy jarej (P1, P3) oraz ozimej (P2) z uwzględnieniem genotypów opornych oraz charakteryzujących się niską zdolnością do androgenezy. Badanie wpływu genotypu, temperatury i długości szoku termicznego oraz kombinacji wybranych hormonów na wydajność tego procesu oraz na poziom ploidalności otrzymanych regenerantów.**

Weigt D., Nawracała J., Popowska D., Nijak K. 2012. Examination of ability to androgenesis of spring wheat genotypes resistant to Fusarium. *BioTechnologia* 93(2): 116-122. doi:10.5114/bta.2012.46576. (**P1**)

Weigt D., Kiel A., Nawracała J., Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Siatkowski I., Ługowska B. 2016. Obtaining doubled haploid lines of the *Lr19* gene using anther cultures of winter wheat genotypes. *BioTechnologia* 97(4):285-293. doi:10.5114/bta.2016.6454. (**P2**)

Weigt D., Kiel A., Nawracała J., Pluta M., Łacka A. 2016. Solid-stemmed spring wheat cultivars give better androgenic response than hollow-stemmed cultivars in anther culture. *BioTechnologia* 97(6): 619-625. doi:10.1007/s11627-016-9793-2. (**P3**)

Po dogłębnej analizie przebiegu androgenezy podjęłam próbę zwiększenia jej efektywności oraz optymalizacji warunków prowadzenia kultury. Pierwszy etap doświadczeń stanowił wybór pożywki indukującej. W wyniku przeprowadzonych porównań, spośród pożywek: C17, MS, P2, P4, 190-2, oraz W14 wybrano podłoże C17, które najbardziej wydajnie stymulowało regenerację. W wyniku badań wstępnych zmodyfikowano jego skład - sacharozę zastąpiono maltozą zwiększając jednocześnie stężenie cukrów, a w celu zestalenia pożywki stosowano gerlite w miejsce agaru. Na etapie badań wstępnych zdecydowano także o wyborze niskiej temperatury jako czynnika stresu. Kolejnym krokiem badawczym była analiza wariantów doświadczalnych będących połączeniem stresu w niskiej temperaturze i suplementacji pożywki indukującej wybranymi hormonami roślinnymi oraz ich analiza na

różnorodnym pod względem genetycznym materiale roślinnym. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacjach **P1-P3**.

Do badań opisanych w publikacji **P1** wykorzystano 5 genotypów będących źródłem odporności na *Fusarium* oraz 3 polskie odmiany pszenicy jarej. Analizowano wpływ traktowania kłosów stresem niskiej temperatury w 4°C przez 7 oraz 14 dni, a także efekt oddziaływania na mikrospory dwóch kombinacji hormonów wzrostu, którymi suplementowano pożywkę indukującą: 1,5 mg/l 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) + 0,5 mg/l kinetyny oraz 1,0 mg/l 2,4-D + 1mg/l dikamby. W kulturach pylnikowych stres oraz egzogenne auksyny są uważane za czynniki niezbędne do IEM. Najczęściej stosowany jest stres niskiej temperatury (Rubtsova i in. 2013, Lantos and Pauk 2016, Sen 2017). Rzadziej stosuje się w tym celu wysoką temperaturę, stres osmotyczny, głód, zmiany pH, traktowanie kolchicyną lub metalami ciężkimi (Shariatpanahi i in. 2006, Castillo i in. 2015, Lantos and Pauk 2016). Niektórzy autorzy uważają, że podawana w wysokich stężeniach auksyna także stanowi źródło stresu (Fehér 2005). Z kolei brak egzogennych auksyn w podłożu indukującym powoduje nagły spadek auksyn endogennych, głównie IAA (Szechyńska-Hebda i in. 2007) podczas gdy hormony te są niezbędne do proliferacji komórek, a także zwiększają ich plastyczność i zdolność do tworzenia embrionów (Balzan i in. 2014).

Stwierdzono, że analizowane genotypy znacznie różniły się efektywnością androgenezy, ponieważ otrzymano średnio od 0,25 do 4,42 SE/100 WP. Wpływ genotypu jest często opisywany w literaturze i wydaje się czynnikiem najsilniej limitującym możliwość komercyjnego wykorzystania androgenezy (Tuveesson i in. 2000, Ljevnaić i in. 2006, Chaudhary i in. 2003). Większość odmian pszenicy cechuje słaba zdolność do IEM, a niektóre z nich charakteryzują się opornością wynikająca z niekorzystnego układu alleli genów biorących udział w tym złożonym procesie. W pracy **P1** wykazano, że mikrospory odmian polskich (Łagwa i Zadra) charakteryzowały się wyższą wydajnością tworzenia embriogenego kalusa niż rośliny z genami odporności na *Fusarium*. Szczegółowa analiza zależności pomiędzy liczbą SE i RZ a układem doświadczenia pokazała odmienną reakcję genotypów na długość szoku termicznego oraz hormony dodawane do pożywki indukującej. Większość genotypów tworzyła RZ z wyższą efektywnością po traktowaniu niską temperaturą przez 7 dni i ekspozycji na dikambę. Z kolei z pylników odmiany Frontana otrzymano zdecydowanie więcej zielonych regenerantów na pożywce zawierającej kinetynę, po 7 dniowym szoku termicznym. W tej kombinacji doświadczalnej regenerowało 17,33 RZ/100WP. Z kolei odmiana Zadra tworzyła więcej RZ po dłuższym traktowaniu niską temperaturą (14 dni) i pod wpływem dikamby. Regeneracji roślin nie obserwowano na pożywce z dodatkiem kinetyny po 14 dniowym stresie w niskiej temperaturze. Należy zauważyć, że wydajność regeneracji SE nie pokrywała się z efektywnością tworzenia RZ. Przyczyną tego zjawiska było między innymi pojawianie się albinosów – na 352 regeneranty 48 stanowiły rośliny z defektami chlorofilowymi. Uwarunkowana genetycznie albinotyczność regenerantów jest spowodowana niezdolnością protoplastów do przemiany w chloroplasty (Makowska i Oleszczuk 2014). Skłonność do mutacji blokujących wytwarzanie chlorofilu była tu silnie uwarunkowana genotypem roślin donorowych, co potwierdzają wcześniejsze doniesienia literaturowe (Zamani i in. 2000). Przykład stanowi odmiana Ning 8331, która regenerowała wyłącznie RA, natomiast z pylników brazylijskiej odmiany Frontana na 107 regenerantów tylko 3 były albinosami.

Frekwencja spontanicznych podwojeń haploidalnego genomu otrzymanych regenerantów także zależała od genotypu rośliny donorowej. Zjawisko samoistnego podwojenia liczby chromosomów zachodzi na wczesnych etapach prowadzenia kultury, podczas pierwszych podziałów haploidalnej mikrospory. Głównym mechanizmem warunkującym podwojenie jest fuzja jąder, do której dochodzi gdy dwa jądra zaczynają się dzielić symultanicznie (Griggs i Zheng, 2016). U pszenicy nie wyklucza się także możliwości występowania endoreduplikacji, a nawet współistnienia obu mechanizmów jednocześnie co może prowadzić do zwiększenia liczby chromosomów powyżej liczby $2n$. W doświadczeniu opisanym w publikacji **P1**, na 210 RZ analizowanych pod kątem ploidalności, średnio 22% stanowiły spontanicznie podwojone haploidy. Otrzymano także 5 roślin tetraploidalnych, co potwierdza możliwość dwukrotnego podwojenia liczby chromosomów.

W publikacji **P2** opisano efektywność otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych z roślin pokolenia F_3 wyprowadzonych w wyniku krzyżowania dwóch dobrze plonujących odmian (Hondia i KWS Ozon) z dwoma liniami o podwyższonej odporności na rdzę brunatną (T36 i T39). Analizowane genotypy charakteryzowały się fenotypem ozimym. W tym eksperymencie stwierdzono istotny wpływ genotypu na wszystkie badane parametry wpływające na wydajność androgenezy: tworzenie SE, regenerację RZ oraz RA. Mieszańce pokolenia F_3 pochodzące z krzyżowania T36 x Hondia charakteryzowały się prawie dwukrotnie wyższą efektywnością formowania SE wynoszącą średnio 11,58 SE/100WP w porównaniu do roślin T39 x KWS Ozon. Jednakże efektywność regeneracji RZ miała podobną wartość dla mieszańców z obu krzyżowań i wyniosła ona odpowiednio 1,49 oraz 1,43 RZ/100WP. Przyczyną był znaczny udział RA wśród wszystkich roślin otrzymanych z mieszańców F_3 T36 x Hondia, gdzie frekwencja albinosów wśród wszystkich regenerantów sięgała 47%. Zależność genotypową obserwowano także analizując liczbę spontanicznych podwojeń haploidalnego genomu. Więcej podwojeń zachodziło w kulturach pylnikowych mieszańców F_3 T39 x KWS Ozon, gdzie ich udział procentowy sięgał 42,86% i był wyższy o ponad 12% od wartości tego parametru uzyskanej dla roślin T36 x Hondia. W pracy **P2** opisano wpływ trzech kombinacji hormonów wzrostu w pożywce indukującej C17 (o łącznym stężeniu 2 mg/l) na kultury pylnikowe pszenicy ozimej: 2 mg/l 2,4-D; 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l dicamby; 1,5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetyny. Pomimo braku istotnych różnic w liczbie SE obserwowanej na poszczególnych kombinacjach pożywki, ze względu na liczbę zregenerowanych RZ, wyraźnie lepszymi okazały się pożywki z jednoczesnym dodatkiem dwóch regulatorów wzrostu. Z pylników hodowanych na tych podłożach otrzymano średnio 3,44 oraz 3,32 RZ/100WP, natomiast dodatek samego 2,4-D pozwolił na regenerację 2,2 RZ/100WP. Z tego względu w kolejnym eksperymencie opisanym w publikacji **P3** wykorzystano kombinacje hormonów zawierające w podłożu C17 po dwa regulatory wzrostu: 2,4-D + dikamba; 2,4-D + kinetyna.

W kolejnym doświadczeniu (**P3**) badano zdolność do androgenezy genotypów jarych różniących się stopniem wypełnienia rdzenia. Stwierdzono, że cecha ta miała wpływ na efektywność regeneracji w kulturach pylnikowych, a odmiany z pełnym rdzeniem charakteryzowały się średnio lepszą regeneracją. Ponownie obserwowano silną interakcję genotypu i kombinacji hormonów w podłożu przejawiającą się zróżnicowaniem efektywności androgenezy w zależności od stosowanych regulatorów. Eksperyment uwzględniał także analizę wpływu nowego czynnika, którym była wysokość temperatury stresu termicznego: 4°C

oraz 8°C. Nie stwierdzono istotnych różnic w efektywności IEM, ani też regeneracji roślin pomiędzy analizowanymi odmianami pod wpływem badanych wariantów czynnika stresu. Ten etap badań pozwolił na wstępną selekcję genotypów embriogennych oraz opornych. Do tych pierwszych zaliczono się odmianę Ac Abbey, z której mikrospor otrzymano 24 RZ/100WP. Z kolei odmiany CLTR 7027 oraz Bombona wykazały silną oporność genotypową i nie formowały nawet SE.

Głównym osiągnięciem badań przedstawionych w publikacjach **P1-P3** było pogłębienie wiedzy na temat wpływu wybranych czynników egzogennych na efektywność androgenezy w kulturach pylnikowych pszenicy. W wyniku analizy szerokiego spektrum genotypów różniących się pod względem pochodzenia, a także testowania wielu wariantów eksperymentalnych zoptymalizowano metodykę otrzymywania roślin poprzez embriogenezę mikrospor. Wskazano dwie kombinacje składu hormonalnego pożywki indukującej pozwalające otrzymać rośliny haploidalne i podwojone haploidy z większości poddanych androgenezie genotypów. Ponadto potwierdzono, że skłonność do występowania defektów chlorofilowych oraz frekwencja spontanicznych podwojeń liczby chromosomów są uwarunkowane genetycznie, a proponowany skład hormonalny pożywki oraz warunki prowadzenia kultury wpływają na te parametry w sposób nieistotny statystycznie. Podsumowując ten etap badań, wyselekcjonowano genotypy charakteryzujące się wysoką zdolnością do tworzenia SE oraz RZ, jak i odporne pod względem obu parametrów. Wybrane na tej podstawie odmiany posłużyły do badań opisanych w pracy **P6** niniejszej rozprawy oraz są wykorzystywane aktualnie w badaniach nad uwarunkowaniami genetycznymi oraz epigenetycznymi indukcji embriogenezy mikrospor prowadzonymi pod moim kierunkiem.

Wyniki zamieszczone w publikacji **P2** powstały w ramach projektu pt.: „Opracowanie i wdrożenie modelu przyspieszenia hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych”, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, projekt nr PBS2/B8/10/2013. Pozostałe badania (**P1**, **P3**) były finansowane z programu badań statutowych Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, projekt nr 508.102.00.

2. Wskazanie różnic w efektywności tworzenia struktur embriogenicznych i regeneracji roślin pod wpływem składu hormonalnego pożywki indukującej u odmian pszenicy o fenotypie jarym oraz ozimym z wykorzystaniem opracowanej metody kultur pylnikowych (P4).

Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Tomkowiak A., Kwiatek M. 2020. Comparison of the Androgenic Response of Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants* 9(1), 49.doi:10.3390/plants9010049. (**P4**)

Analiza wyników uzyskanych z opisanych powyżej doświadczeń (**P1-P3**) pokazała zróżnicowaną reakcję fenotypów ozimych oraz jarych na warunki prowadzenia kultury, a w szczególności na skład hormonalny pożywki indukującej. Zainteresował mnie fakt, iż analizowane mieszańce ozime F₃ (**P2**) znacznie efektywniej regenerowały RZ na pożywce z dodatkiem kinetyny w porównaniu z roślinami o fenotypie jarym (**P1** oraz **P3**). Z tego względu wykonano analizę porównawczą zdolności do androgenezy pszenic jarych oraz ozimych stosując wcześniej opisane składy hormonalne pożywki indukującej (2,4-D + dikamba; 2,4-D

+ kinetyna) oraz zoptymalizowaną temperaturę i długość trwania szoku termicznego - 4°C przez 7 dni. Do doświadczenia wybrano 30 genotypów (po 15 z każdej grupy fenotypowej) o zróżnicowanych komponentach rodzicielskich, a więc różniące się znacznie pulami genowymi. Stosowana metodyka spowodowała efektywniejszą IEM oraz regenerację roślin z odmian jarych. Ponadto stwierdzono, że mikrospory pszenic jarych istotnie lepiej reagują na oddziaływanie wyłącznie hormonami z grupy auksyn: 2,4-D + dikamba, natomiast ozimych średnio efektywniej tworzą SE i RZ na podłożu suplementowanym auksyną z dodatkiem cytokininy - 2,4-D + kinetyna. Potwierdzono także, że na tworzenie RA ma wpływ przede wszystkim genotyp roślin donorowych, chociaż na pożywce zawierającej kinetynę tworzyło się mniej albinosów zarówno z pylników odmian jarych, jak i ozimych. Badania statystyczne nie potwierdziły jednak istotności tych różnic. Eksperyment opisany w publikacji **P4** pozwolił na potwierdzenie wysokiej zdolności do androgenezy odmiany jarej Ac Abbey, z mikrospor której otrzymano średnio 20 RZ/100WP, a w kombinacji z dikambą wysokość tego parametru sięgała 36,7 zielonych regenerantów/100WP. Dla porównania, z odmian o fenotypie ozimym najbardziej androgeniczna okazała się odmiana Hondia (średnio na obu zastosowanych wariantach hormonów w pożywce indukującej otrzymano 2,7 RZ/100WP), która była jednym z komponentów rodzicielskich w doświadczeniu opisanym w pracy **P2**. Prawdopodobnie stanowiło to przyczynę uzyskania znacznie lepszych parametrów androgenezy w eksperymencie **P2** (średnio regeneracja wyniosła 1,45 RZ/100WP), niż w doświadczeniu **P4**, gdzie średnia efektywność tworzenia RZ wyniosła zaledwie 0,5/100WP. Różnica ta wynikała także z oporności genotypowej 6 odmian ozimych analizowanych w pracy **P4** (Greer, Geneva, Lr19, Augusta, Century, Agrus). Otrzymano z nich kalusy, które nie regenerowały roślin lub tworzyły wyłącznie RA. Ponadto efektywniejsza regeneracja z pylników roślin mieszańcowych (**P2**) może wynikać z ich heterozygotyczności (El-Hennawy i in. 2011). Zjawisko to potwierdzono w innych badaniach naszego zespołu, w których porównano zdolność do androgenezy komponentów rodzicielskich oraz mieszańców F₁ (badania niepublikowane). W tym eksperymencie większość analizowanych mieszańców przewyższała komponenty rodzicielskie pod względem efektywności tworzenia SE, jak i regeneracji RZ.

Głównym osiągnięciem badań przedstawionych w publikacji **P4** było wykazanie, że pszenice o fenotypie jarym średnio lepiej regenerują na pożywkach z dodatkiem 2,4-D oraz dicamby, natomiast pszenice ozime wykazują lepszą zdolność do androgenezy, gdy są indukowane na podłożu suplementowanym 2,4-D oraz kinetyną. Wynik ten pozwala wnioskować, że opracowanie wydajnej metodyki androgenezy wymaga dostosowania warunków prowadzenia kultury dla roślin donorowych o fenotypie ozimym oraz jarym. Ponadto stwierdzono średnio niższą efektywność regeneracji roślin z pszenic ozimych niż z jarych. Prawdopodobnie przyczynę stanowi ich większa odporność na niską temperaturę, a więc słabsza IEM pod wpływem zastosowanego czynnika stresu – 7 dni w 4°C. W prezentowanej publikacji potwierdzono wysoką zdolność do androgenezy odmiany jarej Ac Abbey.

Wyniki zamieszczone w pracy **P4** powstały w ramach projektu pt.: „Opracowanie i wdrożenie modelu przyspieszenia hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych”, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, projekt nr PBS2/B8/10/2013.

3. Identyfikacja nowych, wydajnych induktorów embriogenezy mikrospor pszenicy zwiększających efektywność regeneracji roślin i umożliwiających przełamanie oporności genotypowej.

Weigt, D.; Niemann, J.; Siatkowski, I.; Zyprych-Walczak, J.; Olejnik, P.; Kurasiak-Popowska, D. 2019. Effect of Zearalenone and Hormone Regulators on Microspore Embryogenesis in Anther Culture of Wheat. *Plants* 8(11), 487. doi:10.3390/plants8110487. **(P5)**

Weigt D., Siatkowski I., Magaj M., Tomkowiak A., Nawracała J. 2020. Impact of Ionic Liquids on Induction of Wheat Microspore Embryogenesis and plant Regeneration. **(P6)**

Optymalizacja czynników egzogennych prowadzenia kultur pylnikowych pszenicy stanowiła pierwszy krok w kierunku podniesienia efektywności androgenezy. Obserwowana w doświadczeniu oporność genotypowa skłoniła mnie do poszukiwania związków, które byłyby induktorami embriogenezy mikrospor i zarazem stymulowałyby regenerację RZ. Zastosowanie tych związków pozwoliłoby na przełamanie oporności genotypowej i regenerację roślin niezależnie od genotypu rośliny donorowej. Ta część podjętych przeze mnie badań stanowiła duże wyzwanie naukowe, ponieważ jak dotąd, pomimo licznych badań prowadzonych przez wiele zespołów na całym świecie, nie udało się zidentyfikować czynników, których zastosowanie pozwoliłoby na wytworzenie linii DH ze wszystkich poddanych kulturze pylnikowej genotypów.

W ramach badań pilotażowych analizowano kilka czynników, które wg doniesień literaturowych mogłyby podnieść wydajność androgenezy. Związkami, których wpływ badano, były między innymi: epibrassinosteroid, kolchicina, ficoll, zwiększone stężenie wybranych składników pożywki C17. Analizowano także wpływ kokultury załączni na efektywność androgenezy. Wybrane kombinacje analizowanych czynników podnosiły wydajność tworzenia SE oraz RZ, lecz nie przełamywały warunkowanej genetycznie oporności. Z tego względu podjęto próbę znalezienia związków, które jak dotąd nie były stosowane w androgenezie **(P5)**, a nawet w kulturach *in vitro* roślin **(P6)**.

W pracy **P5** opisano wpływ zearalenonu (ZEN) w interakcji z innymi hormonami wzrostu na IEM w kulturach pylnikowych pszenicy. ZEN jest mykotoksyną wytwarzaną przez grzyby, głównie z rodzaju *Fusarium*, które powszechnie porażają zboża. Zanieczyszczenie pasz tym związkiem powoduje silne zaburzenia w rozwoju i rozrodzie zwierząt gospodarskich. ZEN wcześniej stosowano w formie oprysku na załącznie przygotowywane do krzyżowania z kukurydzą (Biesada-Kościelniak 2003). Związek ten był także wykorzystywany do przyspieszania wernalizacji pszenicy (Fiłek i in. 2010). Ma on działanie cytotoksyczne i zwiększa przepuszczalność błon lipidowych w komórkach roślinnych. Ponadto badania fizjologiczne wskazują na podobieństwo jego działania do hormonów z grupy auksyn. Stwierdzono bowiem, że ZEN stymuluje regenerację pośrednią, proliferację kalusa, różnicowanie komórek i embriogenezę (Biesada-Kościelniak 2003). Połączenie dwóch właściwości ZEN - czynnik stresu oraz działanie auksyno-podobne - skłoniło nas do zbadania wpływu tego związku na efektywność IEM. Badaniu poddano mieszańce F₁ pochodzące z 19 kombinacji krzyżowania o fenotypie ozimym oraz jarym. Analizowano wpływ 6 kombinacji ZEN i regulatorów wzrostu w pożywce indukującej. W sumie wyłożono 34 200 pylników, a wszystkie testowane genotypy wytworzyły SE. Proces IEM oraz regeneracji RZ przebiegał wydajniej na pożywkach z dodatkiem ZEN. Pylniki tylko jednej z analizowanych kombinacji

krzyżowania nie regenerowały RZ. W tym doświadczeniu ponownie potwierdzono wcześniejsze wnioski dotyczące wydajniejszej androgenezy pszenic jarych na pożywce z dodatkiem dikamby oraz fenotypów ozimych na pożywce z dodatkiem kinetyny. Stwierdzono też, że podobnie jak w poprzednich pracach (**P1-P4**), liczba albinosów oraz frekwencja spontanicznych podwojeń genomu były silnie związane z genotypem roślin donorowych, a nie dodatkiem hormonów i ZEN do pożywki indukującej.

Niezależnie od badań wpływu ZEN na efektywność androgenezy analizowano także oddziaływanie innych związków na ten proces (**P6**). Dzięki współpracy z Instytutem Technologii i Inżynierii Technicznej Politechniki Poznańskiej pozyskaliśmy ciecze jonowe III generacji zsyntetyzowane na bazie stosowanych w kulturach *in-vitro* auksyn. Pochodne 2,4-D stanowiły dwa związki: kwas (2,4-dichlorofenoksy)octan 2-chloroetylotrimetyloamoniowy (C2) oraz kwas (2,4-dichlorofenoksy)octan trimetylowinyloamoniowy (TM), natomiast kwas 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesan 2-chloroetylotrimetyloamoniowy (CD) został zsyntetyzowany na bazie dikamby. Związki te mają unikatowe właściwości chemiczne i fizyczne wynikające z ich struktury - stanowią połączenie herbicydowego anionu z aktywnym biologicznie kationem. Podobnie jak ZEN, ciecze jonowe dodane do pożywki indukującej stanowiły jednocześnie dodatkowy czynnik stresu pobudzający tranzycję szlaku rozwojowego mikrospor z generatywnego w sporofityczny, a jednocześnie odgrywały rolę egzogennych auksyn. Ponadto związki te charakteryzują się niskim napięciem powierzchniowym, a więc stosunkowo łatwo przenikają do komórek roślinnych, z kolei ZEN zwiększa przepuszczalność błon komórkowych co także powoduje łatwiejsze wnikanie do wnętrza mikrospor. Dodatkowo ciecze jonowe cechują się niską lotnością, co pozwala przypuszczać, że ich stabilność po dodaniu do pożywki jest większa niż w przypadku 2,4-D, czy dikamby.

W doświadczeniu opisanym w pracy **P6** badano wpływ cieczy jonowych na IEM oraz regenerację roślin czterech wyselekcjonowanych na podstawie wcześniejszych badań odmian pszenicy jarej. Dwie z nich charakteryzowały się wysoką embriogennością (Ac Abbey, DC356/08-4-5/09) oraz dwie były odporne genotypowo (HN ROD 513750, CLTR 7027). W doświadczeniu użyto dziesięć kombinacji regulatorów wzrostu (cieczy jonowych oraz 2,4-D) w pożywce indukującej o łącznym stężeniu 2 mg/l, w tym jedna kombinacja stanowiła kontrolę i zawierała wyłącznie 2,4-D. Hormon ten jest najczęściej dodawany do pożywek indukujących embriogenezę mikrospor pszenicy i innych gatunków jednoliściennych (Malik i in. 2003, Żur i in. 2015). W wyniku przeprowadzonego eksperymentu potwierdzono potencjał androgeniczny wyselekcjonowanych odmian i stwierdzono korzystny wpływ cieczy jonowych zarówno na IEM w kulturach pylnikowych, jak i na regenerację RZ. Ekspozycja na ciecze jonowe pylników odmian opornych stymulowała tworzenie SE, z których następnie otrzymano RZ, przełamując oporność genotypową. Z kolei odmiany embriogenne miały lepszą wydajność androgenezy na większości zastosowanych kombinacji regulatorów w pożywce C17 w porównaniu do indukcji na podłożu kontrolnym. Spośród badanych genotypów odmiana DC356/08-4-5/09 charakteryzowała się istotnie większą skłonnością do regeneracji RA, co potwierdza opisany wcześniej wpływ genotypu na występowanie defektów chlorofilowych. W tym badaniu stwierdzono także, że jedna z kombinacji regulatorów promowała występowanie większej liczby albinosów niż pozostałe warianty pożywki indukującej. Stwierdzono także, że genotypy embriogenne charakteryzują się szybszą IEM w porównaniu do genotypów opornych.

Głównym osiągnięciem badań prezentowanych w publikacjach **P5** i **P6** jest wskazanie związków, które wpływają stymulująco na proces IEM i zwiększają efektywność regeneracji RZ, a także przełamują oporność genotypową analizowanych odmian. Związkami tymi jest ZEN oraz cieczce jonowe III generacji o pochodzeniu syntetycznych auksyn. ZEN nie był wcześniej stosowany w kulturach pylnikowych żadnego gatunku, a nieliczne doniesienia literaturowe wskazywały na jego właściwości cytotoksyczne i auksyno-podobne. Herbicydowe cieczce jonowe jak dotąd nie były wykorzystywane w roślinnych kulturach *in vitro*. Studium ich właściwości fizyko-chemicznych zdecydowało o zastosowaniu tych związków jako hormonów w pożywce indukującej. Ponadto opracowano sposób aplikacji, a także zoptymalizowano stężenia ww. związków uzupełniając wcześniej opracowaną metodykę kultur pylnikowych pszenicy. Dzięki tym działaniom podniesiono efektywność androgenezy odmian embriogennych i otrzymano RZ z genotypów opornych.

Wyniki zamieszczone w pracach **P5** powstały w ramach projektu pt.: „Opracowanie i wdrożenie modelu przyspieszenia hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych”, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, projekt nr PBS2/B8/10/2013. Badania opisane w publikacji **P6** były finansowane z programu badań statutowych Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, projekt nr 508.102.00.

Podsumowanie

W cyklu publikacji naukowych, powiązanych tematycznie, które stanowią podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego przedstawiłam wyniki badań własnych dotyczących problemu wydajności otrzymywania haploidów oraz podwojonych haploidów z wykorzystaniem kultur pylnikowych pszenicy zwyczajnej. Analiza szerokiego spektrum genotypów oraz zastosowanie wielu czynników wpływających na androgenezę pozwoliło na zwiększenie efektywności tej metody zarówno w przypadku odmian embriogennych, jak i opornych. Ponadto dokonano selekcji genotypów o skrajnych zdolnościach do androgenezy mogących stanowić materiał roślinny do badań nad uwarunkowaniami genetycznymi oraz epigenetycznymi tego procesu. Elementami nowatorskimi prezentowanego osiągnięcia naukowego jest zastosowanie induktorów: ZEN oraz cieczy jonowych III generacji w celu podniesienia wydajności IEM i zwiększenia efektywności regeneracji RZ. ZEN nie był wcześniej stosowany w kulturach pylnikowych pszenicy, a cieczce jonowe nie były używane do roślinnych kultur *in vitro*. Opracowanie wydajnej metodyki androgenezy z wykorzystaniem tych związków oraz techniki ekspozycji pylników na ZEN, a także sposobu aplikacji cieczy jonowych do pożywek indukujących jest moim wkładem autorskim w rozwój metod otrzymywania linii DH, a więc przyczynia się do postępu w dyscyplinie naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo. Optymalizacja proponowanej przeze mnie techniki hodowli pylników oraz zastosowanie wydajnych induktorów androgenezy dowiodły słuszności postawionej hipotezy badawczej, zakładającej możliwość zwiększenia efektywności IEM oraz regeneracji RZ, a także przełamania oporności genotypowej w kulturach pylnikowych pszenicy w wyniku odpowiedniego doboru czynników egzogennych. Zaprezentowane badania posiadają dużą wartość poznawczą i aktualnie są wykorzystywane w kolejnych eksperymentach naukowych dotyczących podłoża genetycznego oraz epigenetycznego androgenezy. Ponadto prezentowana metodyka może być wykorzystana w produkcji linii DH w hodowli twórczej pszenicy.

Literatura:

1. Balzan S., Johal G.S., Carraro N. 2014. The Role of auxin transporters in monocots development. *Front. Plant Sci.* 5: 393.
2. Barclay I.R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410-411.
3. Biesaga-Kościelniak J., Marcińska I., Wędzony M., Kościelniak J. 2003. Effect of zearalenone treatment in the production of wheat haploids via maize pollination system. *Plant Cell Rep.* 21: 1035-1039.
4. Broughton S., Castello M., Liu L., Killen J., Hepworth A., O'leary R. 2020. The effect of Caffeine and Triflurain on chromosome doubling in wheat anther culture. *Plants* 9: 105.
5. Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer G.E., Bollino P.J. 1882. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. *Theor. Appl. Genet.* 62: 155-159.
6. Castillo A.M., Sanchez-Diaz R.A., Valles M.P. 2015. Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Frontiers in Plant Science* 6: 402.
7. Chaudhary H.K., Badiyal A., Jamwal N.S. 2015. New frontiers in doubled haploidy breeding in wheat. *Agric. Res. J.* 52(4): 1-12.
8. Chaudhary, H.K., Dhaliwal I., Singh S., Sethi, G. S. 2003. Genetics of Androgenesis in Winter and Spring Wheat Genotypes. *Euphytica* 132(3): 311-319.
9. CIMMYT <https://www.cimmyt.org/wheat-facts-and-fiction/> (dostęp 22.09.2020).
10. Dağüstü N. 2008. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3419-3423.
11. Datta, S. K. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.* 89: 1870-1878 .
12. El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. 2011. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Ann. Agric. Sci.* 56(2): 63-72.
13. Elhaddoury J., Lhaloui S., Udupa S.M., Moatissim B., Taiq R., Rabeh M., Kamlaoui M., Hammadi M. 2012. Registration of 'Kharoba': A bred wheat cultivar developed through doubled haploid breeding. *J. Plant Regist.* 6: 169-173.
14. Fehér A. 2005. Why somatic plant cells start to form embryos? In: *Somatic Embryogenesis (Plant Cell Monographs)*; Mujib A., Samaj J., Eds.: Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2: 85-101.
15. Filek M., Biesaga-Koscielniak J., Marcinska I., Cvikrova M., Machackova I., Krekule J. 2010. Contents of polyamines during vernalization in wheat and the effect of zearalenone. *Biol. Plant.* 54: 483-487.
16. Forster B.P., Herberle-Bors E., Kasha K.J., Touraev A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12: 368-75.
17. Goutam U., Kukreja S., Tiwari R., Chaudhury A., Gupta R. K., Dholakia B.B., Yadav R. 2013. Biotechnological approaches for grain quality improvement in wheat: Present status and future possibilities. *Aust. J. Crop Sci.* 7(4): 469-483.
18. Graf R.J., Hucl P., Orshinsky B.R., Kartha K.K. 2003. "McKenzi" hard red spring wheat. *Can. J. Plant Sci.* 83: 565-569.
19. Griggs R., Zheng M.Y. 2016. Nuclear Fusion during Early Stage of Microspore Embryogenesis Indicates Chromosome Doubling in Wheat (*Triticum aestivum*). *Am. J. Plant Sci.* 7: 489-499.
20. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70 (1): 377-406.

21. Inagaki M., Tahir M. 1990. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. Jpn. J. Breed. 40: 209-216.
22. Jauhar P.P., Xu S.S., Baenziger P.S. 2009. Haploidy in Cultivated Wheats: Induction and Utility in Basic and Applied Research. Crop Sci. 49: 737-755.
23. Kim, K.M., Baenziger S. P., Rybczynski J. J. 2003. Characterization of ploidy levels of wheat microspore-derived plants using laser flow cytometry. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39:663-668.
24. Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. 2003. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 73: 177-187.
25. Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauket J. 2012. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. Plant Breed. 132: 149-154.
26. Lantos C., Pauk J. 2016. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. Russ. J. Genet. 52: 794-801.
27. Laurie D.A., Bennett M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Teor. Appl. Genet. 76(3): 393-397.
28. Laurie D.A., Bennett M.D. 2011. Wheat × maize hybridization. Genome 28(2): 313-316.
29. Ljevnaić B., Kondić-Sipka A., Kobiljski B., Dencić S. 2006. Androgenous ability of heterozygous wheat genotypes and cytological characteristics of green regenerants. Genetika 38(2): 153-158.
30. Makowska K., Oleszczuk S. 2014. Albinism in barley androgenesis. Plant Cell Rep. 33(3): 385-392.
31. Malik S.I., Rashid H., Yasmin T., Mahmood Minhas N. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Int. J. Agr. Biol. 6(1): 156.
32. Marone D., Laido G., Gadaleta A., Colasuonno P., Ficco D.B.M., Giancaspro A. 2012. A high-density consensus map of A and B wheat genomes. Theor Appl. Genet. 125: 1619-1638.
33. Miha'ly R., Ko'tai E., Kiss O., Pauk J. 2002. In vitro selection of transformed foreign gene (bar) in wheat anther culture. Acta Biol. Szeged. 46(3-4): 9-10.
34. Ming-Hui K., Yan H., Bing-Yan H., Yong-Ying Z., Shi-Jie W., Li-Juan M., Xin-You Z. 2011. Breeding of newly licensed wheat variety Huapei 8 and improved breeding strategy by anther culture. Afr. J. Biotechnol. 10: 19701-19706.
35. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
36. Nielsen N.H., Andersen S.U., Stougaard J., Jensen A., Backes G., Jahoor A. 2015. Chromosomal regions associated with the in vitro culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores. Plant Breed. 134: 255-263.
37. Ouyang J.W., Hu H., Chuang C.C., Tsen C.C. 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. Sci. Sin. 16:79-95.
38. Pauk J., Kertész Z., Beke B., Bóna L., Csősz M., Matuz J. 1995. New winter wheat variety-“GK Délibáb” developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. Cereal Res. Commun. 23: 251-256.
39. Pauk J., Lantos C., Cseuz L., Papp M., Óvári J., Beke B., Pugris T. 2020. ‘GK Déva’ dihaploid módszer segítségével előállított új őszi búzafajta (‘GK Déva’, new released winter wheat variety using dihaploid method). XXVI. Növénynevelési Tudományos Napok, Szeged, Hungary, 04-05. 03. 2020. p. 102.
40. Picard E., De Buyser J. 1973. Obtention de plantules haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d’antheres in vitro. C. R. Acad. Sci. 277: 1463-1466.

41. Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., Weyen J., Gils M. 2013. The auxins centrophenoxine and 2,4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnol. Rep.* 7: 247-255.
42. Sadasivaiah R.S., Perkovic S.M., Pearson C., Postman B., Beres B.L. 2004. Registration of “AC Andrew” wheat. *Crop Sci.* 44: 696–697.
43. Seifert F., Bössow S., Kumlehn J., Gnad H., Scholten S. 2016. Analysis of wheat microscope androgenesis induction by transcriptome and small RNA sequencing using the highly responsive cultivar “Svilena”. *BMC Plant Biol.* 16: 97.
44. Sen A. 2017. Retrotransposon insertion variations in doubled haploid bread wheat mutants. *Plant Growth Regul.* 81: 325-333.
45. Shariatpanahi M.E., Bal U., Heberle-Bors E., Touraev A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127:519-534.
46. Solís M.T., El-Tantawy A.A., Cano V., Risueño M.C., Testillano P.S. 2015. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Front. Plant Sci.* 6: 472.
47. Szechyńska-Hebda M., Skrzypek E., Dąbrowska G., Biesaga-Kościelniak J., Filek M., Wędzony M. 2007. The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat. *Acta Physiol. Plant.* 29(4): 327-337.
48. Testillano P.S. 2019. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J. Exp. Bot.* 70(11): 2965-2978.
49. Touraev A., Indrianto S., Wratschko I., Vincente O., Heberle-Bors E. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Reprod.* 9: 209-215.
50. Tuvešson S., Ljungberg A., Johansson N., Karlsson K.E., Suijs L.W., Josset J.P. 2000. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single anther culture method. *Plant Breed.* 119: 455-459.
51. Tuvešson S., Von Post R., Ljungberg A. 2003. Wheat anther culture. in: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds), *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, 71-76. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
52. Tyrka M., Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Woś H., Wędzony M., Zimny J., Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Metzger R. J., Baenziger P. S., Lukaszewski A. J. 2018. Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticale. *Mol. Breeding* 38: 46.
53. Wang C.C., Chu C.C., Sun C.S., Wu H.S., Yin K.C., Hsu C. 1973. The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers cultured *in vitro*. *Acta Gen. Sin.* 16: 218-222.
54. Wang P., Chen Y. 1983. Preliminary study on production of height of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron. Sin.* 9: 283-284.
55. Wei Z.M. 1982. Pollen callus culture in *Triticum aestivum* L. *Theor. Appl. Genet.* 63: 71-73.
56. Żur I., Dubas E., Krzewska M., Zieliński K., Fodor J., Janowiak F. 2019. Glutathione provides antioxidative defence and promotes microspore-derived embryo development in isolated microspore cultures of triticale (\times Triticosecale Wittm.). *Plant Cell Rep.* 38:195-209.
57. Żur I., Dubas E., Krzewska M., Janowiak F. 2015. Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 6: 424.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Badania przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora oraz stanowiące wyniki otrzymane w ramach realizacji pracy doktorskiej

Pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam realizując pracę magisterską w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Brody. Już wtedy interesowałam się genetyką i biotechnologią związaną z twórczą hodowlą roślin. Szczególną uwagę zwróciłam na możliwość wykorzystania technik kultur *in vitro* w badaniach naukowych i aplikacyjnych. Zgodnie z zainteresowaniem, w ramach pracy magisterskiej, podjęłam badania nad regeneracją zarodków somatycznych z liścieni oraz hipokotyli lucerny. W czasie studiów pobierałam przyznane przez rektora Akademii Rolniczej w Poznaniu stypendium naukowe dla najlepszych studentów. W 1997 roku obroniłam pracę dyplomową pt. „Indukcja embriogenezy somatycznej u lucerny (*Medicago sativa* Pers)” otrzymując wynik bardzo dobry. Studia wyższe ukończyłam z tytułem magistra inżyniera na kierunku Rolnictwo, specjalność biotechnologia. W tym samym roku zostałam zatrudniona na etat asystenta stażysty, a rok później kontynuowałam pracę w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin jako asystent.

Początkowo zajęłam się problematyką dotyczącą androgenezy w kulturach pylnikowych pszenicy ozimej, jednakże przerwy związane z urlopami macierzyńskimi i wychowawczymi doprowadziły do chwilowej zmiany kierunku moich badań. Zajęłam się tematyką słabego plonowania nasion u lucerny siewnej. Lucerna w warunkach klimatycznych Polski ma niską efektywność wiązania strąków, a nasiona tworzą się zaledwie w około 20% załączków. W związku z tym materiał siewny odmian tego gatunku jest sprowadzany głównie z zagranicy. Dzięki współpracy z prof. dr hab. Zygmuntem Staszewskim z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie otrzymałam do analiz nasiona mutantów kwiatostanu lucerny o fenotypie wiechowatym, długo-groniastym oraz samo-kończącym. Mutanty charakteryzowałam pod względem morfologicznym, cytogenetycznym i molekularnym. Wyniki tych prac stanowią ważny wkład w zrozumienie problemu słabego plonowania nasion, który jest obserwowany u wielu gatunków z rodziny bobowatych. Celem aplikacyjnym badań było wskazanie form dobrze wiążących nasiona w warunkach klimatycznych naszego kraju. Podczas realizacji pracy doktorskiej współpracowałam także z prof. dr hab. Rafałem Molem z Instytutu Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach wspólnego projektu badań interdyscyplinarnych pt.: „Cytoembriologiczna analiza niskiego zawiązywania nasion u lucerny (*Medicago sativa* L. sl.)” (projekt no. 2/02/WI/06). W 2007 roku obroniłam pracę doktorską pt. „Analiza morfologiczna, cytogenetyczna i molekularna mutantów kwiatostanu lucerny (*Medicago sativa* L. sl.)”, której opiekunem merytorycznym był prof. dr hab. Zbigniew Broda. Wykonując analizy do rozprawy doktorskiej wzbogaciłam swój warsztat badawczy o metody fenotypowania roślin, otrzymywania pokoleń wsobnych z samoniezgodnego, poliploidalnego i jednocześnie obcopylnego gatunku jakim jest lucerna, a także opanowałam metodykę badań z wykorzystaniem markerów molekularnych oraz poznałam techniki cytogenetyczne, takie jak preparatyka rozmazowa, przejaśnieniowa, trwała i fluorescencyjna. Ponadto stosowałam metody statystyczne pozwalające na głębszą interpretację otrzymanych wyników. Efekty prowadzonych w tym okresie badań zaprezentowałam w formie publikacji z listy A MNiSW (zał.4, pkt.II/4/A, poz.9) oraz z listy B MNiSW (Załącznik 4, pkt.II/4/B, poz.23-25), w których byłam pierwszym lub równorzędnym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

5.2. Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po otrzymaniu stopnia doktora zajmowałam się wieloma problemami badawczymi. Nadal kontynuowałam współpracę z prof. dr hab. Rafałem Molem (UAM) dążąc do wyjaśnienia źródła problemów z pozyskiwaniem nasion lucerny. W ramach wspólnych badań prześledziłam prawidłowość procesu mikro i makrosporogenezy oraz przebieg formowania załączków, a następnie procesu zapłodnienia, rozwoju zarodków i towarzyszące temu zjawiska, takie jak odkładanie kalozy. Badania te kontynuowałam do roku 2016, w którym odbyłam półroczny staż w Instytucie Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (załącznik 4, pkt.II/11, poz.2). Wyniki prowadzonych analiz były publikowane w materiałach konferencyjnych (załącznik 4, pkt.II/7, poz.26,34,37,42,49).

Poza tym byłam wykonawcą w dotacji MRiRW „Metodologia identyfikacji haploidów i dihaploidów kukurydzy (*Zea mays* L.)”. Badania te były prowadzone we współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie. W efekcie przeprowadzonych analiz opracowano metody rozpoznawania roślin haploidalnych kukurydzy typu Flint oraz Dent powstałych po eliminacji chromosomów linii zapylającej. Dzięki zastosowaniu markerów RAPD zidentyfikowano specyficzny marker pozwalający na wstępną selekcję haploidów. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *International Journal of Agriculture Sciences* (zał.4, pkt.II/4/B, poz.13).

W tym okresie zainteresowałam się także żytem, jako gatunkiem stanowiącym trudne wyzwanie dla genetyków i hodowców. Jest to roślina obcopolna i samoniezgodna, co stanowi źródło trudności w pozyskaniu linii wsobnych tego gatunku i utrwaleniu postępu hodowlanego. W ramach projektu MRiRW pt. „Badania nad zdolnością do androgenezy u różnych genotypów żyta” zajęłam się problemem otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych. Brałam udział w optymalizacji warunków prowadzenia kultury, doboru pożywki indukującej oraz regeneracyjnej, składu pożywek oraz ich suplementacji hormonami roślinnymi. Ponadto byłam wykonawcą w grantie KBN pt. „Charakterystyka zmienności cech jakościowych i ilościowych dzikich gatunków i podgatunków żyta oraz wytworzenie mieszańców oddalonych w rodzaju *Secale* sp.”. Dzięki tym badaniom opracowano szczegółową charakterystykę 6-ciu dzikich gatunków i podgatunków z r-ju *Secale* oraz mieszańców F₁ pochodzących z 20 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych pomiędzy: 4 odmianami *Secale cereale* subsp. *cereale* i gatunkami oraz podgatunkami dzikimi: *Secale vavilovii*, *Secale cereale* subsp. *afghanicum*, *Secale cereale* subsp. *ancestrale*, *Secale cereale* subsp. *dighoricum*, *Secale cereale* subsp. *segetale*. Materiał roślinny badano pod kątem cech fenotypowych warunkowanych głównie przez geny o działaniu addytywnym, jak również analizowano ich podobieństwo genetyczne z zastosowaniem markerów molekularnych. W rezultacie powyższych badań powstały oryginalne prace naukowe (zał.4, pkt.II/4/B, poz. 17,21).

Z dniem 1.10.2009 roku zostałam przyjęta na etat adiunkta w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Wydziału Rolniczego Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. Początkowo kontynuowałam wcześniej realizowane zadania badawcze. Od roku 2011, zgodnie z moimi wcześniejszymi zainteresowaniami, zaczęłam własne badania związane z otrzymywaniem podwojonych haploidów pszenicy w kulturach *in vitro*. W tym okresie opracowałam metodykę podstawową, którą opisałam w części „Metody” punktu 4 (Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy) tego autoreferatu. Dzięki wykonawstwu w grantie Programu Badań Stosowanych Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR – PBS2/B8/10/2013) pt. „Opracowanie i wdrożenie modelu przyspieszenia hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych” podjęłam współpracę z Instytutem Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu oraz ze spółkami hodowlanymi: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Grupa IHAR, Poznańską

Hodowlą Roślin Sp. z o.o., Małopolską Hodowlą Roślin Sp. z o.o. W ramach tego grantu wyprowadziłam na drodze androgenezy linie podwojonych haploidów, których ploidalność mierzyłam we współpracy z Kutnowską Hodowlą Buraka Cukrowego Sp. z o.o., a następnie rośliny te zostały przekazane do hodowli jako materiały wyjściowe z genami półkarłowatości (*Rht1*, *Rht2*, *Rht8*) oraz o podwyższonej odporności na rdzę brunatną - z genem *Lr19* i *Lr50*. Linie te były także charakteryzowane pod kątem odporności oraz wysokości w doświadczeniach porównawczych w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin w Dłoni. Prowadzone eksperymenty miały zarówno aspekt badań podstawowych, jak i znalazły zastosowanie w usprawnieniu i przyspieszeniu cyklu hodowlanego pszenicy. Cel ten osiągnięto dzięki połączeniu tradycyjnego krzyżowania oraz technik biotechnologicznych, takich jak kultury *in vitro*, selekcja wsparta markerami molekularnymi, czy badania jakościowe pszenicy, a otrzymane wyniki opisano w monografii (zał.4, pkt.II/1, poz.1). Ponadto materiał roślinny pozyskany w projekcie wykorzystywałam do analiz w kierunku optymalizacji androgenezy oraz badań nad wpływem zearalenonu na kultury pylnikowe odmian i mieszańców ozimych pszenicy (zał.4, pkt.I, poz.5).

Dzięki współpracy z prof. dr hab. Juliuszem Pernakiem z Instytutu Technologii i Inżynierii Technicznej Politechniki Poznańskiej, który zsyntetyzował i udostępnił ciecze jonowe III generacji, możliwa była analiza wpływu tych związków na kultury pylnikowe. Trzyletnie badania wskazują na indukujący wpływ cieczy jonowych na androgenezę nie tylko w materiałach embriogennych, ale także opornych genotypowo (zał.4, pkt.I, poz.6). Prowadzone pod moim kierunkiem merytorycznym analizy dotyczące wydajnej indukcji embriogenezy mikrospor oraz regeneracji roślin zielonych zostały opisane i zamieszczone w formie zbioru oryginalnych publikacji naukowych stanowiących osiągnięcie, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy (zał.4, pkt.I, poz.1-6).

Poza głównym nurtem moich zainteresowań badawczych, które dotyczą androgenezy pszenicy, prowadzę badania nad podobieństwem oraz zróżnicowaniem genetycznym z wykorzystaniem losowych oraz specyficznych markerów molekularnych. Badania te dotyczą wielu gatunków roślin uprawnych. W ramach dotacji MRiRW pt. „Haploidyżacja żyta – diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji i regeneracji roślin w warunkach *in vitro*” analizuję podobieństwo genetyczne pomiędzy materiałem roślinnym otrzymanym w spółkach hodowlanych i przeznaczonym do androgenezy. W ramach tego projektu badana jest także ekspresja genów wpływających na efektywność embriogenezy mikrospor. Wyniki analiz molekularnych są korelowane z efektywnością tworzenia struktur embriogenicznych oraz wydajnością regeneracji roślin w kulturach izolowanych mikrospor oraz kulturach pylnikowych żyta.

Podobnym zagadnieniem, ale w kontekście hodowli heterozyjnej kukurydzy, zajmowałam się realizując grant „Zastosowanie metod biotechnologicznych do zwiększenia postępu genetycznego w hodowli heterozyjnej kukurydzy” (projekt badawczy MRiRW). W tym projekcie podjęłam współpracę z pracownikami Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy licznym materiałem roślinnym z zastosowaniem markerów losowych oraz specyficznych, a następnie korelacja otrzymanych wyników z obserwacjami polowymi stanowiły narzędzie pomocne w wyborze komponentów rodzicielskich do hodowli heterozyjnej. W wyniku tych badań powstały oryginalne publikacje naukowe (zał.4, pkt.II/4/B, poz.4,19) oraz monografia (zał.4, pkt.II/1, poz.2).

Analizę markerów losowych typu ISSR-PCR wykonywałam także w celu identyfikacji mieszańców oddalonych z rodzaju *Brassica* oraz badań dystansu genetycznego pomiędzy wyprowadzonymi mieszańcami w kontekście poszerzania bioróżnorodności i odporności na choroby grzybowe oraz szkodniki. Analizy te stanowią zadania badawcze projektu MRiRW „Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności z pokrewnych

gatunków rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.)” których wyniki opisano w publikacji (zał.4, pkt.II/4/A, poz.2).

Prowadziłam również badania z wykorzystaniem markerów specyficznych SSR-PCR związane z występowaniem chorób powodowanych przez fuzariozy u lnu, a także określałam dystans genetyczny analizowanych genotypów tego gatunku. Prace były wykonywane w ramach współpracy z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. Brałam także udział w badaniach różnicowania genetycznego odmian lnianki siewnej (zał.4, pkt.II/4/A, poz.8) oraz koniczyny (zał.4, pkt.II/4/B, poz.22).

Istotną część mojego dorobku stanowią prace związane z introdukcją oraz identyfikacją genów ważnych cech użytkowych z wykorzystaniem funkcjonalnych markerów molekularnych. Jednym z najważniejszych kierunków tych badań jest analiza odpornościowa roślin. Poszukiwanie oraz wprowadzanie genów warunkujących odporność na patogeny stanowi jeden z głównych kierunków współczesnej hodowli. Piramidyzacja genów odporności w materiałach hodowlanych pozwala na polepszenie zdrowotności roślin, a ponadto jest korzystne dla środowiska, ponieważ umożliwiają zmniejszenie dawek fungicydów. Narzędziem stosowanym w realizowaniu tego celu są markery molekularne, których walidacja i zastosowanie umożliwiają efektywną selekcję genotypów o podwyższonej odporności. Tematyką odporności na patogeny grzybowe zajęłam się dzięki udziałowi we wspomnianym powyżej grantie NCBiR. Spośród wielu analizowanych w tym projekcie markerów najbardziej skutecznym do potwierdzenia obecności genu *Pm2* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego był marker *Xgwm205* (zał.4, pkt.II/4/A, poz.4; zał.4, pkt.II/4/B, poz.3,5,6,16). Badanie w kierunku obecności genów *Lr11*, *Lr13* i *Lr16*, *Lr19* oraz *Lr50* podnoszących odporność na rdzę brunatną w polskich i zagranicznych odmianach pszenicy oraz otrzymanych liniach DH, mieszańcach i liniach hodowlanych potwierdziło funkcjonalność między innymi markera *Xwmc221* oraz *GB* do identyfikacji genu *Lr19* (zał.4, pkt.II/4/A, poz.3; zał.4, pkt.II/4/B, poz.2,11,12). Ponadto jednym z zadań projektu była analiza markerów genów półkarłowatości pszenicy w kontekście problemu wylegania roślin. Wysokość pszenicy jest cechą ilościową warunkowaną przez ponad 20 genów, ale w programach hodowlanych najczęściej są wykorzystywane trzy z nich: *Rht-B1*, *Rht-D1*, *Rht8*, które były badane przez nasz zespół (zał.4, pkt.II/1, poz.1; zał.4, pkt.II/4/B, poz.7,10,20). Geny *Rht-B1*, *Rht-D1* powodują skrócenie źdźbła o 16%, natomiast gen *Rht8* wpływa na redukcję wysokości o 10%. Kumulacja tych genów w nowych odmianach stanowi ważny kierunek hodowli pszenicy. Współpraca w ramach konsorcjum zawiązanego z Instytutem Genetyki Roślin oraz spółkami hodowlanymi: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Grupa IHAR, Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. przyczyniła się do powstania wspólnej monografii, dotyczącej wyżej opisanej problematyki badawczej (zał.4, pkt.II/1, poz.1).

Od 2018 roku jestem wykonawcą w projekcie MRiRW „Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi”, który jest realizowany we współpracy z Zespołem Struktury i Funkcji Genów Zakładu Genomiki Instytutu Genetyki Roślin w Poznaniu, kierowanym przez prof. dr hab. Bogdana Wolko. W tym grantie zajmuję się identyfikacją układów allelicznych genów odpowiedzialnych za cechy fotoneutralności i wczesności kwitnienia. Korzystny układ alleliczny genów wczesności i determinacji pędu (*E2*, *E3*, *E4*, *E7*, *Dt1*, *Dt2*) w odmianach soi (w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin zgromadzono ponad 600 genotypów tej rośliny) przyczyni się do wyhodowania odmian plonujących w warunkach klimatycznych Polski.

5.3. Perspektywy dalszych badań

Dzięki stażowi zagranicznemu finansowanemu w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa, Projekt nr 005/RID/2018/19 pn. „Wielkopolska Regionalna Inicjatywa Doskonałości w obszarze nauk o życiu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” (załącznik

4, pkt.11, poz.1), który odbyłam w Centrum Genomiki Strukturalnej i Funkcjonalnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Czeskiej Akademii Nauk nawiązałam kontakt z zespołem uznanego w świecie eksperta w dziedzinie (epi)genetyki roślin modelowych i uprawnych dr hab. Aleša Pečinki. W ramach stażu zapoznałam się z najnowszymi technikami biologii molekularnej, cytogenetyki i epigenetyki, co znacznie wzbogaciło mój warsztat badawczy i otworzyło możliwość realizacji nowych wyzwań związanych z analizą genetyczną oraz epigenetyczną roślin. Zdobytą wiedzę chcę wykorzystać między innymi w badaniach nad molekularnymi aspektami embriogenezy mikrospor. Badania te będą prowadzone dzięki współpracy z ww. instytutem oraz z zespołem prof. dr hab. Iwony Žur z Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej (projekt MRiRW) pt. „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”, który zyskał pozytywne recenzje i będzie realizowany w latach 2021-2027.

Ponadto chcę dalej kontynuować badania dotyczące analizy molekularnej układów allelicznych genów wczesności oraz determinacji pędu soi. Dodatkowo planowana jest identyfikacja markerów funkcjonalnych związanych z cechami jakościowymi nasion oraz analiza markerów genów wpływających na potencjał plonowania tego gatunku.

Będę także kontynuowała badania związane z identyfikacją markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*). W tym celu zostaną wykorzystane zaawansowane techniki molekularne, jak sekwencjonowanie GBS (ang. Genotyping by sequencing), czy mapowanie asocjacyjne GWAS (ang. genome-wide association studies).

Planuję także pogłębianie problematyki dotyczącej predykcji efektu heterozji u kukurydzy z zastosowaniem techniki DArTseq w połączeniu z fenotypowaniem, a także poszukiwanie markerów DArTseq związanych z genami odporności na fuzarium.

Wszystkie powyższe plany będą realizowane w ramach przyznanych już i przewidzianych do finansowania przez MRiRW dotacji na rzecz postępu biologicznego - transza na lata 2021-2027, w których będę wykonawcą (Załącznik 4, poz. 9).

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

Osiągnięcia dydaktyczne

Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego i promotora pomocniczego:

1. Promotor pomocniczy dr inż. Bogusławy Ługowskiej (obrona pracy doktorskiej maj 2018 r.) pt.: „Efektywność hodowli pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) opartej na liniach podwojonych haploidów”.
2. Promotor pomocniczy dr inż. Angeliki Kiel (obrona pracy doktorskiej kwiecień 2019 r.) pt.: „Identyfikacja markerów molekularnych funkcjonalnych do genów odporności na choroby grzybowe pszenicy (*Triticum aestivum* L.) przydatnych do selekcji linii podwojonych haploidów otrzymanych na drodze androgenezy”.

Opracowanie programu przedmiotów i ich realizacja w języku angielskim:

- General Genetic - studia anglojęzyczne dla studentów programu Erasmus
- Molecular biology - studia anglojęzyczne, stacjonarne II stopnia dla studentów specjalizacji Seed Science and Technology, wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu (obecnie Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii)

- Application of Biotechnology in Plant Breeding - studia anglojęzyczne, stacjonarne II stopnia dla studentów Biotechnology na wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii)
- opracowanie programu przedmiotu Molecular Plant Breeding (Molekularna Hodowla Roślin) Agronomy, studia II stopnia – realizacja od 2021 r.

Opracowanie programu przedmiotów i ich realizacja w języku polskim:

- Genetyka - Biotechnologia studia stacjonarne I stopnia
- Embriologia roślin kwiatowych – Biotechnologia studia stacjonarne II stopnia
- Genetyka - Rolnictwo studia stacjonarne i niestacjonarne I stopnia
- Agrobiotechnologia - Rolnictwo studia stacjonarne i niestacjonarne II stopnia
- Genetyka molekularna – Rolnictwo studia stacjonarna II stopnia
- Inżynieria genetyczna – Rolnictwo studia stacjonarne II stopnia
- Genetyka i hodowla roślin – Ogrodnictwo studia stacjonarne I stopnia

Opieka naukowa nad studentami w toku specjalizacji

Promotorstwo prac dyplomowych magisterskich w j. angielskim:

1. Jie Siyuan 2015/16. Analysis of factors affecting the ability to spring wheat androgenesis.
2. Wenting Liang 2020/21. Effect of demethylation agents on microspore embryogenesis of wheat (*Triticum aestivum* L.)
3. Byamungu Desire 2020/21. Effect of trichostatin A on the efficiency of microspore embryogenesis in wheat.

Promotorstwo prac dyplomowych magisterskich w j. polskim:

1. Michał Springer 2009/10. Analiza morfologiczna i embriologiczna mutantów kwiatostanu lucerny (*Medicago sativa* L.sl.) w aspekcie wiązania nasion.
2. Katarzyna Nijak 2010/11. Regeneracja roślin w kulturach pylnikowych pszenicy jarej odpornej na fuzarium.
3. Marta Stefańska 2010/11. Analiza podobieństwa genetycznego form rodzicielskich żyta i pierwszego pokolenia mieszańcowego przy zastosowaniu markerów RAPD-PCR.
4. Angelika Kiel2-12/13. Badanie zdolności do androgenyzy genotypów pszenicy jarej o wypełnionym i pustym rdzeniu.
5. Karolina Dybalska 2013/14. Badanie efektywności otrzymywania roślin haploidalnych z mieszańców pszenicy ozimej.
6. Zuzanna Gogolewska 2013/14. Otrzymywanie linii podwojonych haploidów pszenicy ozimej o podwyższonej odporności na rdzę brunatną.
7. Adrian Babski 2013/14. Identyfikacja genu półkarłowatości *Rht 1* u różnych form pszenicy zwyczajnej.
8. Karpińska Martyna 2014/15. Identyfikacja genu *Lr 19* warunkującego odporność na rdzę brunatną w mieszańcach pszenicy zwyczajnej.
9. Zawieja Agnieszka 2014/15. Badanie zdolności do androgenyzy w kulturze pylnikowej mieszańców pszenicy zwyczajnej o podwyższonej odporności na rdzę brunatną.
10. Kamila Greczyn 2015/16. Ocena zdolności do androgenyzy mieszańców pszenicy jarej z genem *Lr19*.
11. Rafał Nowak 2015/16. Wykorzystanie markerów genu *Lr19* w hodowli pszenicy odpornej na rdzę brunatną.

12. Marika Napierała 2015/16. Badanie polimorfizmu DNA Inu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) z zastosowaniem markerów molekularnych.
13. Przemysław Olejnik 2015/16. Analiza zdolności do androgenezy w kulturach pylnikowych półkarłowatych mieszańców pszenicy.
14. Weronika Speier 2015/16. Badanie efektywności androgenezy mieszańców pszenicy zwyczajnej o podwyższonej odporności na rdzę brunatną.
15. Karolina Nowacka 2017/18. Oddziaływanie epibrassinolidu na indukcję androgenezy pszenicy jarej.
16. Aleksandra Sobiech 2019/2020. Indukcja embriogenezy mikrospor w kulturach pylnikowych pszenicy.
17. Marcin Woźniak 2020/21. Walidacja oraz identyfikacja markerów molekularnych genów wczesności i determinacji pędu w kolekcji odmian soi.

Promotorstwo prac dyplomowych inżynierskich:

1. Jędrzej Wiórek 2010/11. Ocena możliwości wykorzystania mieszańców oddalonych żyta w hodowli roślin.
2. Siwiak Błażej 2010/11. Wykorzystanie mutacji w hodowli lucerny.
3. Jędrzej Smentek 2011/12. Projekt wykorzystania markerów specyficznych do identyfikacji genów pszenicy. Praca inżynierska realizowana na kierunku Biotechnologia.
4. Adrian Babski 2012/13. Wykorzystanie linii podwojonych haploidów w hodowli pszenicy.
5. Anna Maćkowiak 2013/14. Ocena możliwości wykorzystania markerów specyficznych w hodowli pszenicy.
6. Aleksandra Mazur 2013/14. Ocena możliwości wykorzystania markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności na mączniaka prawdziwego pszenicy.
7. Dobrosława Michalska 2013/14. Ocena możliwości wykorzystania markerów specyficznych do identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną pszenicy.
8. Ewa Rafińska 2013/14. Projekt wykorzystania linii podwojonych haploidów w hodowli pszenicy.
9. Nowak Rafał 2014/15. Analiza czynników wpływających na efektywność otrzymywania linii podwojonych haploidów pszenicy (*Triticum aestivum* L.).
10. Napierała Marika 2014/15. Ocena możliwości wykorzystania metod 18. biotechnologicznych w hodowli odpornościowej pszenicy.
11. Nycz Patrycja 2014/15. Ocena możliwości wykorzystania markerów specyficznych do identyfikacji genów półkarłowatości u pszenicy.
12. Olga Jankowska 2015/16. Ocena możliwości introdukcji genów odporności na rdzę brunatną do odmian uprawnych pszenicy zwyczajnej.
13. Katarzyna Kociszewska 2015/16. Projekt zastosowania metod biotechnologicznych w hodowli odpornościowej pszenicy.
14. Konrad Pakuła 2016/17. Projekt wykorzystania markerów molekularnych w selekcji genotypów pszenicy o ważnych cechach użytkowych.
15. Karolina Nowacka 2016/17. Analiza możliwości wykorzystania genów półkarłowatości w hodowli pszenicy.
16. Dawid Karliński 2016/17. Ocena możliwości hodowli i uprawy lucerny w Polsce.
17. Monika Mariańska 2017/18. Projekt zastosowania markerów molekularnych w hodowli rzepaku.
18. Magdalena Magaj 2017/18. Ocena możliwości wykorzystania nowych związków aktywnych biologicznie w kulturach pylnikowych pszenicy.
19. Marcin Woźniak 2018/19. Projekt wykorzystania markerów molekularnych w hodowli twórczej żyta.

20. Aleksandra Noweiska 2018/19. Ocena zmienności genetycznej w liniach podwojonych haploidów pszenicy.
21. Patrycja Łowicka 2018/19. Projekt wykorzystania podwojonych haploidów w hodowli twórczej pszenicy.
22. Sylwia Hanyżewska 2019/20. Projekt wykorzystania linii podwojonych haploidów w hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.)
23. Kamila Rogacka 2020/21. Identyfikacja układów allelicznych genów wczesności i determinacji pędu u soi.
24. Magdalena Bigos. 2020/21. Projekt zastosowania markerów DNA w hodowli nowych odmian rzepaku.
25. Michał Zielaskowski 2020/21. Ocena możliwości zwiększenia zróżnicowania genetycznego roślin uprawnych na przykładzie żyta (*Secale cereale* L.).

Recenzowanie prac dyplomowych magisterskich:

1. Nowaczyk Mateusz 2016/17. Identyfikacja genów odporności na porażenie przez grzyby *Oculimacula yallundae* i *O. acuformis* powodujące łamliwość podstawy źdźbła w liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.).
2. Malwina Wegner 2017/18. Projekt wykorzystania zarodkowych kultur *in vitro* (embryo rescue) w hodowli odpornościowej rzepaku.
3. Stanisław Gawroński – Otrzymywanie mieszańców *Brassica* o podwyższonej odporności na inwazję śmietki kapuścianej (*Delia radicum* L.).
4. Agnieszka Taberska 2018/19. Przeniesienie odporności na kiłę kapusty z gatunków odpornych rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.).
5. Izabela Solińska 2018/19. Porównanie metod otrzymywania haploidów u wybranych odmian rzepaku z podwyższoną odpornością na suchą zgniliznę kapustnych.
6. Paulina Musiał 2018/19. Wpływ czynników abiotycznych na indukcję embriogenezy mikrospor u wybranych odmian rzepaku (*Brassica napus* L.).

Recenzowanie prac dyplomowych inżynierskich:

1. Aleksandra Piechota 2012/13. Ocena metod selekcji w hodowli odpornościowej pszenicy (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*).
2. Angelika Olesińska 2015/16. Analiza markerów molekularnych służących do mapowania i identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną u pszenicy (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*).
3. Aleksandra Sommerfeld 2015/16. Znaczenie markerów molekularnych w hodowli odpornościowej pszenicy (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*).
4. Krzysztof Wojtkowiak - Badanie podobieństwa genetycznego genotypów kukurydzy przy użyciu markerów RAPD w celu charakterystyki komponentów rodzicielskich będących źródłami odporności na choroby grzybowe.
5. Bernadette Ryńska 2016/17. Projekt otrzymania resyntetyzowanego rzepaku o podwyższonej odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiphora brassicae*).
6. Martyna Kozanecka 2019/20. Identyfikacja genów wczesności kwitnienia dla wybranych genotypów soi z wykorzystaniem markerów molekularnych.
7. Julia Spychała 2018/19. Wykorzystanie narzędzi molekularnych w hodowli rzepaku odpornego na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae* spp.).
8. Barbara Górka 2018/10. Zastosowanie krzyżowania oddalonego oraz zarodkowych kultur *in vitro* w celu zwiększenia efektywności otrzymywania roślin mieszańcowych z podwyższoną odpornością na mączniaka rzekomego u rzepaku.
9. Aleksandra Sobiech 2018/19. Analiza zróżnicowania genetycznego rzepaku (*Brassica napus* L.) przy użyciu markerów SSR.

Inne osiągnięcia dydaktyczne:

1. Nadzór merytoryczny i opieka nad studentami kierunku Biotechnologia podczas czterotygodniowej praktyki studenckiej na studiach pierwszego stopnia (od 2012 r. do teraz - praktyka odbywa się każdego roku w okresie wakacyjnym).

Osiągnięcia popularyzujące naukę

Czynny udział w organizacji i prowadzeniu wykładów i ćwiczeń w ramach projektów Unijnych:

1. Projekt „Najlepsi z natury!” - Zintegrowany Program Rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” POWR.03.05.00-00-z228/17, współfinansowany ze środków Unii Europejskiej – wykładowca na studiach anglojęzycznych.
2. Projekt „Przyroda od A do Z. Pozaszkolne zajęcia edukacyjne w ramach Uniwersytetu Młodych Przyrodników”, POWR.03.01.00-00-U134/17, realizowany w ramach POWER, Oś Priorytetowa III - Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju. Działanie 3.1 Kompetencje w szkolnictwie wyższym, na podstawie umowy nr UDAPOWR.03.01.00-00-U100/17-00 zawartej z Instytucją Pośredniczącą w dniu 14.08.2018r., współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – wykładowca na wykładach i ćwiczeniach dla dzieci ze szkół podstawowych.
3. Projekt „Europejska Noc Naukowców” realizowany w ramach Programu Ramowego Unii Europejskiej HORIZON 2020 – czynne uczestnictwo w zajęciach laboratoryjnych w edycjach: EPICNIGHT 25 wrzesień 2015 r., EVERYDAYNIGHT 30 wrzesień 2016 r., EVERYDAYNIGHT 29 września 2017 r., UNIGHTED 28 września 2018 r. UNIGHTED 27 września 2018 r.

Inne osiągnięcia popularyzujące naukę

1. Udział w XX, XXI i XXII Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki – prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla zwiedzających Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, w dniach: 23-26.04. 2017 r., 22-26.04. 2018 r., 8-11.04. 2019 r.
2. Udział w organizacji tzw. „Wagarów z Przyrodą” na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla młodzieży licealnej w dniach 21.03.2017 r. oraz 21.03.2018 r.
3. Promowanie Uniwersytetu Przyrodniczego i Katedry Genetyki i Hodowli Roślin na Międzynarodowej Wystawie Agro Show w Bednarach „Dla rolnika dla natury” w 2013, 2014 i 2015 r.

Osiągnięcia organizacyjne

Działalność organizacyjna na rzecz uczelni:

1. Pełnomocnik Dziekana ds. Praktyk na kierunku Biotechnologia, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii (obecnie Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii) - funkcja sprawowana nieprzerwanie od roku 2011 do teraz.
2. Członek rady wydziału od 2015 do 2019 r.
3. Członek stałych komisji wydziałowych - Komisja ds. Nagród dla pracowników niebędących nauczycielami akademickimi na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii w latach 2012 – 2016.
2. Członek Zespołu ds. Jakości Kształcenia na kierunku Rolnictwo, na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii 2012- 2016
3. Członek Komisji ds. Jakości Kształcenia na kierunku Biotechnologia, na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii 2016 do teraz

4. Członek ZNP na UP w Poznaniu od roku 2007. Reprezentowanie Związków Zawodowych w pracach Komisji Oceniającej na Wydziale Leśnym w 2015 roku.
6. Wielokrotne uczestnictwo w pracach komisji konkursowej na stanowisku asystenta w roli członka komisji.
7. Członek Rady Katedry Genetyki i Hodowli Roślin w latach: 2009 -2013, 2013-2017 oraz od 2017 (kadencja 2017-2021).

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

1. Nagroda zespołowa III stopnia za działalność naukową - 2017 rok.
2. Nagroda zespołowa II stopnia za działalność organizacyjną zwłaszcza w pracach komisji wydziałowych, wdrażanie nowych regulacji w uczelni 2016 r.
3. Nagroda zespołowa III stopnia za działalność organizacyjną w 2018 r.
4. Nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia organizacyjne znacząco wpływające na poprawę jakości procesu dydaktycznego oraz prowadzonych badań naukowych w 2019 r.

Odbyte staże naukowe:

1. Staż zagraniczny w Centrum Genomiki Strukturalnej i Funkcjonalnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Czeskiej Akademii Nauk w zespole badawczym dr hab. Aleša Pečinki finansowany w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa, projekt nr 005/RID/2018/19 „Wielkopolska Regionalna Inicjatywa Doskonałości w obszarze nauk o życiu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu”. Tematyka stażu: badania genetyczne i epigenetyczne roślin modelowych i uprawnych. Termin: 01-03.2020 r.
2. Staż naukowy w Zakładzie Botaniki Ogólnej na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu pod nadzorem merytorycznym prof. dr hab. Rafała Mola. Problematyka badawcza stażu: Badanie przyczyn niskiej efektywności wiązania nasion u lucerny siewnej. Termin: 8.02.2016 - 30.09.2016 r.
3. Staż naukowy „Bio-Tech Transfer. Staże i szkolenia biotechnologiczne w Inno-Gene S.A.” finansowany w ramach projektu UE, Europejskiego Funduszu Społecznego nr POKL.08.02.01-30-006/11. Termin: 03-14.09.2012 r.

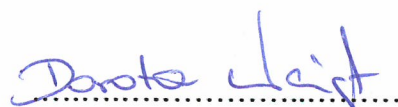
Odbyte szkolenia:

1. Szkolenie „Ochrona własności intelektualnej w Polsce, UE i USA – krok po kroku do uzyskania patentu.” Organizator – Akademia Morska w Szczecinie. Międzyzdroje 29-31.08.2011.
2. Szkolenie „Granty dla młodych doktorów”. Organizowany przez: Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Ramowych Unii Europejskiej, Punkt Kontaktowy RP przy Uniwersytecie Ekonomicznym w Poznaniu. 15.09.2011.
3. Warsztaty poświęcone automatyzacji procesu izolacji DNA/RNA z materiału biologicznego w oparciu o system TECAN/LGC Genomics. Organizowany przez TKBiotech. Poznań 27.06.2012.
4. Szkolenie „Jak skutecznie pisać publikacje naukowe” Organizowane w ramach konferencji Bioinnovation International Summit 2012 na Międzyuczelnym Wydziale Biotechnologii UG-GUMeD w Gdańsku. 21.10.2012.

5. Szkolenie dotyczące korzystania z baz Scopus i ScienceDirect na platformie SciVerse w dniu 11.12.2012 roku w Bibliotece Głównej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
6. Workshop on "Plant genomics resources and phenotypic data standardisation". Organized by transplant consortium on 27-28 June 2013.
7. Uczestnictwo w seminarium naukowym poświęconym tematyce: Odwrotna transkrypcja i Real-Time PCR – technika, źródła najczęstszych problemów i ich rozwiązania. Klonowanie molekularne – optymalizacja techniki. Poznań, 24.04. 2015.
8. Uczestnictwo w seminarium naukowym poświęconym tematyce interferencji RNA oraz techniki CRISPR/Cas9: Fundamentals of CRISPR-Cas9 Gene Editing. A comparison of RNAi and gene editing. Considerations for a CRISPR-Cas9 experiment. Poznań, 13.10.2016.
9. Szkolenie w dziedzinie pierwszej pomocy przedmedycznej organizowane przez Poznańskie Centrum Kształcenia Zawodowego. Poznań, 2017.
10. Kurs "Analiza ekspresji genów w pojedynczych komórkach" organizowany przez MBS – Szkolenia, Konferencje, Usługi Sp. z o.o. w Warszawie, 14 – 15 czerwca 2019 r.
11. Kurs „Metylacja genów” organizowany przez MBS – Szkolenia, Konferencje, Usługi Sp. z o.o. w Warszawie, – Szkolenia, Konferencje, Usługi Sp. z o.o. w Warszawie (szkolenie odbyło się 13 – 14 grudnia 2019 r.

Zbiornicze zestawienie dorobku naukowego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje **41** oryginalnych prac twórczych w tym **26** w języku kongresowym i **13** w czasopiśmie ze współczynnikiem wpływu IF oraz **2** współautorstwa w monografii, a także **49** streszczeń i posterów prezentowanych na konferencjach naukowych, w tym **5** wygłoszonych przeze mnie referatów konferencyjnych. Łączna suma uzyskanych punktów zgodnie z punktacją czasopism MNiSW w roku wydania, z uwzględnieniem osiągnięcia naukowego, wynosi **1052** punkty, a sumaryczny IF moich publikacji według listy Journal Citation RePorts (JCR) w roku wydania wynosi **25,786**. Szczegółowe zestawienie zamieszczono w załączniku 4.


.....
(podpis wnioskodawcy)