

Dr inż. Agnieszka Niedziela

**Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy,
Radzików, 05-870 Błonie**

Załącznik 4

AUTOREFERAT

SPIS TREŚCI

A. Dane osobowe	2
B. Przebieg kariery naukowej	2
C. Przebieg pracy zawodowej	3
D. Wskazanie i opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
1. Tytuł osiągnięcia naukowego.	4
2. Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe.	4
3. Syntetyczne omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania.	6
E. Omówienie pozostałej tematyki badawczej, główne kierunki i ważniejsze wyniki	21
F. Zestawienie najważniejszych osiągnięć naukowych.....	26
1. Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora	26
2. Wskaźniki bibliometryczne	27
3. Omówienie pozostałych osiągnięć w pracy naukowej	28

A. DANE OSOBOWE

Imię/imiona i nazwisko: Agnieszka Katarzyna Niedziela

Poprzednie nazwisko: Fiuk (od 2001 r. do 2010 r.)

Data i miejsce urodzenia: 24 września 1975 r., Iłża

Stopień naukowy: doktor inżynier

Miejsce zatrudnienia: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy Radzików, 05-870 Błonie, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Pracownia Markerów Molekularnych

B. PRZEBIEG KARIERY NAUKOWEJ**Studia wyższe:**

1995-2000 Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Studia ukończone z wynikiem bardzo dobrym i tytułem magistra inżyniera ogrodnictwa.

Praca magisterska pt. „Charakterystyka transgenicznych roślin pomidora pokolenia T2 z wprowadzonymi genami fosfotransferazy neomycyny oraz taumatyny II.” realizowana w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin pod opieką dr hab. Grzegorza Bartoszewskiego.

Doktorat:

2001-2005 Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie. Rozprawa doktorska pt. „Zdolności morfogenetyczne wielo- i jednokomórkowych eksplantatów goryczek” realizowana w Pracowni Biotechnologii Roślin pod opieką prof. dr hab. Jana J. Rybczyńskiego (Rec.: prof. dr hab. Ewa Kępczyńska, prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Szczytt)

Obrona pracy doktorskiej 21 grudnia 2005 roku z wyróżnieniem przed Radą Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Data nadania stopnia doktora: 11 stycznia 2006 r.

Inne formy edukacji:Udział w szkoleniach i warsztatach naukowych:

1. „Application of molecular markers in studies on plants.” Warszawa, 25-29 września 2002 r.
2. „Application of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses.” Centrum Doskonałości w Agrobiologii i Genetyce Molekularnej Roślin PAGEN. Poznań, 31 marca - 2 kwietnia 2003 r.

3. „Diagnostyka molekularna i cytogenetyczna w hodowli roślin.” Centrum Doskonałości w Agrobiologii i Genetyce Molekularnej Roślin PAGEN. Poznań, 27-30 kwietnia 2004 r.
4. „Plant genome mapping and search for markers linked to agricultural traits.” Centrum Doskonałości w Agrobiologii i Genetyce Molekularnej Roślin PAGEN. Poznań, 18 października 2004 r.
5. „Rośliny alternatywne dla zrównoważonego rolnictwa.” Centrum Doskonałości w Agrobiologii i Genetyce Molekularnej Roślin PAGEN. Poznań, 7-8 września 2005 r.
6. „Podstawy filogenetyki molekularnej.” MSB - Serwis dla Biologii Molekularnej. Warszawa, 22-24 czerwca 2006 r.
7. „Planowanie i wnioskowanie statystyczne w badaniach rolniczych.” IHAR-PIB. Radzików, 20-22 listopada 2007 r.
8. „Statystyczne modelowanie danych bioinformatycznych.” Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu & Europejski Fundusz Społeczny. Wrocław, 25-29 czerwca 2012 r.
9. „System R oraz zastosowanie R w genetyce populacyjnej.” QuantUp. Radzików, 30-31 sierpnia 2012 r.

C. PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ

2001- 2007 Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie, Pracownia Biotechnologii Roślin; stanowiska - inżynier stażysta (2001), biolog (2001), asystent (2001 - 2006), adiunkt (2006 - 2007)

2007 - aktualnie Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin Pracownia Markerów Molekularnych; stanowisko - adiunkt (2007 - aktualnie)

(2011 r. urlop macierzyński - 6 miesięcy)

(2016/2017 r. urlop macierzyński i rodzicielski - 9 miesięcy)

D. WSKAZANIE I OPIS OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Cykl pięciu jednotematycznych publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

Identyfikacja markerów molekularnych do oceny tolerancyjności materiałów hodowlanych pszenżyta (x *Triticosecale* Wittmack) na toksyczne działanie jonów glinu.

2. PUBLIKACJE STANOWIĄCE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

P1). Niedziela A., Orłowska R., Machczyńska J., Bednarek P.T. (2016) The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs. SpringerPlus, 5:355.

[IF_{5-letni} = 1.195; IF₂₀₁₆ = **0.982**; MNiSW₂₀₁₆ = **25**]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu doświadczeń. Byłam odpowiedzialna za izolację DNA z liści, przygotowanie prób do analizy DArT, ocenę podobieństwa genetycznego materiału roślinnego oraz struktury badanej populacji. Współuczestniczyłam w analizach dotyczących określenia zróżnicowania genetycznego pszenżyta. Opracowałam wszystkie tabele i ryciny. Miałam dominujący udział w przygotowaniu manuskryptu w zakresie tekstu oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

P2). Niedziela A., Bednarek P.T., Cichy H., Budzianowski G., Kilian A., Anioł A. (2012) Aluminum tolerance association mapping in triticale. BMC Genomics, 13:67.

[IF_{5-letni} = 3.938; IF₂₀₁₂ = **4.397**; MNiSW₂₀₁₅ = **35**]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń oraz wykonaniu większości analiz molekularnych (z wyjątkiem analizy DArT). Byłam odpowiedzialna za określenie fenotypu materiału roślinnego pod kątem tolerancyjności na glin, przeprowadzenie analiz PCR z wykorzystaniem technik SSR i AFLP oraz przygotowanie prób do analizy DArT. Brałam udział w mapowaniu asocjacyjnym oraz identyfikacji markerów asocjowanych z tolerancyjnością na glin. Przygotowałam wszystkie tabele i ryciny, miałam dominujący udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

P3). Niedziela A., Bednarek P.T., Labudda M., Mańkowski D.R., Anioł A. (2014/ Online 13 listopada 2013) Genetic mapping of a 7R Al tolerance QTL in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *Journal of Applied Genetics*, 55/1: 1-14.

[IF_{5-letni} = 1.743; IF₂₀₁₃ (First Online: 13 Nov 2013) = **1.902**; MNiSW₂₀₁₃ = **20**]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń oraz uzyskaniu danych fenotypowych i genotypowych dla dwóch populacji mapujących F2. Byłam odpowiedzialna za izolację genomowego DNA z liści oraz przeprowadzenie analiz PCR z wykorzystaniem starterów SSR, AFLP oraz starterów PCR specyficznych do genów ALMT (wraz z doбором warunków reakcji). Przygotowałam materiał do analiz DArT oraz analiz biochemicznych (detekcja kwasu jabłkowego i cytrynowego). Miałam znaczący udział opracowaniu map genetycznych oraz identyfikacji QTLi badanej cechy. Przygotowałam wszystkie tabele i ryciny, uczestniczyłam w opracowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

P4). Niedziela A., Mańkowski D., Bednarek P.T. (2015) Diversity Arrays Technology-based PCR markers for marker assisted selection of aluminum tolerance in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *Molecular Breeding*, 35:209.

[IF_{5-letni} = 2.235; IF₂₀₁₅ = **2.108**; MNiSW₂₀₁₅ = **35**]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń wykonaniu wszystkich analiz molekularnych. Na podstawie wyników analiz statystycznych zaproponowałam markery do selekcji linii pszenżyta tolerancyjnych na glin. Określiłam lokalizację chromosomową loci powielanych przez markery DArT w oparciu o populacje mapujące F2 wykonując mapowanie genetyczne. Przygotowałam wszystkie tabele i ryciny. Miałam dominujący udział w przygotowaniu tekstu publikacji oraz odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

P5). Niedziela A. (2018) The influence of Al³⁺ on DNA methylation and sequence changes in the triticale (x *Triticosecale* Wittmack) genome. *Journal of Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0459-0>.

[IF_{5-letni} = 1.743; IF₂₀₁₇ = **1.756**; MNiSW₂₀₁₇ = **20**]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń oraz wykonaniu analiz. Jestem odpowiedzialna za opracowanie i interpretację uzyskanych wyników oraz, jako autor korespondencyjny, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzje i ostateczną redakcję manuskryptu po recenzjach. Mój udział procentowy wynosi 100%.

Sumaryczny IF 5-letni dla przedstawionego osiągnięcia: **10.854**

Sumaryczny IF według roku opublikowania: **11.145**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **135**

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac stanowiących powyższe osiągnięcie naukowe znajdują się w załączniku nr 8.

3. SYNTETYCZNE OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH WYKORZYSTANIA

Wprowadzenie

Pszenżyto (*x Triticosecale* Wittm. ex A.Camus) to międzyrodzajowy mieszaniec powstały w wyniku skrzyżowania pszenicy (*Triticum durum*, $2n=28=AABB$ lub *Triticum aestivum* L., $2n=42=AABBDD$), będącej komponentem żeńskim i żyta (*Secale cereale* L., $2n=14=RR$) stanowiącego źródło pyłku [1]. Pierwsze otrzymane i badane formy pszenżyta były oktoploidami ($2n=56=AABBDDRR$), natomiast obecnie większość uprawianych na świecie i wszystkie odmiany krajowe to heksaploidy ($2n=42=AABBRR$).

Hodowla pszenżyta w Polsce ma długoletnią tradycję zapoczątkowaną w latach 60-tych ubiegłego stulecia przez prof. Tadeusza Wolskiego. Jej efektem było zarejestrowanie w 1982 roku pierwszej krajowej odmiany Lasko. Aktualnie (stan na 28.08.2018 r.) w Krajowym Rejestrze znajdują się 62 odmiany pszenżyta (13 jarych i 49 ozimych) [2], z czego 54 pochodzi z dwóch specjalizujących się w hodowli tego gatunku spółek: Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR (25 odmian) oraz DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. (29 odmian).

Od wielu lat Polska jest największym producentem pszenżyta na świecie. Według ostatnich danych [3] powierzchnia uprawy tego gatunku wynosi 1,3 mln ha, co stanowi 17,1% całkowitej powierzchni zasiewów zbóż. Pszenżyto traktowane jest głównie jako roślina paszowa, jednakże badania prowadzone w ostatnich latach potwierdzają szerokie możliwości wykorzystania tego zboża również do celów piekarniczych [4] czy w produkcji biopaliw [5]. Gatunek ten charakteryzuje się wysokim potencjałem plonowania, dobrą zdrowotnością i wartością pokarmową ziarna [4]. Ograniczenie jego uprawy mogą stanowić zakwaszone gleby, które negatywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin [6]. Szacuje się, że w Polsce ponad 50% gleb użytkowanych rolniczo ma odczyn pH poniżej 5,0 [7]. Przyczyną zakwaszenia mogą być naturalne warunki glebowo-klimatyczne sprzyjające wymywaniu wapnia i magnezu z gleby, zanieczyszczenia przemysłowe i komunikacyjne, a także obserwowane w ostatnich latach zwiększenie nawożenia mineralnego [7]. Wraz ze spadkiem pH wzrasta rozpuszczalność kompleksów glinu w wodzie, a co za tym idzie jego toksyczność dla roślin. Pojawiają się wówczas formy kationowe $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$ i Al^{3+} , które bez przeszkód mogą być pobierane przez korzenie [8]. Najbardziej znaczącym symptomem toksyczności glinu u roślin jest zahamowanie wzrostu korzeni, a także redukcja liczby korzeni bocznych i włośników [9], czego następstwem jest spadek wielkości plonu [6].

Poznano dwa rodzaje mechanizmów, które chronią rośliny przed toksycznym działaniem jonów Al^{3+} [9, 10]. Pierwszy polega na neutralizacji kationowych postaci glinu zanim zostaną one pobrane przez korzenie (tolerancja zewnątrzkomórkowa), natomiast drugi na ich unieruchomieniu i detoksykacji wewnątrz komórek (tolerancja wewnątrzkomórkowa) [10]. Tolerancja większości gatunków roślin, w tym zbóż, wynika głównie z działania mechanizmów zewnątrzkomórkowych. Tylko nieliczne gatunki uprawne takie jak: herbata, hortensja, czy gryka zwyczajna mają zdolność akumulowania jonów Al^{3+} w wakuolach komórek liści i pędów [9, 10]. Uruchomienie mechanizmów odpowiedzi roślin na stres glinowy jest uwarunkowane zmianą aktywności szeregu genów, których ekspresja indukowana jest również pod wpływem innych stresów, zarówno abiotycznych [11] jak i biotycznych [12]. Do najczęściej identyfikowanych

należą geny kodujące między innymi: syntazę cysteinową, syntazę S-adenozylometioniny, O-metylotransferazę, oksydazę szczawianową, dehydrogenazę jabłczanową, dehydrogenazę pirogronianową, dysmutazę ponadtlenkową, s-transferazę glutationową oraz peroksydazę askorbinianową [13-16]. Jakkolwiek cecha tolerancyjności ma charakter wielogenowy [17, 18] podstawową rolę w obu wymienionych mechanizmach odgrywają specyficzne dla poszczególnych gatunków kwasy organiczne: jabłkowy, cytrynowy i szczawiowy, pełniące funkcję związków chelatujących [9]. U zbóż poznano dwie rodziny genów związane z wydzielaniem kwasów organicznych: ALMT (aluminium-activated malate transporter) odpowiedzialna za wydzielanie kwasu jabłkowego i MATE (multidrug and toxin efflux), której ekspresja związana jest z wydzielaniem kwasu cytrynowego. Geny należące do obu rodzin zidentyfikowano u żyta na chromosomie 7RS w odległości około 25cM względem siebie [19, 20]. U pszenicy transportery kwasu jabłkowego i cytrynowego kodowane są przez loci zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 4DL [21] i 4BL [22]. Udowodniono, że ważną rolę w regulacji ekspresji obu grup genów może pełnić czynnik transkrypcyjny kodowany przez gen STOP1 (sensitive to proton rhizotoxicity 1), który u żyta prawdopodobnie lokalizuje się na chromosomie 3R [20], natomiast u pszenicy na 3BL [23]. Lokalizacja genów ALMT u żyta i pszenicy wynika z syntenii fragmentów chromosomów 7R i 4D, a geny te są ortologami [24, 25]. Niewykluczone również, że lokalizacja pozostałych genów może być związana z syntenią chromosomów 7R i 4B oraz 3R i 3B [20, 26]. Identyfikowane dotychczas loci cech ilościowych (QTL ang. Quantitative Trait Loci) wykazywały duży wpływ na rozpatrywaną cechę. I tak, loci genów ScALMT i ScMATE żyta zlokalizowane na chromosomie 7RS populacji F2 tłumaczą odpowiednio 60% i 40% wartości wytłumaczonej wariancji cechy mierzonej jako średnia wartość odrostu korzeniowego po 48h od zastosowania stresu glinowego [20]. U pszenicy poziom wytłumaczonej wariancji cechy zależy od badanej populacji mapującej oraz metody pomiaru i stanowi do 56%, 51% i 49% dla loci genów zlokalizowanych odpowiednio na chromosomach 4DL, 4BL i 3BL [22, 27, 28].

Mechanizmy tolerancyjności na toksyczne stężenia jonów glinu u pszenżyta nie były dotychczas systematycznie badane. Przypuszcza się, że w przypadku tego gatunku mogą być one funkcją współdziałania genów pszenicy i żyta [29]. Nieliczne badania prowadzone na liniach addycyjnych i substytucyjnych sugerują, że wysoki stopień tolerancyjności na glin u pszenżyta heksaploidalnego może być dziedziczony poprzez genom żyta, a geny tej cechy lokalizują się na chromosomach 3R, 4R i 6R [29, 30, 31]. Jednakże słabsza odpowiedź pszenżyta na stres glinowy, niż w przypadku żyta, sugeruje supresyjny wpływ genomu pszenicznego na działanie genów warunkowanych genomem żytnim [31]. W liniach substytucyjnych wykazano korzystny wpływ chromosomów genomu D pszenicy na podniesienie tolerancji pszenżyta na glin [30]. Zwiększoną ekspresję genów zlokalizowanych na genomie D w odpowiedzi na stres glinowy udokumentowano również u pszenżyta oktoploidalnego [32].

Tolerancja stresu glinowego może mieć również podłoże epigenetyczne [33, 34]. Wskazują na to dotychczasowe badania sugerujące, że regulacja ekspresji genów podczas adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska może być zależna od mechanizmów epigenetycznych takich jak np. metylacja DNA [33]. Pojawiające się w tym procesie epiallele mogą powstawać w wyniku zmian wzorów metylacji zachodzących pod wpływem działania stresu glinowego. Zmiany te mogą być dziedziczone w kolejnych cyklach generatywnych podnosząc tym samym zdolności adaptacyjne danego genotypu [33]. W przypadku zbóż, w tym

również i pszenżyta, brak jest danych dotyczących epigenetycznych aspektów tolerancji na stres glinowy. Realizacja takich badań może mieć istotne znaczenie w zrozumieniu funkcjonowania genomu roślinnego oraz wyjaśnieniu, dlaczego niektóre cechy, mimo wieloletnich programów selekcyjnych, nie prowadzą do wytworzenia w pełni ustabilizowanych form.

Zarówno badania genetyczne jak i epigenetyczne mogą stanowić źródło markerów dla potrzeb hodowli wspartej markerami molekularnymi (MAS ang. Marker Assisted Selection). Technika MAS umożliwia szybką i wiarygodną ocenę dużej liczby osobników pod kątem obecności lub braku cechy oraz rozróżnienie homozygot od heterozygot na bardzo wczesnym etapie rozwoju. Pozwala też na uniezależnienie się od wpływu czynników środowiskowych mogących zaburzać oczekiwaną reakcję roślin w warunkach polowych, a także identyfikować osobniki z pożądanymi genami nawet w przypadku, gdy cecha jest warunkowana większą liczbą genów [35]. Zastosowanie tej techniki prowadzi do ograniczenia prac polowych oraz zmniejszenia nakładów na proces selekcji co powinno doprowadzić do skrócenia cyklu hodowli, którego długość zdaniem hodowców jest głównym czynnikiem ograniczającym postęp hodowlany [36]. Niestety, w Polsce techniki markerowe nie są szeroko stosowane ze względu na brak niezbędnej bazy oraz markerów skutecznych w selekcji polskich materiałów [36]. Niewdrożenie selekcji molekularnej może w najbliższych latach znacząco obniżyć konkurencyjność polskiej hodowli w odniesieniu do hodowli na świecie.

Na podstawie dotychczasowych badań prowadzonych u żyta i pszenicy wydaje się, że selekcja zbóż w kierunku zwiększenia tolerancji glinu z zastosowaniem markerów molekularnych jest zadaniem trudnym, ale możliwym do wykonania. U żyta wytypowano markery B1 i B4, które lokalizowały się w odległości 0.4cM od locus genu *ScALMT* i pozwalały na różnicowanie roślin tolerancyjnych i wrażliwych w testowanej populacji F2 [24]. W późniejszych pracach identyfikowano kolejne markery (RZ891, B6, B11 i B26) ściśle sprzężone z genem tolerancyjności na glin [25, 37], jednak ich przydatność w selekcji roślin tolerancyjnych nie była testowana na zróżnicowanym materiale roślinnym. U pszenicy stwierdzono występowanie dwóch form allelicznych genu *TaALMT1*: ALMT1-1w linii tolerancyjnej ET8 i ALMT1-2 w linii nietolerancyjnej ES8, będących wynikiem mutacji punktowych w obrębie sekwencji czwartego egzonu tego genu [21, 37]. Zaprojektowano startery do obszarów genomu identyfikowanych w rejonie egzonu 4 [21], intronu 3 [38] oraz regionu promotora [39], które użyto do oceny zależności genetycznych w obrębie genu *TaALMT1* u 457 form pszenic [40]. Otrzymane kombinacje alleli dzieliły badany materiał roślinny na 22 haplotypy [40]. Żaden z markerów powielanych przez zaprojektowane specyficzne startery nie był jednak ściśle skorelowany z tolerancyjnością na glin.

Nie prowadzono dotychczas badań mających na celu wytypowanie markerów tolerancyjności na glin u pszenżyta dla potrzeb MAS.

Hipoteza badawcza

Pszenżyto jest stosunkowo mało poznanym gatunkiem, którego znaczenie gospodarcze na świecie i w Polsce wciąż wzrasta. Jego hodowla w pewnym stopniu jest zagrożona brakiem form wysoce tolerancyjnych na jony glinu. Zagrożenie to nasila się wraz ze wzrostem zakwaszenia gleb, które jest skutkiem intensywnego wymywania składników zasadowych z gleby, a także działalności człowieka (stosowanie nawozów azotowych, kwaśne deszcze). Biorąc pod uwagę

pochodzenie pszenżyta, cecha ta może być wynikiem interakcji genomów żytniego i pszenicznego, w których jest warunkowana kilkoma relatywnie silnymi genami. Należy sądzić, że geny te są rozpowszechnione w materiałach polskich, co stwarza możliwość identyfikacji markerów użytecznych do MAS. Jednocześnie, wiadomo, że QTL cechy nie tłumaczą całej wartości wariancji cechy. Należy więc podjąć badania w kierunku weryfikacji hipotezy, że cecha może mieć również podłoże epigenetyczne wyrażone na poziomie metylomu.

Cel badań

Głównym celem badań było poszerzenie wiedzy dotyczącej genetycznych i epigenetycznych podstaw tolerancyjności na glin u pszenżyta oraz opracowanie markerów DNA przydatnych do masowej selekcji dla celów rolniczych. By osiągnąć zamierzone rezultaty wykorzystano nowoczesne techniki markerowania DNA oraz narzędzia statystyczne takie jak mapowanie genetyczne oraz mapowanie asocjacyjne.

Realizacja ww. celu wiązała się z potrzebą:

1. oceny zróżnicowania genetycznego oraz struktury reprezentatywnej puli genowej pszenżyta uprawianego w Polsce (P1);
2. identyfikacji loci związanych z cechą tolerancyjności na glin u pszenżyta oraz określeniem ich lokalizacji chromosomowej (P2, P3);
3. znalezienia markerów DNA asocjowanych/sprzężonych z QTLami cechy w obrębie linii i odmian pszenżyta oraz populacji mapujących pokolenia F2 (P2, P3);
4. identyfikacji markerów DNA dla potrzeb MAS z wykorzystaniem dostępnej puli genowej (P4) oraz
5. weryfikacji wpływu stresu glinowego na zmiany metylacji genomowego DNA u pszenżyta (P5).

Omówienie osiągniętych wyników

P1). Niedziela A., Orłowska R., Machczyńska J., Bednarek P.T. (2016) The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs. SpringerPlus 5:355.

Pszenżyto jest gatunkiem bardzo młodym, sztucznie wytworzony przez człowieka i nie przeszło długoletniej ewolucji naturalnej, jak inne gatunki zbóż [1]. Powoduje to, że cechuje je ograniczona zmienność genetyczna, a pule genowe na świecie różnią się stosunkowo nieznacznie [41, 42]. Należy oczekiwać, że podobna sytuacja ma miejsce również w przypadku form dostępnych w Polsce. Niemniej jednak, nie można wykluczyć, że ze względu na odmienne ukierunkowanie programów hodowlanych poszczególnych firm hodowlano-nasiennych, czy też warunki klimatyczno-środowiskowe mogło dojść do wyodrębnienia się kilku pul genowych.

Celem poniższej pracy była ocena zróżnicowania oraz struktury genetycznej reprezentatywnej puli genowej pszenżyta uprawianego w Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Małyszyn.

Materiał do analiz stanowiły 232 linie pszenżyta wyprowadzone na drodze krzyżowań oraz zarejestrowane odmiany. Do genotypowania badanej puli materiału roślinnego zastosowano markery DArT (Diversity Arrays Technology) uzyskując 3117 fragmentów DNA dla każdej

z roślin. Przygotowanie danych do analiz statystycznych polegało na usunięciu identycznych form pszenżyta oraz markerów redundantnych, monomorficznych i charakteryzujących się niską frekwencją. Podobieństwo genetyczne materiału roślinnego oceniono z użyciem programu PAST [43] stosując metodę średnich odległości między obiektami w skupieniach (UPGMA ang. unweighted pair-group method using arithmetic averages) oraz współczynnik podobieństwa Jaccarda [44]. Formy hodowlane występujące w obrębie tych samych skupień i różniące się nie więcej niż 5% pod względem dystansu genetycznego łączono razem, a do analiz wybierano tylko jedną z nich. Analogicznie poszukiwano markerów redundantnych. Spośród badanych genotypów 22 formy jare oraz 49 form ozimych pszenżyta posiadało swoje odpowiedniki wykazujące podobieństwo wyższe niż 95%. Redundancja markerów DArT wynikająca z obecności dodatkowych, często licznych kopii niektórych sekwencji DNA wynosiła około 42%. Do analiz wykorzystano 161 zróżnicowanych form pszenżyta (17 jarych i 144 ozimych) oraz 1829 markerów DArT.

Strukturę badanej populacji określono stosując analizę głównych współrzędnych (PCoA ang. Principal Coordinate Analysis) w programie PAST [43] oraz analizę bayesianowską z wykorzystaniem programów STRUCTURE 2.2.3 [45], STRUCTURE HARVESTER [46] oraz CLUMPP [47]. Udział markerów polimorficznych (P%), wskaźnik różnorodności Shannon'a (I) oraz poziom zmienności molekularnej (AMOVA ang. Analysis of molecular variance) został oceniony w programie GenAlEx 5.3 [48]. Wartość współczynnika polimorfizmu (PIC ang. Polymorphism Information Content) obliczono według wzoru: $PIC=1-(p^2+q^2)$, gdzie „p” to obecność danego allelu, a „q” jego brak [49].

Wyniki analizy PCoA wykazały, że największy udział w wytłumaczeniu obserwowanej zmienności pomiędzy badanymi formami pszenżyta ma pierwsza współrzędna główna (8.7%), natomiast druga współrzędna główna tłumaczyła 6.5% obserwowanej zmienności. Na podstawie wykresów rozmieszczenia analizowanych obiektów w układzie dwóch pierwszych współrzędnych głównych stwierdzono, że badane formy pszenżyta dzielą się na trzy częściowo zachodzące na siebie grupy. Analiza bayesianowska potwierdziła strukturyzację danych sugerując występowanie trzech grup oraz ich słabe rozdzielenie ($\Delta K=58.4$). Pierwsza z grup wytypowana na podstawie statystyki bayesianowskiej (Pop1) obejmowała 17 form jarych oraz 17 form ozimych, a druga (Pop2) i trzecia (Pop3) była reprezentowana odpowiednio przez 101 i 26 form ozimych. Poziom zmienności poszczególnych form wchodzących w skład Pop1, Pop2 i Pop3 wynosił odpowiednio 43.7%, 40.7% i 30.7%. Zarówno współczynnik PIC, jak też wskaźnik I zachowywały się w podobny sposób i były najwyższe dla Pop1 (PIC=0.319, I=0.478) i Pop2 (PIC=0.309, I=0.466), a najniższe dla Pop3 (PIC=0.234, I=0.356). Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) wykazała, że 14% zmienności odpowiadało za różnice pomiędzy populacjami.

W prezentowanej pracy wykazano, że badane formy pszenżyta reprezentujące pulę genową gatunku uprawianą w Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR charakteryzują się niewielkim zróżnicowaniem genetycznym pomiędzy wyodrębnionymi populacjami, ale jednocześnie uwidaczniają relatywnie wysoką zmienność w ich obrębie, co wskazuje na pewien potencjał selekcyjny.

P2). Niedziela A., Bednarek P.T., Cichy H., Budzianowski G., Kilian A., Anioł A. (2012) Aluminum tolerance association mapping in triticale. *BMC Genomics*, 13:67.

Zaobserwowane zróżnicowanie puli genowej pszenżyta uprawianego w kraju stwarza perspektywę poszukiwania genów tolerancyjności na toksyczne działanie jonów glinu. Do tego celu można wykorzystać mapowanie asocjacyjne umożliwiające identyfikację szerokiego spektrum alleli cechy w obrębie zróżnicowanych materiałów roślinnych. Metoda ta może być wykorzystana zarówno do identyfikacji alleli silnych jak i słabych, a skuteczność analizy zależy między innymi od liczebności populacji mapującej, wiarygodności fenotypowania oraz markerów DNA wykorzystanych do genotypowania. Ponadto, wiadomo, że hodowla form uprawnych może znajdować się pod presją selekcyjną/adaptacyjną. Nie można wykluczyć, że obszary genomu pod taką presją będą odpowiedzialne za ekspresję tolerancyjności na glin u pszenżyta. Włączenie do badań ww. obszarów genomu może okazać się użyteczne w identyfikacji markerów cechy.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja alleli odpowiedzialnych za ekspresję tolerancyjności na glin w obrębie materiałów uprawnych pszenżyta poprzez poszukiwanie markerów DNA asocjowanych z badaną cechą oraz znajdujących się pod dodatnią oraz zrównoważoną presją selekcyjną.

Populację mapującą stanowiły formy hodowlane pszenżyta opisane w publikacji P1. Rośliny reprezentujące daną linię fenotypowano przy pomocy testu fizjologicznego opracowanego przez Anioła [50]. Sterylne i podkiełkowane ziarniaki układano na pływających siatkach polietylenowych, a następnie umieszczano w pożywce zawierającej podstawowe makroelementy. Po trzech dniach siewki przenoszono do tej samej pożywki, ale uzupełnionej dodatkowo glinem w postaci $AlCl_3$ w stężeniu 16ppm. Po upływie 24 h korzenie siewek płukano pod bieżącą wodą i przenoszono ponownie na pożywkę podstawową na 48 godzin. Obie pożywki zostały doprowadzone do stałego pH 4.5, a całe doświadczenie prowadzone było w szafie termostatycznej w temperaturze $25^{\circ}C$, przy fotoperiodzie 12/12h (dzień/noc) oraz intensywności światła $40 Wm^{-2}$. Przy ocenie tolerancyjności brano pod uwagę czy korzenie siewek, mimo działania stresu glinowego mogą kontynuować wzrost, czy też jest on zaburzony. Miejsce uszkodzenia korzeni przez jony Al^{3+} wizualizowano eriochromocyjaniną R, która wiąże się z tym jonem dając fioletowe zabarwienie. Siewki wrażliwe na toksyczne działanie jonów glinu rozpoznawano po zabarwieniu merystemu wzrostu korzenia. U siewek tolerancyjnych obserwowano fioletową obwódkę powyżej merystemu apikalnego korzenia. Długość odrostu korzeniowego, czyli odległość od merystemu apikalnego do miejsca zabarwienia korzenia przyjmowano za miarę tolerancyjności. W badaniach przyjęto trzystopniową skalę klasyfikacji roślin w zależności od długości odrostu korzeniowego: I) 0.0-0.2 cm rośliny nietolerancyjne, II) 0.2-0.5 cm rośliny średnio tolerancyjne i III) powyżej 0.5 cm rośliny tolerancyjne. Wśród badanych form pszenżyta 111 znalazło się w grupie I, 70 w grupie II oraz 51 w grupie III.

Do genotypowania badanej puli materiału roślinnego zastosowano, oprócz wspomnianych w pracy P1 markerów DArT również markery polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów - AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) oraz markery mikrosatelitarne - SSR (ang. Simple Sequence Repeats). Uzyskano łącznie 3289 fragmentów DNA dla każdej z roślin reprezentujących daną formę hodowlaną. Stopień podobieństwa wszystkich 232 form oraz redundancję markerów oszacowano osobno dla poszczególnych

chromosomów, po wcześniejszym przypisaniu do nich odpowiednich markerów. Markery o nieznanym położeniu (AFLP oraz część markerów DArT) grupowano razem. Analizę skupień UPGMA wykonano z użyciem programu PAST [43]. Do określenia struktury genetycznej materiału roślinnego wykorzystano programy: STRUCTURE [45], STRUCTURE HARVESTER [46] oraz CLUMPP [47]. Asocjacje markerów z cechą badano w programie TASSEL [51] stosując dwa modele statystyczne: ogólny (GLM ang. general linear model) i wielokrotny (MLM ang. multiple linear model) model liniowy [52]. Do analizy MLM zastosowano macierz pokrewieństwa (kinship) obliczoną w programie SPAGeDi [53]. Ponadto przy użyciu oprogramowania firmy DArT Pty Ltd. w Australii wykonano mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem modelu uczenia maszyn (SML ang. system machine learning) [54]. Identyfikowano także markery odpowiadające loci, które potencjalnie znajdują się pod dodatnią (PS ang. positive selection) oraz zrównoważoną (BS ang. balancing selection) presją selekcyjną (ang. outlier loci). Analizę wykonano z zastosowaniem programu Mcheza [55]. Po wykryciu asocjacji sprawdzano, czy na dostępnych mapach genetycznych żyta [56] i pszenżyta [57] występują sprzężone z tymi markerami inne markery molekularne. Poprzez pośrednie określenie lokalizacji markerów asocjowanych z cechą na mapach genetycznych ustalano potencjalną lokalizację loci związanych z tolerancją na toksyczne działanie jonów Al^{3+} .

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano sumarycznie 53 markery asocjowane z tolerancją na glin lub jej brakiem oraz 49 markerów odpowiadających obszarom genomu pod presją selekcyjną. Zidentyfikowane markery lokalizowały się na chromosomach żytnich 3R, 4R, 6R i 7R. Analiza struktury populacji w przypadku tych chromosomów wykazała podział badanych materiałów na dwie grupy oraz ich silne rozdzielenie dla chromosomów 3R ($\Delta K=3100$), 4R ($\Delta K=8300$) i 7R ($\Delta K=15300$) oraz słabe dla chromosomu 6R ($\Delta K=88$). Obserwowano, że w pierwszej grupie znajdują się formy tolerancyjne i średnio tolerancyjne na glin, natomiast w drugiej formy nietolerancyjne.

Większość asocjowanych markerów była obecna na dostępnych mapach pszenżyta i żyta, co pozwoliło na identyfikację dodatkowych 126 markerów molekularnych silnie z nimi sprzężonych. Pośrednia lokalizacja QTLi związanych z tolerancją na glin sugerowała obecność jednego QTLa cechy na chromosomie 3R, dwóch na chromosomie 4R, trzech na chromosomie 6R i jednego na chromosomie 7R.

Wytypowane markery związane z tolerancją na glin stanowiły podstawę do opracowania wydajnego systemu selekcyjnego hodowli roślin odpornych.

P3). Niedziela A., Bednarek P.T., Labudda M., Mańkowski D.R., Anioł A. (2014) Genetic mapping of a 7R Al tolerance QTL in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). Journal of Applied Genetics 55/1: 1-14.

Mapowanie asocjacyjne umożliwia identyfikację wielu QTLi cechy występujących w badanym materiale roślinnym jednak bez informacji o lokalizacji markerów genetycznych na mapach sprzężeniowych nie można jednoznacznie stwierdzić z iloma QTLami cechy ma się do czynienia. Do tego celu zwykle wykorzystuje się modelowe populacje dwurodzicielskie.

Celem badań niniejszej pracy była identyfikacja, a następnie lokalizacja chromosomowa QTLi powiązanych z tolerancją na toksyczne stężenia jonów Al^{3+} z wykorzystaniem populacji mapujących pokolenia F2 oraz opracowanych na ich podstawie map

genetycznych gatunku z wytypowaniem markerów sprzężonych z tymi QTLami. Kolejnym celem było zweryfikowanie, czy QTL e cechy odpowiadają za ekspresję genów warunkujących wydzielanie kwasu jabłkowego, bądź cytrynowego.

W ramach badań wyprowadzono populacje mapujące pokolenia F2 pszenżyta odmiany Bogo. Do krzyżowania wykorzystano podwojone haploidy (ang. DH - doubled haploid) o skrajnych fenotypach (tolerancyjne i nietolerancyjne). Spośród kilkunastu otrzymanych populacji wybrano dwie (MP1 i MP15), które charakteryzowały się obecnością zarówno form tolerancyjnych, jak i wrażliwych na glin. Każda z populacji liczyła 94 osobniki. Do fenotypowania roślin zastosowano test fizjologiczny opisany w publikacji P2, natomiast do genotypowania wykorzystano markery PCR specyficzne dla sekwencji DNA otaczającej loci genu ALMT u żyta [24, 25] oraz markery DArT, SSR i AFLP. Wśród ogólnej puli około 1060 uzyskanych fragmentów DNA identyfikowano markery redundantne wykazujące podobieństwo profili wyższe niż 95%. Markery te usuwano z analizy pozostawiając tylko jeden z nich. Analizy przeprowadzono z użyciem programu PAST [42]. Osobniki oraz markery charakteryzujące się licznymi brakami (>70%), a także markery wykazujące zaburzenia segregacji wykluczano z dalszych analiz stosując program R oraz pakiet R/qtl [58]. Ostatecznie do utworzenia grup sprzężeń wykorzystano 96 polimorficznych markerów dla populacji MP1 i 99 markerów dla MP15. Analizę sprzężeń wykonano z zastosowaniem programu R używając funkcji `est.rf()`, `pull.rf()`, `formLinkageGroups()`, `orderMarkers()`, `calc.errorlod()` i `pull.map()` pakietu R/qtl [58]. Mapowanie QTLi zostało wykonane przy użyciu funkcji `cim()` z zastosowaniem następujących parametrów: metoda Haley-Knott, funkcja Kosambi, prawdopodobieństwo błędu 0.001, liczba permutacji 1000, LOD (ang. logarithm of the odds) wyznaczone przy $p=0.05$. Procent wytłumaczonej wariancji cechy określono za pomocą funkcji `fitqtl()`. Rozkład cechy w populacjach mapujących został oceniony za pomocą testu Shapiro-Wilka z użyciem SAS/STAT 9.2 [59]. Ze względu na zaburzenia rozkładu normalnego cechy, asocjacje pomiędzy markerami i tolerancją na glin potwierdzono testem nieparametrycznym Kluskala-Wallisa w programie MapQTL 5.0 [60]. Współczynnik odziedziczalności cechy w szerokim sensie (h^2) oszacowano za pomocą metody największej wiarygodności z restrykcją (REML ang. Restricted Maximum Likelihood) [59]. Obecność kwasu jabłkowego w korzeniach roślin stresowanych glinem oceniano za pomocą metody enzymatycznej opracowanej przez Delhaize i in. [61], natomiast do oceny zawartości kwasu cytrynowego zastosowano zestaw K-CITR 07/11 (Megazyme International Ireland Ltd.).

W wyniku przeprowadzonych analiz otrzymano po trzy grupy sprzężeń dla każdej populacji mapującej. Wybór homozygotycznych i praktycznie identycznych roślin rodzicielskich do krzyżowań skutkowało małą liczbą markerów polimorficznych, co nie pozwoliło utworzyć mapy genetycznej dla całego genomu pszenżyta. Dzięki znanej lokalizacji chromosomowej markerów SSR oraz DArT otrzymane grupy sprzężeń przypisano do chromosomów 5R, 7R i 2B dla każdej populacji mapującej. **W grupie sprzężeń chromosomu 7R zostały zidentyfikowane QTL e tłumaczące odpowiednio 25.3 % i 35.9 % wariancji cechy dla MP1 i MP15. Najbliżej maksymalnej wartości QTLi znalazły się markery B1, B26, Xscm092 i Xscm150 dla populacji MP1 (0.04cM) oraz B1, B26 i Xscm150 dla populacji MP15 (0.02cM).** Test Kluskala-Wallisa wykazał istotne asocjacje pomiędzy tymi markerami a tolerancją na glin ($K=22.23$ dla MP1 i $K=31.28$ dla MP15; $p=0.0001$). Odziedziczalność cechy w szerokim sensie (h^2) była wysoka i wynosiła 0.996 (MP1) i 0.994 (MP15). Uzyskany w prezentowanych

badaniach wynik potwierdzał wyniki przeprowadzonej analizy asocjacyjnej (P2) oraz innych badań [29, 30] wskazujących na dominującą rolę genomu żytniego w warunkowaniu tolerancyjności na glin u pszenżyta. **W obu populacjach wykazano podwyższone wydzielanie kwasu jabłkowego pod wpływem działania jonów Al^{3+} , natomiast nie odnotowano obecności kwasu cytrynowego.** Porównano również lokalizację markerów sprzężonych z cechą u pszenżyta z ich lokalizacją względem genu ALMT określaną w dostępnych pozycjach literaturowych [24, 25]. Markery B1 i B26, które wykazały najsilniejsze sprzężenia z badaną cechą u pszenżyta zostały wcześniej zmapowane na chromosomie żytnim 7R w odległości, kolejno 0.4cM i 0.05cM od locus *Alt4* [24, 37], w którym lokalizuje się gen *ScALMT1* odpowiedzialny za transport kwasu jabłkowego [19]. **Wyniki przeprowadzonych analiz sugerują, że QTL obecny w obu populacjach mapujących pszenżyta (MP1 oraz MP15) odpowiada lokalizacji genu ALMT.**

W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano nowe informacje dotyczące lokalizacji i identyfikacji głównego genu związanego z tolerancyjnością na glin u pszenżyta. Udowodniono, że w obrębie badanych populacji pokolenia F2 cecha ta jest warunkowana przede wszystkim obecnością genu ALMT pochodzącego z genomu żytniego.

P4). Niedziela A., Mańkowski D., Bednarek P. T. (2015) Diversity Arrays Technology-based PCR markers for marker assisted selection of aluminum tolerance in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). Molecular Breeding 35:209.

Identyfikacja licznych markerów DArT asocjowanych/sprzężonych z tolerancyjnością pszenżyta na toksyczne działanie jonów glinu oraz markerów pod presją selekcyjną stworzyła możliwość przeprowadzenia ich konwersji do warunków specyficznego PCR. Takie markery można w łatwy i wygodny sposób wykorzystać do identyfikacji roślin tolerancyjnych, a w przyszłości do selekcji form o pożądanym genotypie.

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie sekwencji markerów DArT asocjowanych z cechą tolerancyjności na glin do opracowania markerów DNA generowanych metodą PCR dla potrzeb różnicowania dostępnej puli genowej pszenżyta pod względem badanej cechy, a w przyszłości do ich ewentualnego wykorzystania w selekcji wspomagananej markerami. Ponadto weryfikowano lokalizację chromosomową wybranych markerów PCR z wykorzystaniem dwurodzicielskich populacji mapujących, a także testowano ich użyteczność do celów hodowlanych.

Wyjściowy materiał do badań stanowiło 49 markerów DArT asocjacyjnych z cechą tolerancyjności na glin (P2). Startery specyficzne do 40 dostępnych sekwencji markerów DArT o odpowiedniej długości zaprojektowano w programie CLC Main Workbench 6.0 [62]. Temperatura ich hybrydyzacji została zasugerowana przez ww. program, a następnie zweryfikowana przy użyciu termocyklera gradientowego PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Ich zdolność do różnicowania materiałów roślinnych weryfikowano na 161 formach i odmianach pszenżyta (38 tolerancyjnych, 26 średnio tolerancyjnych oraz 97 nietolerancyjnych na glin) opisanych w publikacji P1. Spośród zaprojektowanych 40 par starterów, 24 powielają polimorficzne markery spodziewanej długości segregujące w identyczny sposób jak ich odpowiednik DArT (3 markery zlokalizowane na chromosomie 4R; 8 na chromosomie 6R i 13 na chromosomie 7R). Szesnaście starterów generowało monomorficzne, bądź nieczytelne

produkty na żelach. Część markerów miała swoje redundantne odpowiedniki. Po wytypowaniu tylko jednego markera z redundantnej grupy otrzymano trzy oryginalne markery PCR przypisane do chromosomu 4R, sześć przypisanych do chromosomu 6R i cztery zlokalizowane na chromosomie 7R (razem 13 markerów). Wszystkie markery miały dominujący charakter. Sekwencje DArT dla markerów asocjowanych z badaną cechą na chromosomie 3R były niedostępne.

Powiązanie markerów DArT po konwersji do warunków PCR z długością odrostu korzeniowego oceniano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana z zastosowaniem procedury CORR w programie SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC). Obecność asocjacji pomiędzy obserwowanym profilem prążków na żelu uzyskany przez jeden, dwa oraz trzy wytypowane markery, a liniami pszenżyta tolerancyjnymi i wrażliwymi na glin potwierdzono testem zgodności chi-kwadrat Pearsona (χ^2) [63]. Siłę asocjacji pomiędzy obserwowanym profilem generowanymi przez jeden, dwa i trzy markery, a genotypem roślin oceniono poprzez wyliczenie współczynnika Phi (Φ) [64].

Istotne korelacje markerów z cechą uzyskano dla 10 spośród 13 konwertowanych (c) markerów DArT. **Najwyższy współczynnik korelacji z formami tolerancyjnymi lub nietolerancyjnymi na glin (-) odnotowano dla markerów rPt-508078c, rPt-401828c i rPt-505154c, lokalizujących się na chromosomie 7R.** Marker rPt-401828c był obecny w 33 spośród 38 tolerancyjnych form pszenżyta oraz w 7 spośród 97 form nietolerancyjnych na glin. Współczynnik korelacji tego markera z badaną cechą wynosił $r = 0.523$ ($p > 0.0001$). Kolejny marker, rPt-508078c, nie był identyfikowany w żadnej formie tolerancyjnej, natomiast był obecny w 104 formach nietolerancyjnych i tych o pośredniej wartości cechy. Jego korelacja z brakiem tolerancyjności dała wynik na poziomie $r = -0.628$ ($p > 0.0001$). Obecność ostatniego z markerów, rPt-505154c odnotowano w 25 formach tolerancyjnych oraz wszystkich formach nietolerancyjnych i o pośredniej wartości cechy. Poziom jego korelacji z brakiem tolerancyjności na glin wynosił $r = -0.414$ ($p > 0.0001$). Test chi-kwadrat Pearsona wykazał asocjację ($\chi^2 = 84.539$, $p < 0.0000$) pomiędzy roślinami zaklasyfikowanymi do trzech grup fenotypowych a profilem molekularnym markera rPt-401828c. Gdy do selekcji roślin zastosowano dwa markery: rPt-508078c i rPt-401828 otrzymując tym samym cztery potencjalne wzory generowanych przez nie prążków (I-0/0, II-0/1, III-1/0 i IV-1/1) to wynik statystyki chi-kwadrat wzrósł do $\chi^2 = 106.715$ ($p < 2.2e-16$). Po dodaniu trzeciego markera, rPt-505154c wynik tylko nieznacznie różnił się od poprzedniego i wynosił $\chi^2 = 110.953$ ($p < 2.2e-16$). Siła asocjacji (Φ) pomiędzy profilami generowanymi przez jeden, dwa i trzy markery, a badaną cechą wynosiła odpowiednio 0.724, 0.814 i 0.830.

Testowano segregacje opisanych markerów na liczących po 96 osobników populacjach F2 pszenżyta (P3). Po wykonaniu powtórnego mapowania zlokalizowano w grupach sprzężeń chromosomu 7R dwa markery: rPt-508078c oraz rPt-505154c. Pierwszy z nich mapował się w odległości 1.2cM (MP1) oraz 2.2cM (MP15) od najwyższej wartości funkcji LOD wyznaczonej dla QTLa związanego z cechą tolerancyjności na glin u pszenżyta. Natomiast drugi lokalizował się w odległości 21cM od maksymalnej wartości LOD i był obecny tylko w populacji MP1.

W wyniku przeprowadzonych analiz, na bazie 49 markerów DArT opracowano 3 markery DNA generowane metodą PCR i różnicujące dostępną pulę genową pod względem tolerancyjności na jony glinu. Marker najsilniej sprzężony z cechą występował

w bezpośrednim sąsiedztwie maksimum LOD cechy w przypadku populacji mapujących MP1 i MP15.

P5) Niedziela A. (2018) The influence of Al³⁺ on DNA methylation and sequence changes in the triticale (*× Triticosecale* Wittmack) genome. *Journal of Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0459-0>.

Rośliny rosnące w warunkach stresowych mogą być poddawane zarówno zmianom genetycznym jak i epigenetycznym. Glin jest jednym z najbardziej rozpoznawanych czynników indukujących stresy abiotyczne u roślin rosnących na glebach o odczynie kwaśnym. Nie jest jednak jasne, jak szeroki może być zakres zmian wywołanych jego obecnością w podłożu i czy stres glinowy aktywuje zmiany epigenetyczne przejawiające się na poziomie metylacji DNA. Do tej pory nie przeprowadzono systematycznych badań poświęconych epigenetycznym aspektom tolerancji na Al u pszenżyta.

Celem pracy była analiza wpływu stresu glinowego na poziom metylacji genomowego DNA w liniach tolerancyjnych i nietolerancyjnych pszenżyta oraz sprawdzenie, czy możliwa jest identyfikacja różnic sugerujących, że tolerancja na glin jest warunkowana czynnikami epigenetycznymi.

Materiał do badań w omawianej pracy stanowiły linie wsobne (S10) pszenżyta o skrajnej reakcji na stres glinowy wybrane za pomocą testu fizjologicznego (według opisu w P2) spośród linii wyprowadzonych w Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Małyszyn. Do analiz wybrano po 5 linii tolerancyjnych (T) i nietolerancyjnych (NT). Genomowy DNA izolowano z wierzchołków korzeni i liści siedmiodniowych siewek, które przeszły test fizjologiczny w obecności 15, 20 i 30 ppm glinu (AlCl₃). Kontrolę stanowiły rośliny rosnące w pożywkach bez glinu. Procentowy udział całkowitej zawartości 5-metylodeoksycytydyny (5mdC) w stosunku do całkowitej zawartości cytydyny w genomowym DNA korzeni i liści roślin stresowanych glinem i kontrolnych określono z wykorzystaniem chromatografii cieczowej RP-HPLC (Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography). Do oceny zmian poziomu metylacji sekwencji 5'-CCGG-3' i 5'-GGTACC-3' pod wpływem stresu glinowego zastosowano metodę MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) [65] oraz metAFLP (methylation Amplified Fragment Length Polymorphisms) [66]. Fragmenty MSAP różnicujące badany materiał wycinano z żeli i sekwencjonowano. Otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami zawartymi w bazie danych NCBI z zastosowaniem programu BLASTN oraz oceniano ich podobieństwo do znalezionych sekwencji homologicznych.

Za pomocą analizy RP-HPLC wykazano, wzrost ilości 5mdC w genomowym DNA korzeni roślin NT (~1.0%) oraz jej nieznaczny spadek (~0.65%) w korzeniach roślin T pod wpływem działania stresu glinowego. Podobne zmiany nie były widoczne w liściach. Stężenie jonów glinu nie wpływało na zmiany metylacji DNA liści i korzeni.

Zastosowana w badaniach metoda MSAP uwidoczniła różnice poziomu metylacji pomiędzy roślinami kontrolnymi, a poddanymi stresowi glinowemu. Obserwowano demetylację analizowanych fragmentów DNA na poziomie 3.97% oraz 3.75% w stresowanych korzeniach linii T i NT. Natomiast *de novo* metylacja obu cytozyn w miejscach cięcia enzymów restrykcyjnych wynosiła jedynie 0.23% i była obserwowana tylko w dwóch liniach T. Zmiany poziomu metylacji DNA nie były obserwowane w liściach. Trzy z dwudziestu analizowanych

sekwencji fragmentów MSAP wykazywały podobieństwo do sekwencji genów zgromadzonych w bazie danych NCBI. Były to geny kodujące białka kinazy receptorowej i N-metylotransferazy histaminy związane ze stresem abiotycznym oraz białko eRF1-2 odpowiedzialne za terminację translacji.

Poziom metylacji sekwencji 5'-GGTACC-3' analizowanych za pomocą metAFLP wynosił ~5.0% i nie był zależny od genotypu (T, NT) oraz obecności, bądź braku jonów Al^{3+} w pożywce (kontrola, stres). W obrębie miejsc restrykcyjnych wykryto jednak zmiany sekwencyjne (SV ang. Sequence Variation) różnicujące badane organy. W korzeniach zmienność sekwencyjna wynosiła 0.87% dla linii T i 0.97% dla linii NT, natomiast w liściach 0.14% dla linii T i 0.04% dla linii NT.

W omawianej pracy udowodniono, że stres powodowany obecnością glinu wpływa na zmiany wzorów metylacji DNA w korzeniach roślin T i NT. Zmiany te prawdopodobnie dotyczą ograniczonych obszarów genomu lub znajdują się poza obszarami występowania sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy użyte w metodach MSAP oraz metAFLP. Wykazano również, że glin może indukować zmiany sekwencyjne w DNA korzeni, oraz w ograniczonym zakresie również liści roślin stresowanych. Zmiany te mogą być powodowane mutagennym wpływem jonów tego pierwiastka.

Dokładniejsze wyjaśnienie epigenetycznych aspektów stresu glinowego u genotypów T i NT pszenżyta wymaga kontynuacji podjętych badań.

Podsumowanie

Przedstawione powyżej osiągnięcie naukowe opracowano na podstawie jednotematycznego cyklu publikacji, których głównym celem było rozszerzenie wiedzy dotyczącej genetycznych i epigenetycznych aspektów tolerancji na glin u pszenżyta oraz opracowanie markerów DNA użytecznych do selekcji wspomaganą markerami molekularnymi (MAS). Realizacja wytyczonych celów wiązała się z koniecznością oceny zróżnicowania puli genowej pszenżyta uprawianego w kraju, identyfikacją markerów asocjowanych z tolerancją na wysokie stężenia jonów glinu, zweryfikowaniem, czy identyfikowane markery lokalizują się w obrębie QTL cechy na populacjach dwurodzicielskich oraz uzyskanie markerów specyficznych użytecznych do różnicowania materiałów roślinnych. W kręgu zainteresowań znalazły się również badania metylomu form tolerancyjnych i nietolerancyjnych. Weryfikowano hipotezę, że cecha może być warunkowana czynnikami epigenetycznymi. Do badań wykorzystano 232 formy pszenżyta, których poziom tolerancji na glin określano na podstawie wyników testu fizjologicznego z zastosowaniem pożywki zawierającej jony Al^{3+} . W zależności od rodzaju analiz do genotypowania użyto markerów DNA: DArT, SSR, AFLP, PCR specyficzne dla sekwencji DNA otaczającej loci genu ALMT u żyta, metAFLP oraz MSAP. Otrzymane dane były następnie opracowywane z zastosowaniem programów komputerowych: PAST, STRUCTURE 2.2.3, STRUCTURE HARVESTER, CLUMPP, SPAGeDi, TASSEL, Mcheza, R, MapQTL 5.0, GenAIEx 5.3, SAS/STAT 9.2, BLASTN oraz CLC Main Workbench. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że badana pula genetyczna pszenżyta wykazuje nieznaczny stopień strukturyzacji i relatywnie wysoki poziom zróżnicowania w obrębie poszczególnych subpopulacji. Mapowanie asocjacyjne jak i sprzężeniowe jednoznacznie wskazuje, że geny tolerancji na obecność jonów glinu

lokalizują się na chromosomie 7R, jednak nie można wykluczyć, że część słabszych QTL występuje na chromosomach 3R, 4R oraz 6R. Po raz pierwszy udowodniono, że za tolerancję na glin u pszenżyta odpowiada gen *ALMT* warunkujący ekspresję transporterów kwasu jabłkowego. Uzyskany wynik sugeruje, że tolerancja warunkowana jest genomem żytnim i może ulegać modyfikacji poprzez działanie genomu pszenicznego. Należy podkreślić, że identyfikowane markery tolerancyjności na jony Al^{3+} u pszenżyta po ich konwersji do warunków selektywnego PCR nadają się do skutecznego różnicowania form badanej puli genetycznej gatunku. Na uwagę zasługują również wyniki wstępnych badań nad metylomem form T i NT. Brak zmian wzorów metylacji w obrębie DNA liści form T i NT oraz występowania takich zmian w obrębie DNA korzeni sugeruje, że stres glinowy wpływa na metylom jednak jego działanie może być 'selektywne' i ogranicza się do wąskich obszarów genomu.

Dotychczasowe badania własne były tak planowane, a zadania badawcze tak konstruowane, aby doprowadzić do wypracowania prostych metod różnicowania form T i NT, a w przyszłości również do ich zastosowania w MAS. Zrealizowane badania stanowią istotny krok w zrozumieniu tolerancyjności na glin u pszenżyta i pokazują, że podłoże zjawiska ma charakter nie tylko genetyczny, ale prawdopodobnie również epigenetyczny. Unikatowość otrzymanych wyników pozwoliła z powodzeniem opublikować je w czasopiśmie z listy IF.

Na bazie uzyskanych informacji planuję kontynuować badania w zakresie oceny ekspresji genów na poziomie mRNA i białka, aby uzyskać pełniejsze informacje na temat genów związanych z tolerancyjnością na glin u pszenżyta, a także mechanizmów sterujących ich ekspresją (metylacja DNA, małe RNA). Ze względu na wysokie koszty takich analiz będę aplikowała o ich finansowanie do NCN lub MNiSW.

Najważniejsze osiągnięcia praktyczne:

Przedstawione prace oprócz waloru naukowego mają również wartość aplikacyjną. Najważniejszym osiągnięciem praktycznym prezentowanej rozprawy habilitacyjnej było wytypowanie markerów molekularnych powiązanych z różną odpowiedzią pszenżyta na stres wywołany obecnością jonów glinu w podłożu. Markery te mogą zostać w przyszłości wykorzystane w hodowli MAS. W wyniku namnażania badanego materiału na potrzeby analiz oraz jego stałej selekcji na pożywkach z glinem uzyskano wyrównane genetycznie linie wsobne pszenżyta (S10) o podwyższonej tolerancyjności na ten pierwiastek. Linie te mogą zostać przekazane do Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Małyszyn, a następnie wykorzystane w hodowli. Ponadto będą one stanowiły materiał badawczy do dalszych, planowanych przeze mnie eksperymentów mających na celu dokładniejsze poznanie mechanizmów genetycznych i epigenetycznych związanych z tolerancyjnością na glin u pszenżyta.

Literatura:

- [1] Ammar K, Mergoum M, Rajaram S (2004) The history and evolution of triticale In: *Triticale Improvement and Production* Mergoum M. and Gómez Macpherson H. (red.). Food and Agriculture Organization of The United Nations Rome, pp 1-10.
- [2] http://www.coboru.pl/polska/Rejestr/gat_w_rej.aspx
- [3] <http://www.stat.gov.pl>
- [4] Peña RJ (2004) Food uses of triticale In: *Triticale improvement and production*. Mergoum M, Gómez-Macpherson H (red.) pp 37-48.

- [5] Wang S i in. (1997) Rye and triticale as feedstock for fuel ethanol production. *Cereal Chem*, 74:621-625.
- [6] Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46:237-260.
- [7] Filipek T, Skowrońska M (2013) Aktualnie dominujące przyczyny oraz skutki zakwaszenia gleb użytkowanych rolniczo w Polsce. *Acta Agrophysica*, 20:283-294.
- [8] Foy CD (1992) Soil chemical factors limiting plant root growth. W: *Advances in soil science: limitation to plant root growth*. New York: Springer-Verlag. Hatfield JL, Stewart BA (red.), 19: 97-149.
- [9] Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*, 6:273-278.
- [10] Barceló J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48:75-92.
- [11] Rehem BC i in. (2012) Regulation of gene expression in response to abiotic stress in plants. In: *Cell metabolism-cell homeostasis and stress response*. Bubulya P (red.) InTech, Rijeka, doi: 10.5772/26636.
- [12] Rojas CM i in. (2014) Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front Plant Sci*, 5:17.
- [13] Oh MW i in. (2014) Proteome analysis of roots of wheat seedlings under aluminum stress. *Mol Biol Rep*, 41:671-81.
- [14] Yang Q1 i in. (2009) Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, 7:737-49.
- [15] Milla MA i in. (2002) Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiol*, 130:1706-1716.
- [16] Dai H i in. (2013) Comparative proteomic analysis of aluminum tolerance in tibetan wild and cultivated barleys. *PLoS ONE*, 8(5): e63428.
- [17] Anioł A, Gustafson JP (1984) Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye, and triticale. *Can J of Genet Cytol*, 26:701-705.
- [18] Ryan PR i in. (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol*, 149:340-351.
- [19] Fontecha G i in. (2007) Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the Alt4 locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 114:249-260.
- [20] Silva-Navas J i in. (2012) The ScaACT1 gene at the Qalt5 locus as a candidate for increased aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Mol Breeding*, 30:845-856.
- [21] Sasaki T i in. (2004) A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter. *Plant J*, 37:645-653.
- [22] Ryan PR i in. (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol*, 149:340-351.
- [23] Garcia-Oliveira AL i in. (2013) Molecular characterization of the STOP1 homoeologues and their response to aluminium and proton (H⁺) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *BMC Plant Biology*, 13:134.
- [24] Miftahudin T, Scoles GJ, Gustafson JP (2004) Development of PCR-based codominant markers flanking the Alt3 gene in rye. *Genome*, 47:231-238.
- [25] Benito C i in. (2009). From the rye Alt3 and Alt4 aluminum tolerance loci to orthologous genes in other cereals. *Plant Soil*, 327:107-120.
- [26] Devos KM, i in. (1993) Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor Appl Genet* 85:673-680.
- [27] Zhou L-L i in. (2007) Quantitative trait loci for aluminum resistance in wheat. *Mol Breed*, 19:153-161.
- [28] Navakode S i in. (2009) Molecular mapping of quantitative trait loci (QTLs) controlling aluminium tolerance in bread wheat. *Euphytica*, 166:283-290.
- [29] Ma JF, Taketa S, Yang ZM (2000) Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol*, 122:687-694.
- [30] Budzianowski G, Woś H (2004) The effect of single D-genome chromosomes on aluminium tolerance of triticale. *Euphytica*, 137:165-172.
- [31] Kim B i in. (2001) Aluminum tolerance in triticale, wheat, and rye. *Euphytica*, 120: 329.
- [32] Stass A i in. (2008) The significance of organic-anion exudation for the aluminium resistance of primary triticale derived from wheat and rye parents differing in aluminium resistance. *J Plant Nutr Soil Sci*, 171:634-642.
- [33] Mirouze M, Paszkowski J (2011) Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14:267-274.
- [34] Choi C-S, Sano H (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 277:589-600.
- [35] Jiang G-L (2013) Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants In: *Plant Breeding from Laboratories to Fields* Andersen SB (red.) pp. 45-83.

- [36] Zimnoch-Guzowska E, Gołębiewska M (2011) Wykorzystanie biotechnologii przez polską hodowlę roślin. Exploitation of biotechnology by Polish plant breeding. Biuletyn IHAR, 259:121-129.
- [37] Miftahudin T i in. (2005) Targeting the aluminium tolerance gene Alt3 region in rye, using rice/rye micro-colinearity. Theor Appl Genet, 110:906-913.
- [38] Raman H, Raman R, Wood R, Martin P (2006) Repetitive indel markers within the ALMT1 gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol Breed, 18:171-183.
- [39] Sasaki T i in. (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. Plant Cell Physiol, 47:1343-1354.
- [40] Raman H i in. (2008) Analysis of TaALMT1 traces the transmission of aluminum resistance in cultivated common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet, 116:343-354.
- [41] Furman BJ i in. (1997) Characterisation and analysis of North American triticale genetic resources. Crop Sci, 37:1951-1959.
- [42] Tams SH i in. (2004) Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. Theor Appl Genet, 108:1385-1391.
- [43] Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4:1-9.
- [44] Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bul Soc Vaudoise Sci Nat 44: 223-270.
- [45] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000a) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959.
- [46] Earl DA, von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 4:359-361.
- [47] Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics, 23:1801-1806.
- [48] Peakal R, Smouse PE (2001) GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.
- [49] Alheit KV i in. (2011) Detection of segregation distortion loci in triticale (*x Triticosecale* Wittmack) based on a high-density DArT marker consensus genetic linkage map. BMC Genomics, 12:380.
- [50] Anioł A (1984) Induction of aluminium tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminium in the nutrient solution. Plant Physiol, 75:551-555.
- [51] Bradbury PJ i in. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics, 23:2633-2635.
- [52] Yu JM i in., (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics, 38:203-208.
- [53] Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. Molecular Ecology Notes, 2:618-620.
- [54] Bedo J i in. (2008) Precision-mapping and statistical validation of quantitative trait loci by machine learning. BMC Genetics, 9:35.
- [55] Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. Molecular Ecology, 8:907-913.
- [56] Bolibok-Braęoszewska H i in. (2009) DArT markers for the rye genome - genetic diversity and mapping. BMC Genomics, 10:578.
- [57] Tyrka M i in. (2011) Genetic map of triticale compiling DArT, SSR, and AFLP markers. Genome, 54:391-401.
- [58] Broman KW (2010) Genetic map construction with R/qtl. University of Wisconsin-Madison, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Technical Report # 214.
- [59] SAS I, Inc. (2009) SAS/STAT 9.2 User's Guide, Second Edition, Ed, VolSAS Publishing, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- [60] van Ooijen JW (2004) MapQTL_5 Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, The Netherlands.
- [61] Delhaize E i in. (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. Plant Physiology, 103: 695-702.
- [62] CLC Inc., Aarhus, Denmark; <http://www.clcbio.com/>
- [63] Bewick V i in. (2004) Statistics review 8: Qualitative data - tests of association. Crit Care, 8:46-53.
- [64] Agresti A (2002) Categorical Data Analysis. 2nd Edition. John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA.
- [65] Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Mol Gen Genet, 253:703-710.
- [66] Bednarek PT i in. (2007) Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC Plant Biol, 7:10.

E. OMÓWIENIE POZOSTAŁEJ TEMATYKI BADAWCZEJ, GŁÓWNE KIERUNKI I WAŻNIEJSZE WYNIKI

Jestem absolwentką Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Pierwsze badania naukowe realizowałam w ramach projektu własnego pt. „Opracowanie technologii transformacji pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dla potrzeb hodowlanych.” (KBN nr. 5P06A02511), który był podstawą do napisania pracy magisterskiej pt. „Charakterystyka transgeniczných roślin pomidora pokolenia T2 z wprowadzonymi genami fosfotransferazy neomycyny oraz taumatyny II.” wykonywanej pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Bartoszewskiego w Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin. Moim zadaniem była selekcja roślin homozygotycznych na pożywkach z antybiotykiem oraz określenie liczby miejsc integracji i poprawności integracji transgenu w roślinach pomidora odmiany Beta oraz mutantach *ls* (ang. lateral suppressor) i *nor* (ang. non-ripening). Ponadto do moich obowiązków należało oszacowanie poziomu ekspresji białka na poziomie mRNA, a także detekcja jego obecności w liściach i owocach. Oceniałam również cechy związane z morfologią roślin, wytwarzaniem i dojrzewaniem owoców, plennością i podatnością na stresy abiotyczne (zasolenie). W badaniach tych wykorzystywałam analizy Southern-blot, Northern-blot i Western-blot. Za pomocą metody Southern-blot wykazałam, że dwanaście spośród czternastu badanych linii charakteryzuje się obecnością pojedynczego locus transgenu w liściach, natomiast w pozostałych dwóch liniach doszło do integracji transgenu w dwóch i czterech locus. Wszystkie rośliny, u których nastąpiła integracja transgenu w pojedynczym locus oraz linia posiadająca dwa miejsca integracji, charakteryzowały się wysoką ekspresją białka na poziomie mRNA, co zostało zobrazowane przy użyciu analizy Northern-blot. W przypadku roślin posiadających cztery kopie genu poziom ekspresji taumatyny II na poziomie mRNA był bardzo niski. Mogło to być spowodowane interakcjami pomiędzy homologicznymi fragmentami wielokrotnych kopii transgenu wprowadzonych do rośliny. Podobna analiza wykonana dla owoców transgeniczných roślin mutantu *nor* wykazała, że spośród trzech badanych linii tylko u dwóch nastąpiła ekspresja genu taumatyny. W wyniku reakcji barwnej Western-blot otrzymałam prążek świadczący o obecności białka w liściach dziesięciu transgeniczných linii pomidora (spośród dwunastu badanych) oraz w owocach dwóch linii (spośród siedmiu badanych). Analiza Western-blot dla owoców została potwierdzona testami smakowym. Ocena fenotypowa wybranych linii transgeniczných wysianych na pożywkę z dodatkiem NaCl wykazała korzystny wpływ taumatyny w ochronie roślin mutantu *ls* przed stresem solnym. Podobnych zależności nie obserwowałam dla transgeniczných linii odmiany Beta i mutantu *nor*. Wyniki zawarte w pracy magisterskiej zostały opublikowane w artykule „Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth.” (pozycja **IIA1.2** w wykazie publikacji) oraz częściowo zaprezentowane w artykule przeglądowym (pozycja **IID1.5** w wykazie publikacji).

Po ukończeniu studiów, dalszą karierę naukową oraz zawodową związałam z Ogrodem Botanicznym - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej Polskiej Akademii Nauk w Powsinie. W 2001 roku rozpoczęłam badania związane z realizacją mojej pracy doktorskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Jana J. Rybczyńskiego. Badania dotyczyły oceny zdolności morfogenetycznych wielo- i jednokomórkowych eksplantatów wybranych gatunków

z rodzaju *Gentiana* (*G. kurroo*, *G. cruciata*, *G. tibetica*, *G. lutea* and *G. pannonica*) oraz analizy roślin regenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy. Badania te realizowałam między innymi w ramach projektu badawczego pt. „Somatyczna hybrydyzacja goryczek z zastosowaniem somatycznej embriogenezy i transformacji.” (MNiSW nr. 3P04C03723), w którym uczestniczyłam jako główny wykonawca. W pracy wykorzystałam elementy siewek (korzeń, hypokotyl i liścienie), liście oraz zawiesziny komórkowe stanowiące eksplantaty wielokomórkowe. Eksplantaty jednokomórkowe stanowiły protoplasty zawieszin komórkowych i komórek mezofilu liści. W celu indukcji somatycznej embriogenezy zastosowałam pożywki zawierające auksyny: 2,4-D, NAA i dicamba oraz cytokininy: zeatynę, TDZ, CPPU, BAP i kinetnę w różnych stężeniach i kombinacjach. Liczba uzyskanych zarodków zależała od gatunku, pochodzenia eksplantatu, zastosowanych regulatorów wzrostu oraz ich stężenia w pożywce. Kombinacje pożywek, w których skład wchodziły NAA i dicamba najintensywniej stymulowały proces somatycznej embriogenezy na eksplantatach liści. Spośród badanych gatunków, *G. kurroo* wykazywała największe zdolności morfogenetyczne, natomiast na żadnej z zastosowanych kombinacji roślinnych hormonów wzrostu nie otrzymałam zarodków somatycznych dla *G. lutea*. Fragmenty siewek charakteryzowały się większymi zdolnościami morfogenetycznymi i bardziej jednorodną reakcją, niż eksplantaty liści, które regenerowały zarówno tkankę kalusową, korzenie, jak i zarodki somatyczne. Najwyższą wydajność procesu somatycznej embriogenezy uzyskałam na liścieniach w obecności pożywki indukcyjnej MS uzupełnionej 0,5 mg/l 2,4-D i 1,0 mg/l kinetyny. Natomiast w przypadku protoplastów zarówno wiek, jak i pochodzenie tkanki miały istotny wpływ na rozwój kultury. Kilkakrotne podziały komórkowe zielonych protoplastów tkanki mezofilowej liści uzyskiwałam tylko wówczas, gdy do eksperymentów wykorzystane zostały pierwsze liście siewek. W kulturach protoplastów zawieszin komórkowych, spośród przebadanych 54 kombinacji różniących się: typem kultury, rodzajem pożywki, wielkością frakcji i pochodzeniem zawiesziny, najlepsze rezultaty uzyskałam dla zawiesziny liścieniowej w kroplach agarozowych na pożywce PCM4 (MS bez (NH₄NO₃) + 30 g/l glukozy + 3,0 g/l glutaminy + 2,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l dicamba + 0,1 mg/l NAA + 80,0 mg/l siarczan adeniny + 9,0% mannitol). Co ciekawe, w kulturach protoplastów młodych zawieszin komórkowych możliwe było uzyskanie bezpośredniej somatycznej embriogenezy z pojedynczego protoplastu. W trakcie realizacji badań do pracy doktorskiej nawiązałam współpracę z dr Henrykiem Bilskim (Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie) oraz z zespołem prof. dr hab. Mieczysława Kurasia (Pracownia Ekotoksykologii, Instytut Botaniki UW w Warszawie), co zaowocowało szczegółowym zobrazowaniem procesu somatycznej embriogenezy przy użyciu mikroskopii elektronowej skaningowej i transmisyjnej. Do analizy proteomicznej poszczególnych stadiów rozwoju ontogenetycznego zarodków somatycznych zastosowałam dwukierunkową analizę białek (2-DE). Największe zmiany w ekspresji białek związanych z rozwojem zarodków obserwowałam w profilach białkowych pomiędzy zarodkami globularnymi i liścieniowymi. Badania proteomiczne wykonałam pod kierunkiem dr Andrzeja Kalinowskiego w Pracowni Mieszkańców Oddalonych, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Kolejne analizy prowadzone w ramach pracy doktorskiej obejmowały charakterystykę regenerantów uzyskanych w kulturach *in vitro*. Nawiązanie współpracy z prof. dr hab. Jolantą Małuszyńską (Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach) oraz prof. dr hab. inż. Elwirą Śliwińską (Katedra Genetyki, Fizjologii

i Biotechnologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii UTP Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy) pozwoliło mi na ocenę liczby chromosomów oraz zawartości DNA w roślinach uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Największą zmiennością zawartości DNA charakteryzowały się regeneranty pochodzące z kultur protoplastowych, co można tłumaczyć występowaniem licznych spontanicznych fuzji. Nie stwierdziłam natomiast zmian w przebadanej puli roślin regenerowanych na eksplantatach liści oraz z zawiesin komórkowych pochodzenia hypokotylowego. Zawartość DNA była tutaj skorelowana z liczbą chromosomów. Molekularną część analiz w ramach rozprawy doktorskiej wykonałam w Zakładzie Biotechnologii i Fizjologii Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie pod kierownictwem dr Piotra Bednarka. Za pomocą analizy AFLP wykazałam zróżnicowanie poziomu zmienności somaklonalnej badanych regenerantów *G. kurroo* w zależności od rodzaju eksplantatu, z którego zostały otrzymane. Najwyższą zmienność wynoszącą 18,5% otrzymałam dla regenerantów zawiesiny komórkowej pochodzenia liścieniowego. Ponadto wraz z prof. dr hab. Heleną Gawrońską (Samodzielny Zakład Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa, SGGW w Warszawie) oraz prof. dr hab. Bożeną Borkowską (Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach) udowodniłam, że 0,3% stężenie sacharozy w pożywce regeneracyjnej wpływa korzystnie na zdolności fotosyntetyczne regenerantów *G. kurroo*.

Bezpośredni udział w wykonaniu większości analiz oraz przygotowaniu materiału do ich realizacji pozwolił mi na opanowanie szeregu różnorodnych technik analitycznych. Wszystkie uzyskane wyniki zostały włączone w skład mojej pracy doktorskiej i opublikowane po jej obronie w czasopismach naukowych (pozycje **IIA2.3-8**, **IID1.1-4** oraz **IID2.4, 6, 7** w wykazie publikacji). Część z nich prezentowałam na krajowych konferencjach naukowych w formie referatów (pozycje **IIK1.1-5** oraz **IIK2.4** w wykazie dorobku naukowego) lub posterów (pozycje **IIIB1.3, 4, 5, 7, 8** oraz **IIIB2.19, 23** w wykazie dorobku naukowego).

Kolejnym wątkiem badawczym w mojej działalności naukowej, który realizowałam w ramach wymienionego wcześniej projektu (MNiSW nr. 3P04C03723) było opracowanie warunków fuzji protoplastów goryczek. Ustaliłam, że optymalna wysokość napięcia prądu zmiennego (AC) podczas fuzji protoplastów izolowanych z tkanki mezofilowej liści siewek *G. cruciata*, *G. pannonica* i *G. tibetica* oraz zawiesin komórkowych *G. kurroo* i *G. cruciata* (w różnych kombinacjach) powinna wynosić 67 V/cm. Wysokość napięcia prądu stałego (DC) zależała od gatunków poddanych fuzji. Najwyższą wydajność fuzji (6,72%) otrzymałam dla kombinacji protoplastów mezofilu liści *G. cruciata* i zawiesin komórkowych *G. kurroo* stosując DC o napięciu 1,33 kV/cm. Wysoką liczbę heterokarionów (4,80%) obserwowałam również dla kombinacji protoplastów mezofilu liści *G. tibetica* i zawiesin komórkowych *G. cruciata* po zastosowaniu DC o napięciu 1,17 kV/cm. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie publikacji (pozycja **IID2.6** w wykazie dorobku naukowego) oraz posterów (pozycja **IIIB1.1, 2** oraz **IIIB2.20-22, 24** w wykazie dorobku naukowego).

W 2007 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku adiunkta w Pracowni Markerów Molekularnych Zakładu Biochemii i Fizjologii Roślin IHAR-PIB kierowanej wówczas przez prof. dr hab. Andrzeja Anioła. W latach 2007-2010 byłam głównym wykonawcą projektu nr PBZ/2/3/2006 finansowanego przez MNiSW pt. „Identyfikacja oraz mapowanie markerów molekularnych tolerancyjności na glin w zbożach.” Podczas realizacji projektu współpracowałam z dr Grzegorzem Budzianowskim oraz dr Henrykiem Cichym z Hodowli

Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Małyszyn. W latach 2012 - 2017 byłam kierownikiem tematu pt. „Poszukiwanie molekularnych markerów genów warunkujących tolerancję na glin w zbożach.” realizowanego w ramach działalności statutowej IHAR-PIB. Uzyskane dotychczas wyniki badań w większości stanowią prezentowane przeze mnie „osiągnięcie naukowe”. Podczas realizacji prac opanowałam liczne metody służące do genotypowania roślin (SSR, AFLP, metAFLP, MSAP, DART). Jestem w stanie posługiwać się nowoczesnymi metodami statystycznymi pozwalającymi na konstrukcję map genetycznych oraz identyfikację QTLi na bazie wyników analiz molekularnych (Rqtl, JoinMap, MapQTL, WinQTLCart, MapChart). W roku 2012 otrzymałam zaproszenie od PhD Jordi Comadran do odbycia wizyty naukowej w The James Hutton Institute (Szkocja), dzięki której mogłam poszerzyć swoją wiedzę i umiejętności z zakresu analiz statystycznych wyników mapowania asocjacyjnego z użyciem programów R-CRAN oraz GenStat. Zdobytą wiedzę wykorzystuję na bieżąco do realizacji prowadzonych obecnie badań.

Moje ostatnie zainteresowania związane są z epigenetycznymi aspektami tolerancji na glin u pszenżyta. Skłoniły mnie one do poszukiwania metod analizy tego zjawiska. Jedną z takich metod jest dosyć powszechnie stosowana analiza MSAP, wykorzystująca do trawienia genomowego DNA izoschizomery *HpaII* i *MspI*. Endonukleazy te są wrażliwe na metylację w miejscu cięcia DNA w sekwencji rozpoznawanej: 5'-CCGG-3', przy czym *HpaII* jest niewrażliwy na metylację zewnętrznej, a *MspI* wewnętrznej cytozyny. Warianty interpretacji wyników metody MSAP opisane w literaturze różnią się interpretacją wzorów prążkowych, a wyniki uzyskiwane przez różnych badaczy są trudne do porównywania. Wnikliwe prześledzenie stosowanych dotychczas metod oraz potencjalnych miejsc cięcia stosowanych enzymów w zależności od usytuowania grupy metylowej pozwoliło na zaproponowanie nowatorskiej metody (pozycja **IIA2.1** w wykazie publikacji) umożliwiającej między innymi ilościową ocenę zmian wzorów metylacji DNA (metylację *de novo* oraz demetylację z uwzględnieniem czy zachodzi ona w miejscach CG czy CHG).

Innym nurtem realizowanych przeze mnie badań jest analiza zjawiska cytoplazmatycznej męskiej sterility pyłku pod kątem jego wykorzystywania w hodowli heterozyjnej roślin uprawnych. Badania te prowadzone są w ramach dwóch projektów naukowych kierowanych przez dr hab. prof. IHAR-PIB Piotra Bednarka i finansowanych przez MRiRW pt. „Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterility pyłku u pszenżyta z *cms-Tt*” (nr HOR hn 801-12/14, L.p. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 15) oraz „Poszukiwanie markerów molekularnych genów przywracania płodności pyłku u żyta (*Secale cereale* L.) z CMS Pampa” (nr HOR hn 801-12/14, L.p. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 21). Celem tych badań jest identyfikacja markerów molekularnych DNA (DART, DARTseq, GBS) silnie sprzężonych/asocjowanych z jądrowymi genami utrzymania sterility pyłku u pszenżyta z *cms T. timopheevi* oraz z genami przywracania płodności pyłku u żyta z *cms Pampa* występującymi w obrębie badanych populacji RIL (ang. Recombinant Inbred Line) oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej. Mój udział w realizacji ww. projektów polega między innymi na wyprowadzaniu kolejnych pokoleń linii RIL w polu (głównie izolacja kłosów), wykonywaniu krzyżowań linii matecznych (*cms Tt*) z liniami RIL (określenie fenotypu na podstawie ilości zawiązywanych ziarniaków), zbiorze materiałów do izolacji DNA, izolacji i przygotowaniu DNA do analiz molekularnych, porządkowaniu danych oraz wykonaniu mapowania asocjacyjnego. W trakcie realizacji badań odbyłam wizytę naukową

w United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS), Kansas State University (USA), gdzie miałam okazję zapoznać się z procedurą GBS (ang. genotyping-by-sequencing) stanowiącą połączenie wykorzystania enzymów restrykcyjnych do kontrolowanej redukcji złożoności genomu z technologią sekwencjonowania nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS). Markery GBS, wraz z DArTseq i silicoDArT posłużyły do opracowania map genetycznych dla pięciu populacji mapujących pszenżyta. Podobne analizy wykonano dla populacji żytnich wykorzystując do tego celu markery DArTseq i silicoDArT. Interwałowe mapowanie kompozytowe (ang. Composite Interval Mapping) oraz mapowanie asocjacyjne dla obu gatunków zbóż wykazało, że cecha ma charakter złożony i jest warunkowana licznymi genami o niewielkich efektach jednostkowych. Otrzymane dotychczas wyniki zostały zaprezentowane na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych (pozycje **IIIB2.1, 3, 5-8, 10** w wykazie dorobku naukowego).

Perspektywy dalszych badań

Dotychczasowe wyniki badań zainspirowały mnie do poszukiwań mechanizmów sterujących odpowiedzią pszenżyta na stres glinowy oraz związanych z nimi genów/białek. W ramach tematu MRiRW/IHAR-PIB nr DS 1-1-03-4-03 przeprowadziłam dwukierunkową analizę białek (2-DE) dla linii T i NT pszenżyta prowadzonych w warunkach kontrolnych oraz stresu glinowego. Zidentyfikowałam 25 białek wykazujących zmiany ekspresji pod wpływem stresu w wierzchołkach korzeni linii NT. W linii T stres Al nie powodował trwałych zmian w wierzchołkach korzeni. Wyniki tych analiz zostaną zaprezentowane w formie publikacji.

Współpracuję również z dr hab. prof. UR Jackiem Żebrowskim z Zakładu Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rzeszowskiego. Celem niniejszej współpracy jest identyfikacja biochemicznych zmian w obrębie korzeni linii T i NT pszenżyta pod wpływem stresu Al za pomocą spektrometru furierowskiego (FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy). Wyniki analizy FTIR są obecnie na etapie opracowywania.

Kolejnym zadaniem, którego planuję się podjąć będzie analiza profili metylacji DNA w genomie pszenżyta oraz analiza transkryptomu i małych RNA roślin poddanych stresowi Al i kontrolnych w celu określenia korelacji pomiędzy zmianami na poziomie metylomu, wywołanymi stresem Al, oraz ich wpływem na obserwowane zmiany w ekspresji genów. Sekwencje DNA różnicujące formy T i NT na działanie jonów Al^{3+} będą porównywane z sekwencjami w bazach danych celem określenia i powiązania z genami tolerancyjności. Badania te na etapie wstępnym będą prowadzone w ramach tematu MRiRW/IHAR-PIB nr DS 1-1-03-4-03, a docelowo planowane jest zgłoszenie projektu badawczego obejmującego przedstawioną tematykę.

W dalszym ciągu jestem również współwykonawcą projektów dotyczących analizy zjawiska cytoplazmatycznej męskiej sterylności u żyta i pszenżyta. W najbliższym dwóch latach zostanie przeprowadzone genotypowanie oraz fenotypowanie populacji pszenżytnich RIL8, które dotychczas nie zostały objęte podobnymi badaniami, a także identyfikacja markerów cechy. Ostatecznym rezultatem będzie opracowanie zestawu markerów genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms *Tt*. Dla żyta planowana jest selekcja genotypów o pożądanych kombinacjach genów przywracania płodności pyłku z wykorzystaniem dostępnych materiałów roślinnych w oparciu o zidentyfikowane markery molekularne.

Od wielu lat kontynuuję również współpracę z prof. dr hab. Janem J. Rybczyńskim z Ogrodu Botanicznego - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w zakresie badań nad zjawiskiem somatycznej embriogenezy goryczek. Wynikiem tej współpracy są wspólne publikacje przeglądowe (pozycja **IID2.4** w wykazie dorobku naukowego oraz praca pt. „Somatic embryogenesis of species in the family *Gentianaceae* and its biotechnological application.” *Frontiers in Plant Science* - obecnie w recenzjach).

F. ZESTAWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

1. ZESTAWIENIE DOROBKU PUBLIKACYJNEGO PRZED I PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Tab. 1. Liczba, miejsce i rodzaj opublikowanych prac naukowych

Miejsce opublikowania	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Czasopisma posiadające współczynnik wpływu IF	2	14	16
Czasopisma z listy B	3	5	8
Materiały konferencyjne	1	0	1
Monografie /rozdział monografii w języku angielskim	1	1	2
Monografie /rozdział monografii w języku polskim	0	1	1
Suma	7	21	28
W tym jako pierwszy autor w publikacjach	1	15	17
W tym jako autor korespondencyjny w publikacjach	1	10	12
Rodzaj publikacji			
Prace oryginalne	5	15	20
Prace przeglądowe	2	6	8

Tab. 2. Liczba i rodzaj wystąpień

Rodzaj wystąpienia	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Konferencje międzynarodowe	5	21	26
Konferencje krajowe	10	8	18
Seminaria	0	5	5
Suma	15	34	49
Prezentacje ustne na konferencjach:			
Międzynarodowych	0	0	0
Krajowych	3	2	5
Prezentacje posterowe na konferencjach:			
Międzynarodowych	4	20	24
Krajowych	5	5	10
Suma wystąpień	3	2	5
Suma prezentacji posterowych	9	25	34
Łącznie	12	27	39

Tab. 3. Liczba wykonanych recenzji manuskryptów

Czasopismo	Rok	Liczba recenzji
Po uzyskaniu stopnia doktora		
Acta Physiologiae Plantarum	2007	2
Acta Physiologiae Plantarum	2008	6
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2008	6
Acta Physiologiae Plantarum	2009	6
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2009	1
Acta Physiologiae Plantarum	2010	5
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2010	2
Acta Physiologiae Plantarum	2011	2
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2011	1
Acta Physiologiae Plantarum	2012	5
Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2012	1
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2012	2
Acta Physiologiae Plantarum	2013	2
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2013	3
Acta Physiologiae Plantarum	2014	8
Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2014	4
Acta Physiologiae Plantarum	2015	3
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2015	1
Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2015	3
Acta Physiologiae Plantarum	2016	2
In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant	2016	1
Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2016	4
Plant Breeding	2016	1
Acta Physiologiae Plantarum	2017	3
Acta Physiologiae Plantarum	2018	3
Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2018	1
Łącznie	2007-2017	78

2. WSKAŹNIKI BIBLIOMETRYCZNE

Tab. 1. Parametryczna ocena dorobku naukowego – zestawienie[#]

Nazwa parametru	Przed uzyskaniem stopnia doktora *	Po uzyskaniu stopnia doktora **	Łącznie***
IF	1.209	20.642 [^]	21.851
MNiSW	35	347	382
Liczba cytowani (WoS)	4	156	160
Index Hirscha (WoS)	1	7	8

Wyszukiwano (WoS) wg frazy: Niedziela A* or Fiuk A* or Niedziela Agnieszka* or Fiuk Agnieszka* uwzględniając poprzednie nazwisko

[^] W przypadku jednej publikacji uwzględniono IF z 2013r po nadaniu nr DOI i ukazaniu się na stronach internetowych

* dla 7 prac wydanych do końca 2005r. (w tym 2 prac na liście WoS do uzyskania stopnia dr)

** dla 21 publikacji od 2006 do 2018 (28.08.2018) (w tym 14 prac na liście WoS od daty uzyskania stopnia dr)

*** dotyczy cytowań wszystkich 28 publikacji do 28.08.2018r.

3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ W PRACY NAUKOWEJ

Pozostałe osiągnięcia naukowe i dydaktyczne przedstawiłam w „Wykazie opublikowanych prac naukowych oraz informacjach o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.”, stanowiącym **załącznik 6** dokumentacji.



Podpis Wnioskodawcy