

Wrocław, 14.03.2024 r.

Prof. dr hab. Henryk Bujak  
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych w Słupi Wielkiej

### Ocena

**osiągnięcia naukowego oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Moniki Krzewskiej w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo przez Radę Naukową Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**

### Informacje ogólne

Dr Monika Krzewska jest absolwentką Akademii Pedagogicznej (obecnie Uniwersytet Pedagogiczny) im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie. Dyplom magistra biologii w zakresie biologii z nauczaniem przyrody i wychowaniem zdrowotnym otrzymała w 2008 roku na podstawie pracy pt. „Analiza przebiegu mejozy u dwóch mieszańców żyta” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Józefa Krawczyka.

Stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia uzyskała w 2013 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Fizjologiczne i molekularne podłoże podatności na indukcję androgenezę u pszenżyta (*xTriticosecale* Wittm.)” zrealizowanej w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Żur.

Pracę zawodową dr Monika Krzewska podjęła w 2008 roku w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, gdzie została zatrudniona na stanowisku technicznym. Od 2013 roku do chwili obecnej pracuje w Instytucie Fizjologii Roślin PAN na stanowisku adiunkta. W latach 2009 – 2010 pracowała dodatkowo na stanowisku technicznym na Uniwersytecie Pedagogicznym im. Komisji Edukacji Naukowej w Krakowie i prowadziła zajęcia na studiach podyplomowych „Biologia molekularna z elementami biotechnologii”.

W trakcie pracy w Instytucie dr Monika Krzewska stale podnosiła swoje kwalifikacje zawodowe uczestnicząc w szkoleniach, kursach, warsztatach, krajowych i międzynarodowych konferencjach oraz zagranicznych stażach naukowych. Odbyła staże w dwóch zagranicznych placówkach naukowych:

- 1) Instytut Genetyki Roślin i Biotechnologii Słowackiej Akademii Nauk w Nitrze; Słowacja; zapoznała się z metodami wykorzystywanymi w badaniach proteomicznych, w tym analizą profili białkowych z wykorzystaniem metody 2DE, analizą elektroforegramów za pomocą programu komputerowego PDQuest oraz wykonała wstępne analizy profilu białkowego pylników pszenżyta pod kątem efektywności indukcji embriogenezy mikrospor (w sumie 4 tygodnie w trakcie trzech pobytów w Instytucie),
- 2) Estación Experimental de Aula Dei Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Saragossa, Hiszpania; zapoznała się z metodami wykorzystywanymi w badaniach molekularnych, m. in. z techniką RT-PCR do analizy ekspresji genów oraz wykonała

profile ekspresji genów związanych z efektywnością indukcji embriogenezy mikrospor pszenżyta ozimego (2 tygodnie).

Dzięki pobytom w zagranicznych palcówkach naukowych oraz współpracy z szeregiem krajowych jednostek naukowych poszerzała swoją wiedzę oraz warsztat badawczy z zakresu biologii molekularnej, analizy profili białkowych i ekspresji genów zaangażowanych w indukcję embriogenezy mikrospor u pszenżyta. Praktyczne umiejętności pracy w laboratoriach biotechnologicznych umożliwiły jej realizację projektów badawczych finansowanych ze źródeł Narodowego Centrum Nauki oraz Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

### **Ocena osiągnięć naukowo-badawczych**

Dr Monika Krzewska jako osiągnięcie naukowe, w staraniach o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego przedstawia cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „**Identyfikacja loci genów oraz białek regulujących proces embriogenezy mikrospor i produkcję podwojonych haploidów pszenżyta ozimego ( $\times$  Triticosecale Wittm.)**”. W skład osiągnięcia naukowego wchodzi następujące pozycje:

- 1) **Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Golebiowska-Pikania G., Golemiec E., Stojalowski S., Chrupek M., Żur I. (2012). Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) anther culture. Plant Cell Reports, 31(11):2099-2108. doi: 10.1007/s00299-012-1320-2. (MNiSW 100 pkt; IF = 6,2)**
- 2) **Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Gołębiowska-Pikania G., Żur I. (2015). Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green versus albino ratio determinants in triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) anther culture. Euphytica, 206: 263-278. doi: 10.1007/s10681-015-1509-x. (MNiSW 70 pkt; IF = 1,9)**
- 3) **Krzewska M., Gołębiowska-Pikania G., Dubas E., Gawin M., Żur I. (2017) Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in winter triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.). Euphytica, 213:192. doi: 10.1007/s10681-017-1978-1. (MNiSW 70 pkt; IF = 1,9)**
- 4) **Krzewska M., Dubas E., Gołębiowska G., Nowicka A., Janas A., Zieliński K., Surówka E., Kopeć P., Mielczarek P., Żur I. (2021) Comparative proteomic analysis provides new insights into regulation of microspore embryogenesis induction in winter triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) after 5-azacytidine treatment. Scientific Reports, 11: 22215. doi: 10.1038/s41598-021-01671-y. (MNiSW 140 pkt; IF = 4,6)**

Wyżej wymieniony cykl publikacji oryginalnych, które stanowią jednotematyczną spójną całość, został opublikowany w latach 2012-2021 w czasopismach zajmujących wysokie pozycje na liście JCR. Sumaryczny Impact Factor tych publikacji przyrównany do roku 2022 wg listy Journal Citation Reports wynosi 14,6, a liczba punktów MNiSW wynosi 380. We wszystkich czterech publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe dr Monika Krzewska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Publikacje te są pracami zbiorowymi, a więc ocenie podlega wyłącznie zakres prac realizowanych przez Habilitantkę. Są one wskazane przez zainteresowaną, która dla każdej z prac określiła swój indywidualny wkład, co jest zgodne z załączonym oświadczeniem. Udział własny Habilitantki w publikacjach współautorskich polegał na współtworzeniu koncepcji badań, zdobywaniu środków na badania, wykonaniu części eksperymentów i analiz, zebraniu i opracowaniu wyników ze wszystkich

eksperymentów, interpretacji wyników oraz współdziałanie w opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptów oraz korespondencji z redakcją czasopism, w których publikowane były artykuły.

Celem badań cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe dr Moniki Krzewskiej było poszerzenie wiedzy na temat molekularnego i fizjologicznego podłoża procesu embriogenezy mikrospor poprzez identyfikację rejonów genomu pszenżyta i potencjalnych genów oraz białek związanych z regulacją i efektywnością tego procesu.

W pierwszej pracy pt. „Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) anther culture” (Plant Cell Reports, 2012) Habilitantka skupiła się na zależeniu loci cech ilościowych (QTL) związanych z reaktywnością androgeniczną u pszenżyta. Analizowała takie parametry, jak indukcja zarodków androgenicznych, całkowita regeneracja i zdolność regeneracji roślin zielonych oraz dwie cechy opisujące końcową wydajność androgenyzy. Wykazała łącznie wpływ 28 QTL, które są zlokalizowane na 5 chromosomach z genomów A i R mające wpływ na embriogenezę mikrospor u pszenżyta. Indukcja androgenyzy była związana z siedmioma QTL wykrytymi na chromosomach 5A, 4R, 5R i 7R, jako regiony zawierające markery istotnie powiązane z tą cechą, natomiast na chromosomach 5A, 2BL, 7B i 5R wskazała dodatkowe powiązane z tą cechą markery. Zarówno całkowita, jak i zdolność do regeneracji zielonych siewek były kontrolowane przez geny zlokalizowane na chromosomie 4A. Niektóre z QTL, które wpływały na końcową wydajność androgenyzy były identyczne z QTL związanymi z androgeniczną indukcją zarodków, co sugeruje, że obserwowana korelacja może być wynikiem ich ścisłego powiązania lub plejotropii. Wykryte loci sprzężone z cechą podatności na embriogenezę mikrospor mają duże walory poznawcze i przyczyniają się do lepszego poznania tego zjawiska u pszenżyta.

W drugiej pracy pt. „Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green versus albino ratio determinants in triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) anther culture” (Euphytica, 2015) Kandydatka skupiła się nad wyjaśnieniem przyczyn wysokiej częstotliwości albinotycznych haploidów/podwojonych haploidów (DH), regenerowanych w kulturach androgenicznych. Uzyskiwane dużej liczby roślin albinotycznych jedną z głównych przeszkód ograniczających stosowanie technologii DH w programach hodowli zbóż. Analizy prowadzone na tej samej populacji mapującej co w pierwszej pracy, pozwoliły na identyfikację markerów związanych z cechą regeneracji roślin albinotycznych na dwóch chromosomach genomu B (3B, 4B) i trzech genomu R (4R, 5R i 7R). Największa liczba QTL związanych z cechą podatności na regenerację roślin albinotycznych zlokalizowanych zostało w subgenomie żytnim R. Uzyskane wyniki potwierdzają informacje literaturowe, że żyto jest gatunkiem trudnym i charakteryzującym się opornością na regenerację w kulturach *in vitro*. Badania te wykazały ponadto, że stres oksydacyjny wywołany niskimi temperaturami powoduje zakłócenie endogennej równowagi hormonalnej i jest niezbędny do przejścia z нефотосынтетических пропластидов do funkcjonalnych chloroplastów. Uzyskane w pracy wyniki po pierwsze identyfikują rejony chromosomów odpowiedzialne za tworzenie się albinotycznych roślin, a po drugie wyjaśniają, że niskie temperatury mogą powodować rozwój funkcjonalnych chloroplastów i tym samym przyczyniają się do ograniczenia tworzenia się roślin albinotycznych w kulturach pylnikowych pszenżyta, co jest bardzo ważnym efektem praktycznym tej pracy.

W trzeciej pracy cyklu pt. „Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in winter triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.)” (Euphytica, 2017) dla lepszego zrozumienia fizjologicznych podstaw mikrosporoembriogenezy (ME) u pszenżyta, Habilitantka przeprowadziła analizę profilu białkowego w czterech liniach pszenżyta ozimego (DH) o skrajnie różnym potencjale do embriogenezy. Analizy przeprowadziła na pylnikach w optymalnej fazie rozwoju dla indukcji embriogenezy

mikrospor, a także na pylnikach z roślin poddanych stresowi niskiej temperatury. Porównanie profili białkowych pozwoliło na wyłonienie białek istotnie różnicujących badane obiekty, a zatem potencjalnie zaangażowanych w proces indukcji i regulację efektywności embriogenezy mikrospor. W sumie zidentyfikowano 31 białek zaangażowanych w zmianę kierunku rozwoju, odpowiedzią na stres, jak i regulacją procesu indukcji embriogenezy mikrospor. Badania wykazały, iż o poziomie kompetencji mikrospor do zmiany kierunku rozwoju decydują zapasy dostępnej energii oraz wydajny system obrony komórki, który warunkuje późniejsze przetrwanie podczas długotrwałego działania czynnika stresowego indukującego EM. Białka akumulowane u linii podatnej na EM jeszcze przed zastosowaniem traktowania indukującego EM zaangażowane były głównie w procesy metaboliczne: metabolizm aminokwasów białkowych, np. metioniny, regulację wiązań peptydowych podczas biosyntezy białek na rybosomach, transport jonów przez błony komórkowe, regenerację rybulozo-1,5-bisfosforanu w szlaku pentozofosforanowym czy metabolizm azotu, np. detoksykację amoniaku. Z kolei traktowanie kłosów czynnikiem indukującym EM skutkowało akumulacją białek typowych dla reakcji obronnych związanych ze wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), występującą w warunkach stresu. W odpowiedzi na stres indukujący EM obserwowano akumulację enzymów zaangażowanych w biosyntezę białek, takich jak czynnik elongacyjny Tu, izomeraza disiarczkowa, czy białek opiekuńczych, które odpowiadają za prawidłowy przebieg fazy elongacji podczas biosyntezy łańcucha polipeptydowego i uformowanie nowo powstałego białka. Zanotowano również wyższy poziom akumulacji białek odpowiedzialnych za post-transkrypcyjną regulację ekspresji genów (białko wiążące RNA indukowane niskimi temperaturami). Ponadto, analiza porównawcza profili białkowych pylników pszenżyta wykazała wzrost poziomu akumulacji białek zaangażowanych w metabolizm węgla, takich jak beta galaktozydaza, która bierze udział w biosyntezie polisacharydów wchodzących w skład ścian komórkowych oraz dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, jednego z kluczowych enzymów w procesie glikolizy. Większość zidentyfikowanych białek związanych z efektywną indukcją EM pszenżyta ozimego zaangażowanych było w procesy metaboliczne, takie jak hydroliza skrobi (beta amylaza), glikoliza (fruktokinaza), biosynteza etylenu, polyamin czy procesy metylacji (syntaza S-adenozylometioniny), w tym metylacji DNA i histonów, regulującej poziom ekspresji genów w kulturach pylników pszenżyta.

W ostatniej pracy cyklu pt. „Comparative proteomic analysis provides new insights into regulation of microspore embryogenesis induction in winter triticale (*×* *Triticosecale* Wittm.) after 5-azacytidine treatment” (Scientific Reports) Kandydatka przeprowadziła analizę zmian ekspresji genów i profili białkowych pylników izolowanych z kłosów tartkowanych czynnikiem indukującym EM w obecności lub braku inhibitora metylacji DNA (5-azacytidyny, AC). W pracy tej wykazała, że poziom metylacji DNA spowodował istotne różnice ilościowe i jakościowe w poziomie akumulacji syntezowanych białek, a także w liczbie struktur zarodkopodobnych oraz zdolności do regeneracji roślin zielonych w kulturach pylnikowych. Zastosowanie AC wpłynęło na zmianę poziomu akumulacji białek zaangażowanych w metabolizm cukrów, które odgrywają ważną rolę w procesie zmiany kierunku rozwoju mikrospor. Zmiany te polegały na zwiększonej akumulacji białek związanych z procesami katabolicznymi, miały wpływ na poziom białek odpowiedzi komórki na stres i regulację metabolizmu białek, w tym akumulację białek opiekuńczych, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów obronnych, chroniących prawidłową biosyntezę i dojrzewanie białek w warunkach stresu inicjującego proces EM, a także zmiany proteomiczne w ścianie komórkowej. Najważniejsze zmiany w profilu białkowym związane z wyższą efektywnością EM po zastosowaniu AC dotyczyły: zahamowania intensywnych procesów anabolicznych, głównie fotosyntezy, poprzez obniżenie poziomu akumulacji białek biorących udział w biosyntezie chlorofilu, RuBisCO czy w reakcjach zależnych od światła; przejścia do efektywnego katabolizmu i mobilizacji rezerw węglowodanowych m.in. poprzez wyższy

poziom akumulacji enzymów biorących udział w glikolizie, rozkładzie skrobi czy sacharozy w celu zaspokojenia intensywnych potrzeb energetycznych mikrospor zmieniających kierunek rozwoju oraz uruchomienia skutecznej obrony przed stresem indukowanym traktowaniem kłosów niską temperaturą, tj. zapewnienia prawidłowego fałdowania białek syntetyzowanych *de novo* oraz skutecznej degradacji dysfunkcyjnych lub uszkodzonych białek. Powyższe wyniki są nowatorskie ze względu na identyfikację białek regulujących proces EM przebiegający w warunkach standardowo stosowanych procedur, jak również w warunkach inicjujących zmiany poziomu metylacji DNA i podnoszących efektywność procesu EM.

Reasumując, prace zawarte w jednotematycznym cyklu czterech publikacji o wspólnym tytule „Identyfikacja loci genów oraz białek regulujących proces embriogenezy mikrospor i produkcję podwojonych haploidów pszenżyta ozimego ( $\times$  *Triticosecale* Wittm.)” spełniają kryteria formalne (spójność tematyczna oraz dominujący udział Habilitantki w powstaniu osiągnięcia) i merytoryczne (oryginalność, znaczenie poznawcze), umożliwiające podjęcie starań o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Osiągnięcie naukowe dr Moniki Krzewskiej jest wartościowym wkładem w rozwój nauk rolniczych, a głównie genetyki i hodowli roślin, w tym przede wszystkim molekularnego i fizjologicznego podłoża procesu embriogenezy mikrospor poprzez identyfikację rejonów genomu pszenżyta i potencjalnych genów oraz białek związanych z regulacją i efektywnością tego procesu.

Uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę na temat molekularnego i fizjologicznego podłoża procesu androgenozy u pszenżyta ozimego, a także pozwoliły na identyfikację rejonów genomu oraz potencjalnych genów i białek związanych z regulacją i efektywnością tego procesu. Kandydatka zidentyfikowała rejony genomu pszenżyta związane z podatnością na indukcję embriogenezy mikrospor oraz regenerację roślin zielonych i albinotycznych oraz opracowała sprzężonych z nimi markery molekularne. Określiła także wpływ demetylacji DNA na ekspresję genów, związanych z procesem indukcji EM, takich jak GSTF2, TaTPD1-like i SERK2. Dr Monika Krzewska wskazała ponadto konkretne białka zaangażowane w indukcję EM u pszenżyta ozimego, wykazała pozytywny wpływ inhibitora metylacji DNA (5-azacytydyny) na efektywność indukcji EM oraz określiła wpływ obniżenia poziomu metylacji DNA na profil białkowy pylników pszenżyta ozimego w trakcie indukcji EM. Wyniki prowadzonych przez Habilitantkę badań przyczyniły się do istotnego poszerzenia wiedzy na temat molekularnego i fizjologicznego podłoża androgenozy u pszenżyta. Przeprowadzona charakterystyka molekularna i fizjologiczna populacji linii pszenżyta wyprowadzonej z mieszańca „Saka 3006” $\times$  „Modus” miała nie tylko aspekt poznawczy, ale także i użyteczny. Pozwoliła na optymalizację metody uzyskiwania linii DH w kulturach pylnikowych pszenżyta ozimego oraz wytypowanie, charakteryzujących się wysokim stopniem podatności na EM, linii DH jako potencjalnego źródła korzystnych alleli do twórczej hodowli twórczej. Markery zidentyfikowane jako silnie sprzężone z genami odpowiedzialnymi za podatność do androgenozy mogą ułatwić transfer tych alleli do innych genotypów pszenżyta przy użyciu selekcji wspomaganą markerami (MAS). Zgromadzona wiedza pozwala na wyznaczenie nowych kierunków badań podstawowych i aplikacyjnych dotyczących dalszego zgłębiania molekularnego i fizjologicznego tła procesu embriogenezy nie tylko u pszenżyta, ale także innych gatunków roślin uprawnych.

### **Ocena pozostałej działalności naukowej**

Na dorobek naukowy dr Moniki Krzewskiej składają się dodatkowo 22 oryginalne prace opublikowane w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (poza pracami wskazanymi jako osiągnięcie naukowe), w których występuje jako współwspółautorka, 3 prac opublikowanych w czasopiśmie spoza bazy JCR oraz 4 rozdziałów w wydawnictwach książkowych, w tym 3 wydanych przez Wydawnictwo Springer

i jeden rozdział w monografii pokonferencyjnej (w języku angielskim). Łącznie po doktoracie Habilitantka opublikowała 22 oryginalne prace naukowe, trzy rozdziały w książkach i jeden rozdział w anglojęzycznej monografii. Sumaryczny wskaźnik Impact Factor czasopism, w których Habilitantka je opublikowała wynosi 99,7 (zgodnie z rokiem 2022), w tym 89,3 po uzyskaniu stopnia doktora. Suma punktów według punktacji MNiSW wszystkich prac wynosi 2230, w tym po uzyskaniu stopnia doktora 1960. Liczba wszystkich cytowań publikacji Kandydatki według bazy WoS wynosi 420, a aktualny na dzień pisania opinii indeks Hirscha dr Moniki Krzewskiej (według bazy Web of Science) wynosi 13.

Dorobek naukowy dr Moniki Krzewskiej prezentowany w oryginalnych pracach twórczych i w doniesieniach konferencyjnych dotyczy zagadnień związanych z poznaniem struktury chromosomów u różnych gatunków żyta, a także skupia się na poznaniu fizjologicznych i molekularnych aspektów związanych z indukcją androgenyzy u pszenżyta, żyta, jęczmienia, rzepaku oraz poszukiwaniu sposobów zwiększenia jej wydajności, a także optymalizacją tworzenia linii podwojonych haploidów. Uzyskiwane wyniki mają nowatorski charakter i przyczyniają się do poszerzania wiedzy z tego zakresu, a na niektóre z nich chciałbym zwrócić uwagę poniżej.

Kandydatka prowadziła badania z zakresu cytogenetyki żyta oraz przebiegu mejozy u mieszańców międzygatunkowych tego gatunku. Analiza kariotypów diploidalnych gatunków żyta (*Secale ancestrale* Zhuk., *Secale africanum* Staph., *Secale dalmaticum* Viss i *Secale kuprianovii* Grossh) wykazała zróżnicowanie w budowie chromosomów (całkowita długość, indeks ramion) między badanymi gatunkami. Pozwoliła ona także na określenie wzoru rozmieszczenia heterochromatyny (prążki C), charakterystycznego dla danego typu morfologicznego chromosomu danego gatunku, a także wykazała istotne różnice w szerokości prążków telomerowych, lokalizacji i ilości prążków interkalarnych oraz obecności prążków centromerowych. Podobny układ prążków na chromosomach 1R, 2R, 4R i 7R, zidentyfikowała dla *Secale ancestrale* Zhuk., *Secale dalmaticum* Viss i *Secale kuprianovii* Grossh, co wskazuje na pokrewieństwo między tymi gatunkami. Odmienny układ prążków w chromosomach mitotycznych *Secale africanum* Staph. pośrednio dowodzi odrębności tego gatunku od pozostałych zbadanych. Obserwacje zachowania się chromosomów w mejozie u dwóch mieszańców żyta (*Secale africanum* Staph. × *Secale ancestrale* Zhuk. i *Secale dalmaticum* Viss × *Secale kuprianovii* Grossh), pozwoliło Habilitantce na identyfikację chromosomów pochodzących z genomu form rodzicielskich tych mieszańców. W trakcie podziałów mejotycznych, u obu mieszańców międzygatunkowych żyta, chromosomy wykazywały niepełną homologię, co utrudniało lub uniemożliwiało ich koniugację. W metafazie obserwowano wówczas obecność uniwalentów, a w anafazie chromosomów opóźnionych i/lub mostów anafazowych. Wykonana przez dr M. Krzewską cytogenetyczna analiza chromosomów dostarczyła podstawowych informacji o niektórych procesach zachodzących w ewolucji w obrębie rodzaju *Secale* L.

Ciekawe wyniki Habilitantka uzyskała w badaniach nad określeniem wpływu inhibitorów metylacji DNA na indukcję procesu embriogenezy mikrospor u pszenżyta ozimego. Celem tych badań była weryfikacja hipotezy zakładającej, iż obniżenie poziomu metylacji DNA wpływa na podniesienie efektywności indukcji embriogenezy w kulturach izolowanych mikrospor. Do zmian w ekspresji genów zaangażowanych w inicjację embriogenezy mikrospor zastosowała metodę hipermetylacji, wykorzystując dwa inhibitory enzymów przeprowadzających metylację – metylotransferaz DNA, 5-azacytydynę (AC) i jej pochodną 5-aza-2'-deoksyazacytydynę (DAC), w celu przeniesienia grupy metylowej na zasadę cytozynową w DNA. Wykazała, iż oba inhibitory aplikowane w trakcie traktowania kłosów istotnie obniżyły żywotność mikrospor. W swoich badaniach wykorzystwała zarówno linię podatną, jak i odporną na indukcję EM, co pozwoliło jej na wykazanie, że w przypadku

podatnej linii DH, pod wpływem AC następował istotny wzrost liczby uzyskiwanych struktur zrodkopodobnych (ELS) o wyższej zdolności do regeneracji roślin zielonych.

W analizowanej próbkę hydrolizatu DNA mikrospor zbadała całkowitą metylację DNA dla obu badanych linii. Wstępne traktowanie kłosów AC obniżyło średni poziom metylacji o około 1%, natomiast traktowanie DAC o około 2%. Ponadto, analiza immunolokalizacji 5-mdC w jądrach komórkowych mikrospor, wykazała, że niezależnie od tego czy do hipermetylacji stosowano AC czy DAC poziom demetylacji DNA był na podobnym poziomie.

Dr M. Krzewska wykazała także, że u linii DH, suplementacja pożywki indukcyjnej w AC stymulowała mikrospory do zmiany kierunku rozwoju i embriogenezy. W przypadku odpornej linii DH, po około 8 dniach kultury, zaobserwowała zahamowanie rozwoju embriogenicznych struktur, natomiast w kulturach zawieszinowych mikrospor podatnej linii DH uzyskiwała wzrost liczby rozwijających się ELS w porównaniu do kontroli. DAC cechował się wysoką cytotoksycznością i związaną z nią obniżoną żywotnością komórek w zawiesinach obu linii DH.

Ważnym, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i utylitarnym badań prowadzonych przez Kandydatkę jest wykazanie znaczenia rodzaju inhibitorów metylacji DNA, ich stężenia oraz sposobu traktowania tymi inhibitorami w aspekcie poznania podłoża indukcji procesu EM, jak i diagnostyki w badaniu zjawisk epigenetycznych wpływających na rozwój i różnicowanie komórki roślinnej. Zaproponowała także praktyczne wykorzystanie epigenetyki do indukcji EM u pszenżyta, którego to można dopatrzeć się w przypadku traktowania kłosów AC, a zaproponowana metoda HPLC do oceny ogólnego poziomu metylacji DNA hydrolizatu mikrospor, okazała się przydatnym sposobem na uzyskanie wstępnej informacji o genomowym poziomie metylacji w kontekście przewidywania podatności na indukcję EM.

Obiecujące wyniki badań dr M. Krzewskiej stanowią podstawą do dalszych badań nad praktycznym wykorzystaniem inhibitorów metylacji w podnoszeniu efektywności EM u zbóż oraz innych gatunków roślin uprawnych.

Okres po doktoracie to czas dużej aktywności naukowej Habilitantki zarówno w wymiarze prac oryginalnych, jak i w zakresie udziału w konferencjach naukowych, w tym zagranicznych. Posiada także duże doświadczenie w realizacji wielu grantów krajowych i europejskich, co świadczy o ukierunkowaniu badań zgodnie z zapotrzebowaniem gospodarki, a szczególnie rolnictwa i stałej zdolności do podejmowania coraz nowych wyzwań związanych z rozwojem rolnictwa, a w szczególności opracowywaniem metod pozwalających na przyspieszanie postępu biologicznego, który wesprze zrównoważony i przyjazny środowisku system upraw oraz zapewnieni bezpieczeństwa żywnościowe kraju. Głównym celem hodowców roślin jest tworzenie nowych, ulepszonych odmian o wysokim i stabilnym plonowaniu, charakteryzujących się lepszym dostosowaniem do zmieniających się warunków środowiska (odpornością na stresy biotyczne i abiotyczne), dlatego coraz częściej stosują w swoich pracach wydajne metody, które pozwalają na uzyskiwanie odmian w krótkim czasie. Nowe odmiany umożliwiają ograniczanie intensywności nawożenia i stosowania chemicznych środków ochrony roślin, a tym samym pozwalają na uzyskiwanie wysokiej prozdrowotnej jakości plonu i ochronę środowiska naturalnego. Badania naukowe Habilitantki wniosły i będą dalej wносиły istotny wkład w poznanie fizjologicznych, cytologicznych i molekularnych podstaw procesu embriogenezy mikrospor u roślin uprawnych. Pozwalają także na włączanie w tradycyjną hodowlę roślin nowoczesnych biotechnologicznych metod, w tym technik kultur *in vitro*, jako narzędzia skracania programów hodowli twórczej.

Działalność naukowa dr Monika Krzewska została w 2014 roku wyróżniona przez Dyrektora Instytutu Fizjologii Roślin PAN i habilitantka uzyskała nagrodę za najwyższą liczbę publikacji w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej w grupie pracowników młodszych. Na uwagę zasługuje także wyróżnienie pracy doktorskiej uchwałą Rady Naukowej IFR PAN oraz ukończenie studiów magisterskich w grupie 5% najlepszych absolwentów.



## Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Monika Krzewska całą swoją karierę naukową związała z Instytutem Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, czyli jednostką naukowo-badawczą. Jednak mimo tego posiada także udokumentowaną działalność dydaktyczną. Kandydatka w latach 2009-2010 przygotowywała materiały do zajęć i prowadziła zajęcia na studiach podyplomowych „Biologia molekularna z elementami biotechnologii” na Uniwersytecie Pedagogicznym im. Komisji Edukacji Naukowej w Krakowie. Prowadziła wykłady z przedmiotów Proteomika – zastosowanie i narzędzia oraz Wybrane techniki badania proteomu dla uczestników Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych PAN przy Instytucie Botaniki im. W. Szefera w Krakowie. Ponadto w ramach kursu pt. „Modern analytical techniques in research on haploidization of plants” dedykowanego dla doktorantów obcojęzycznych prowadziła wykład i zajęcia praktyczne pt. Proteomic studies in diversity of stress plant responses. Angażowała się także w zajęcia z przyrody dla uczniów szkół podstawowych oraz w nauczanie biologii dla uczniów gimnazjum i IV Liceum Ogólnokształcącego im. Tadeusza Kościuszki w Krakowie.

Dr inż. Monika Krzewska jest promotorem pomocniczym w otwartym w Studium Doktoranckim Nauk Przyrodniczych PAN przewodzie doktorskim, którego tytuł brzmi „Udział systemu antyoksydacyjnego i hormonów stresu w determinacji poziomu tolerancji jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na mróz i suszę glebową”.

Habilitantka aktywnie uczestniczyła w krajowych oraz międzynarodowych konferencjach naukowych, na których przedstawiała wyniki swoich badań w formie referatów lub posterów. Na konferencjach międzynarodowych przedstawiła łącznie 5 prac w formie referatów w języku angielskim, a 31 prac przedstawiła w postaci posterów, które prezentowała w trakcie sesji plakatowych. Ponadto na krajowych konferencjach wygłosiła 10 referatów, a 17 prac przedstawiła w postaci posterów. Streszczenia referatów oraz posterów zostały opublikowane w materiałach konferencyjnych

Dr Monika Krzewska daje się poznać jako osoba skutecznie poszukująca środków finansowych na swoje badania. Uczestniczyła łącznie w 10 zespołach badawczych realizujących projekty międzynarodowe i krajowe. Jeszcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora była wykonawcą międzynarodowego projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach akcji COST. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych kierowała jednym projektem Narodowego Centrum Nauki uzyskanego w ramach konkursu Preludium I, a w kolejnych sześciu finansowanych ze środków krajowych (NCN, NCBiR, MRiRW) jest wykonawcą. Ponadto uczestniczyła: w ramach polsko-słowackiego porozumienia pomiędzy Instytutem Fizjologii Roślin PAN a Instytutem Genetyki Roślin i Biotechnologii Słowackiej Akademii Nauk w Nitrze w realizacji czterech projektów: „Molecular markers in the analysis of auxin distribution in oilseed androgenic embryos”, „Molecular markers in auxin gradient in androgenic embryos of rape (*Brassica napus* var. *oleifera*)”, „Stress-inducible expression of arabinogalactans and defence-related proteins in relations to androgenesis initiation” i „Poszukiwanie białek odporności na pleśń śniegową u pszenżyta ozimego”; dwóch wspólnych polsko-belgijskich projektach badawczych na podstawie bilateralnych porozumień pomiędzy Instytutem Fizjologii Roślin PAN a VIB University w Dheut pt. „Auxin as a trigger in double haploids (DH) production of oilseed rape” i „Auxin as signalling in doubled haploid production of rape (*Brassica napus* var. *oleifera*)” oraz ramach polsko-hiszpańskiego bilateralnego porozumienia w realizacji projektu „N-butanol as a trigger inducing microspore embryogenesis in in vitro cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittm.)”.

Kandydatka współpracuje z otoczeniem społecznym i gospodarczym w ramach prowadzonych przez siebie projektów finansowanych ze środków NCBiR oraz MRiRW. Nawiązała współpracę z następującymi podmiotami sektora gospodarczego: Danko Hodowla



Roślin Sp. z o.o. oraz Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. w ramach badań naukowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, których efektem było opracowanie metody wyprowadzania linii podwojonych haploidów żyta i wdrożenie uzyskanych z tych linii nasion do programów hodowlanych tych firm. Ponadto brała udział w wyprowadzaniu linii DH jęczmienia ozimego (6600 linii), które zostały przekazane hodowli Danko, a następnie wprowadzone do programu hodowli twórczej i włączone do kolejnych doświadczeń przedrejestracyjnych.

### **Wniosek końcowy**

W świetle przeprowadzonej powyżej analizy osiągnięcia naukowego dr Moniki Krzewskiej stwierdzam, że ma ono dużą wartość dla rozwoju dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwa oraz stanowi znaczący naukowy i aplikacyjny wkład do badań nad poznaniem molekularnego, fizjologicznego i cytogenetycznego podłoża indukcji embriogenezy mikrospor u pszenżyta oraz innych gatunków roślin uprawnych. Na uwagę zasługuje stosowanie nowoczesnego warsztatu badawczego, w tym nowoczesnych metod biochemicznych, biotechnologicznych, molekularnych i bioinformatycznych. Jest osobą, która bardzo dobrze odnajduje się w pracy zespołowej grup badawczych oraz wykazuje duże zaangażowanie w działalność organizacyjną i dydaktyczną.

Podsumowując, w mojej opinii, dr Monika Krzewska **spełnia wszystkie wymagane warunki nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego** wymienione w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Przedstawiony jako osiągnięcie habilitacyjne cykl recenzowanych artykułów naukowych ma charakter spójny i jest tematycznie ze sobą powiązany oraz czasopisma znajdowały się w roku opublikowania w wykazie Ministerstwa właściwego do spraw nauki (pkt. 2b, art. 219.1.), publikacje z punktu widzenia genetyki odpornościowe i genetyki i hodowli roślin wnoszą nowe wartości i mają znaczny wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo (pkt. 2, art. 219.1.).

  
prof. dr hab. Henryk Bujak