

dr hab. inż. Tomasz Warzecha, prof. URK
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Ul. Łobzowska 24, 31-140 Kraków

Kraków, 20.02.2024 r.

RECENZJA

Osiągnięcia naukowego „**Identyfikacja loci genów oraz białek regulujących proces embriogenezy mikrospor i produkcję podwojonych haploidów pszenżyta ozimego (*× Triticosecale* Wittm.)**” oraz istotnej aktywności naukowej, Pani dr Moniki Krzewskiej, adiunkta w Instytucie Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. Franciszka Janowiaka Dyrektora Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w oparciu o Uchwałę nr 39/RN/2023 Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk z dnia 20.12.2023 r. w sprawie powołania Komisji Habilitacyjnej w postępowaniu w sprawie nadania dr Monice Krzewskiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauki rolnicze, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

1. Sylwetka Kandydatki

Pani dr Monika Krzewska ukończyła studia magisterskie w 2008 roku w Akademii Pedagogicznej (obecnie Uniwersytet Pedagogiczny) im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie. W 2013 r. po publicznej obronie rozprawy doktorskiej uzyskała stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii na podstawie rozprawy pt.: „Fizjologiczne i molekularne podłoże podatności na indukcję androgenezy u pszenżyta (*× Triticosecale* Wittm.)”. Promotorem rozprawy doktorskiej była Pani prof. dr hab. Iwona Żur. Na początku swojej drogi zawodowej była związana z Uniwersytetem Pedagogicznym im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie (UP) gdzie w latach 2009 - 2010 była pracownikiem technicznym przy studiach podyplomowych „Biologia molekularna z elementami biotechnologii”. Następna placówka naukowa gdzie pracowała Pani Doktor to Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, gdzie w latach 2009-2013 była pracownikiem technicznym. Natomiast od 2013 roku do chwili obecnej jest adiunktem w IFR PAN. Pani dr Monika Krzewska nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

2. Obowiązujące przepisy prawne

Aktualnie obowiązujące przepisy na podstawie których Kandydatka przygotowała dokumentację oraz przeprowadzana jest recenzja to art. 219 ust. 1 pkt. 2 i 3 ustawy z 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dziennik Ustaw z 2022 r. poz. 574 ze zm., dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Bazując na wymienionej

powyżej ustawie przeprowadzana jest ocena osiągnięcia naukowego oraz pozostałego opublikowanego dorobku naukowego Pani dr Moniki Krzewskiej.

3. Opinia o przedstawianym osiągnięciu naukowym

3.1.

Podstawą do wystąpienia z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo jest osiągnięcie naukowe bazujące na cyklu czterech publikacji pod tytułem „**Identyfikacja loci genów oraz białek regulujących proces embriogenezy mikrospor i produkcję podwojonych hapioidów pszenżyta ozimego (*× Triticosecale* Wittm.)**”.

3.2.

Liczba cytowań prac Kandydatki bez autocytowań według bazy Web of Science wynosi 263, natomiast w bazie Scopus, która generuje szersze wyniki to 320 (stan na 13.02.2024). Indeks Hirscha wg. bazy Web of Science wynosi 12, według Scopus 14 (stan na 13.02.2024). Aktywność publikacyjna po uzyskaniu stopnia doktora w 2013 roku, Pani Moniki Krzewskiej znacznie wzrosła i od 2014 roku publikuje artykuły głównie w czasopismach z listy JCR. To na pewno warto podkreślić gdyż daje możliwość zaprezentowania wyników swoich badań szerszej międzynarodowej społeczności naukowej. W wykazie tabelarycznym Załącznika 3 znajdują się 21 prac posiadających IF oraz publikacje w czasopismach spoza listy JCR (3 publikacje w Biuletynie IHAR i 1 w *Frontiers in Sustainable Food Systems* – Kandydatka nie uwzględniła IF dla tego czasopisma w 2021 roku co mogłoby sugerować że jest poza listą JCR). Ale mam w tym obszarze kilka uwag krytycznych, dlatego w zestawieniu tabelarycznym Załącznika 3, str. 15 dla artykułu przeglądowego w *Frontiers in Sustainable Food Systems* wykazano IF 0 skoro w roku publikacji czyli 2021 wynosił on 5,005 (informacja z bazy Web of Science, dostęp 20.02.2024). Kolejna uwaga dotyczy zestawienia sumarycznego IF, Załącznik 3. pkt. „IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE”, Habilitantka podaje: „Sumaryczny 5. letni IF₂₀₂₂ = 108,3” tymczasem wskaźnik ten bazując na zestawieniu tabelarycznym tego załącznika wynosi 118,2. W podsumowaniu Załącznika 3 powinna pojawić się sumaryczna wartość dla artykułów ale z roku publikacji czyli sumaryczny IF = 88,849, a nie z roku 2022 czy też 5-cio letni IF. W tego typu opracowaniach naukowych należy podawać punktacje MNiSW oraz MEiN podobnie jak wartości IF z roku opublikowania artykułu, w zasadzie ostatnia kolumna (kolumna 7) Tabela II.1 (str. 7-15) jest niepotrzebna. Pani dr Monika Krzewska nie podaje sumarycznej punktacji swojego dorobku zgodnie z punktacją MEiN, ale wartość IF jest bardzo miarodajnym wskaźnikiem naukowym. Te zawirowania z systemem prezentacji sumarycznego dorobku oczywiście nie umniejszają wkładu Pani Doktor w rozwój wiedzy w dyscyplinie, w której ubiega się o awans, ponieważ sumaryczny IF dla poszczególnych czasopism w roku publikacji jest tak czy inaczej bardzo duży. Dodam, iż Habilitantka jest współautorką 3 rozdziałów w książkach anglojęzycznych wydawnictw Springer czy Humana dotyczących zagadnień androgenezy pszenżyta co jest dowodem dużej wiedzy w obszarze metod biotechnologicznych doskonalenia pszenżyta.

3.3.

Dorobek publikacyjny Pani dr Moniki Krzewskiej z wyłączeniem publikacji wchodzących do zestawu osiągnięcia naukowego (cykl artykułów powiązanych tematycznie), po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 19 prac w czasopismach znajdujących się w bazie JCR o łącznej liczbie punktów 1445 i sumarycznym IF 73,51 (lub 78,515 po uwzględnieniu IF z 2021 czasopisma *Frontiers in Sustainable Food Systems*) oraz 3 artykuły w czasopismach recenzowanych spoza listy JCR o łącznej liczbie punktów 60.

Habilitantka wykazała się również dużą aktywnością w prezentacji wyników swoich badań biorąc udział w konferencjach. Jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora brała udział w 12 konferencjach naukowych w tym na 9 zagranicznych i 3 krajowych (12 posterów oraz współautorstwo jednego wykładu). Po doktoracie ta aktywność wzrosła ponieważ Kandydatka wzięła udział w 28 konferencjach w tym w 16 międzynarodowych oraz 12 krajowych (38 posterów oraz współautorstwo 15 prezentacji ustnych).

3.4.

Osiągnięcie opiera się na czterech artykułach opublikowanych w następujących czasopismach, lista przygotowana w porządku chronologicznym:

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 (*× Triticosecale* Wittm.) anther culture. **Plant Cell Reports**, 31(11):2099-2108. doi: 10.1007/s00299-012-1320-2.

IF2012 = 2,509, 30 pkt. MNiSW

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 (*× Triticosecale* Wittm.) anther culture. **Euphytica**, 206: 263-278. doi: 10.1007/s10681-015-1509-x.

IF2015 = 1,546, 35 pkt MEiSW

3. Krzewska M., Gołębiowska-Pikania G., Dubas E., Gawin M., Żur I. (2017) Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in winter triticale (*× Triticosecale* Wittm.). **Euphytica**, 213:192. doi: 10.1007/s10681-017-1978-1.

IF2015 = 1,546, 35 pkt MEiSW

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 (*× Triticosecale* Wittm.) after 5-azacytidine treatment. **Scientific Reports**, 11: 22215. doi: 10.1038/s41598-021-01671-y

IF2021 = 4,997, 140 pkt. MEiN

We wszystkich publikacjach Kandydatka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Można zatem przyjąć, że miała ona wiodący udział w powstaniu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi 10,598 (po uwzględnieniu korekty roku publikacji). Suma punktów według wykazu czasopism punktowanych MNiSW, a następnie MEiN wynosi 245 (po uwzględnieniu korekty roku publikacji). W tym miejscu mam jednak krytyczną uwagę dotyczącą Załącznika 2. str. 3-4, w wykazie publikacji stanowiących pierwsze osiągnięcie

naukowe (cykl artykułów powiązanych tematycznie) Kandydatka powinna przedstawić wartości współczynnika wpływu IF z roku publikacji, a jeśli zdecydowała się na podanie punktów z list MNiSW oraz MEiN to również powinny to być wartości z roku publikacji. Autorka wprowadza zamieszanie podając punkty MEiN z 2023 roku, a IF z 2022 roku. Pozornie niska wartość punktowa cyklu (245 z uwzględnieniem punktacji z roku publikacji) nie obniża w żaden sposób wartości merytorycznej prac, tym bardziej, że wiemy iż od 2019 roku doszło to dużej zmiany w systemie przeliczania punktów. Stąd uważam za niewłaściwe uwzględnianie punktacji dla artykułów sprzed 2019 roku, która de facto dopiero się pojawi. Natomiast pomijając aspekty naukometryczne, uważam że przedstawiony cykl posiada dużą wartość merytoryczną oraz potencjał aplikacyjny. Poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego Kandydatka po uzyskaniu stopnia doktora publikowała w następujących czasopismach z listy JCR (w porządku chronologicznym):

Plant Growth Regulation x 2 (IF 1,67), Plant Cell Reports x3 (IF 3,071), Plant Cell, Tissue and Organ Culture x 4 (IF 2,125), Protoplasma (IF 2,651), Journal of Proteomics x2 (IF 3,722), Plant science x2 (IF 3,591), International Journal of Molecular Sciences x 2 (IF 5,924), Antioxidants (IF 7,675), BMC Plant Biology (IF 5,26), Scientific Reports (IF 4,997), Frontiers in Plant Science (IF 3,677), Frontiers in Sustainable Food Systems (IF 5,005).

Jak widać są to uznane czasopisma posiadające wysoki współczynnik wpływu i jest to również istotna informacja z formalnego punktu widzenia świadcząca o uznaniu dorobku Habilitantki w świecie nauki.

3.5.

Pani Doktor Monika Krzewska przedstawia publikacje wchodzące w skład dzieła w kolejności chronologicznej jest to również uzasadnione merytorycznie tematyką badań i rozwiązywaniem kolejnych problemów badawczych.

Wkład Kandydatki w powstanie publikacji P1-P4 polegał na współwykonaniu eksperymentów związanych z zakładaniem kultur pylnikowych *in vitro* co dowodzi dobrej znajomości technik biotechnologicznych związanych z androgenezą pszenżyta, poza tym była to analiza QTL z użyciem odpowiedniego oprogramowania (Windows QTL Cartographer 2.5). Ponadto zebranie i opracowanie wyników eksperymentalnych, przygotowanie strony graficznej, a następnie przygotowanie manuskryptu – wersji pierwotnej i końcowej, edycja artykułu po uwagach współautorów, korespondencja z redakcją oraz wprowadzanie poprawek po recenzjach. Ponadto w publikacjach P3-P4 Pani Doktor była autorką lub współautorką koncepcji badań i zdobywała fundusze na badania. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że publikacja w czasopiśmie *Euphytica* (P3) powstała dzięki funduszom z grantu NCN, PRELUDIUM I, 2011/01/N/NZ9/02541 „Identyfikacja białek związanych z podatnością na indukcję androgeny u pszenżyta (*× Triticosecale* Wittm.)”, w którym to grancie Habilitantka pełniła funkcję kierownika. To dodatkowo podnosi rangę publikacji i jest formalnym dowodem wiodącej roli Pani Doktor w powstaniu tej pracy poza elementami wspomnianymi wcześniej w części paragrafu 3.5.

Biorąc pod uwagę aspekty formalne, można stwierdzić, iż wysoki udział w powstaniu prac uzasadnia ich wykorzystanie jako elementów osiągnięcia naukowego, z powodu wiodącego udziału Pani Doktor w powstaniu większości prac. Bazując na opisie zaangażowania

Habilitantki w powstanie artykułów składających się na osiągnięcie wniosku o jej wiodącym udziale.

3.6.

We wstępie swojego autoreferatu Doktor Monika Krzewska przedstawia trudności jakie pojawiają się lub mogą się pojawić w związku z produkcją roślinną jak zmiany klimatyczne, nowe patogeny, gatunki inwazyjne, a w kontekście konieczności wyżywienia coraz większej populacji ludzi rodzi to nowe wyzwania dla hodowli roślin. Pomocne tu mogą być metody biotechnologiczne pozwalające w krótkim czasie wygenerować homozygotyczne populacje roślin co u gatunków samopylnych ma kluczowe znaczenie w utrwaleniu korzystnych cech związanych z fenotypem nowej odmiany tak aby powtarzała korzystny zestaw cech użytkowych w kolejnych pokoleniach roślin rozmnażanych generatywnie. Pani Doktor odwołuje się tu do totipotencji komórek roślinnych i wyborze takich tkanek czy komórek, które mają potencjał formowania zarodkopodobnych struktur (ELS) i regeneracji z nich całej rośliny. W grupie tych potencjalnie interesujących tkanek znajduje się tkanka archesporialna męska z której powstają mikrosporocyty, a następnie na drodze podziałów mejotycznych mikrospory o zredukowanej do połowy liczbie chromosomów. Wykorzystując wiedzę na temat mikrosporogenezy próbuje się tak ingerować w tą drogę rozwojową aby uzyskać na końcu drogi struktury zarodkopodobne zamiast klasycznych gametofitów męskich czyli ziaren pyłku.

Choć pewne prace nad embriogenezą mikrospor (EM) są prowadzone już od lat 60-tych w rodzaju *Datura* i pewne czynniki wpływające na indukcję zmiany drogi rozwojowej mikrospor jak temperatura, skład pożywki, ciśnienie osmotyczne, rola światła czy genotypu są znane. Nawet dla kilku gatunków opracowano już metody haploidyzacji na drodze androgenyzy (jęczmień, pszenica, rzepak) to jednak aspekty mechanistyczne procesu EM są nadal badane i nadal niektóre gatunki uznaje się za bardzo trudne (recalcitrant) jak żyto, owies czy pszenżyto. Za wyborem tej drogi w celu regeneracji roślin przemawia kilka czynników m.in. liczba wytwarzanych mikrospor od kilku tysięcy do kilkudziesięciu tysięcy (u rzepaku to ok 60 tys. mikrospor z pylnika), oraz stosunkowo proste procedury preparacyjne (w tym zadziałanie czynnikiem stresowym np. niską bądź wysoką temperaturą czy szok osmotyczny). Jednak bardzo mała część mikrospor ulega indukcji, a na przebieg procesu EM ma wpływ wiele czynników, takich jak: genotyp, stan fizjologiczny rośliny macierzystej, rodzaj i intensywność czynnika stresowego czy warunki prowadzenia kultur *in vitro*. Dlatego temat podjęty przez Habilitantkę można rozpatrywać na poziomie podstawowym ale też aplikacyjnym co jest niewątpliwie dużym plusem jej cyklu badawczego. Wyjaśnienie podłoża molekularnego procesu EM, zjawisk zachodzących podczas rozwoju mikrospor na poziomie fizjologicznym, proteomicznym czy metabolomicznym i w konsekwencji zmiany ich drogi rozwojowej na sporofityczną, daje szansę na wykorzystanie tej wiedzy w praktycznych metodach biotechnologicznych przyspieszających proces hodowli. A niewątpliwie taką szansę stwarza zastosowanie techniki linii DH (podwojonych haploidów) w szybkiej homozygotyzacji materiałów hodowlanych. Ponieważ rośliny zregenerowane na drodze EM są zazwyczaj haploidalne, ale może dojść do spontanicznego podwojenia liczby chromosomów, lub podwojenie jest indukowane prowadząc do otrzymania roślin DH. Rośliny te są bardzo cenne dla hodowców gdyż reprezentują segregacje na poziomie gametycznym i są w 100 % homozygotyczne. Poza aspektem aplikacyjnym rośliny haploidalne są bardzo dobrym obiektem

w badaniach mutacyjnych, transgenezie, konstrukcji map genetycznych czy badaniu *loci* cech ilościowych (QTL).

Zainteresowanie procesem embriogenezy mikrospor ma bardzo długą historię ale nadal trudno wskazać jednoznaczne markery związane z wydajnością procesu EM, a tym samym brak skutecznej metody produkcji linii DH dla wielu istotnych gospodarczo gatunków roślin. Stąd też konieczne są dalsze badania zmierzające do udoskonalenia obecnych protokołów, ale też pozwalające lepiej poznać mechanizmy kontrolujące indukcję sporofitycznego rozwoju mikrospor. Habilitantka wskazuje, że obecne prace skupiają się przede wszystkim na profilowaniu transkryptomu, w celu identyfikacji genów, których poziom ekspresji ulega zmianie podczas indukcji EM, ale z powodu zmiennych danych dotyczących korelacji ilości mRNA z procesem translacji i ostatecznie ilością docelowego białka, celowe wydają się badania proteomu. Kandydatka zwraca też uwagę na rolę kontroli epigenetycznej procesu EM modyfikującej ekspresję genów i wpływającej na profil białkowy. U wielu gatunków obserwowano zmianę poziomu metylacji DNA związaną z indukcją embriogenezy mikrospor, oraz pozytywny wpływ wzrostu poziomu inhibitorów metylacji na wydajność procesu embriogenezy mikrospor.

Pszenżyto jest dla gospodarki Polski bardzo ważnym zbożem z arealem uprawy ok. 1200 tys. ha, a zaprezentowane przez Habilitantkę osiągnięcie skupia się wokół dwóch obszarów regulacji procesu EM dla tego zboża. Pierwszy aspekt to identyfikacja QTL oraz potencjalnych genów markerowych związanych z regulacją procesu embriogenezy mikrospor, a drugi obszar to identyfikacja białek związanych z podatnością na proces indukcji embriogenezy mikrospor.

Celem badawczym, który przedstawia Pani Doktor Monika Krzewska w swoim osiągnięciu było poszerzenie wiedzy na temat molekularnego i fizjologicznego podłoża procesu embriogenezy mikrospor, a cel ten chciała osiągnąć poprzez identyfikację rejonów genomu pszenżyta, potencjalnych genów markerowych oraz próbę identyfikacji białek związanych z regulacją indukcji EM i efektywnością tego procesu.

To bardzo istotny element formalnie konieczny do zaliczenia prezentowanych badań Habilitantki jako znaczącego przyczynku w poszerzeniu wiedzy w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, mamy tutaj aspekt poznawczy ale również bardzo mocny aspekt aplikacyjny, gdyż zastosowane metody mogą być bardzo przydatne do optymalizacji procedur wytwarzania linii DH pszenżyta, ale również gatunków pokrewnych – żyta i pszenicy uznawanych za odporne na proces EM. Zidentyfikowane białka, jak i markery molekularne silnie sprzężone z wydajnością kolejnych faz embriogenezy mikrospor mogą znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych do selekcji.

Ten ambitny cel wiązał się z koniecznością dobrania odpowiedniego materiału roślinnego. Były to rośliny populacji mapującej wytworzone w zespole dr Ewy Bauer, w State Plant Breeding Institute, Hohenheim University, Niemcy na bazie niemieckiej linii wsobnej pszenżyta Saka 3006 i polskiej odmiany Modus. Wybrane mieszańce F1 posłużyły do wygenerowania linii DH w oparciu o krzyżowanie oddalone z kukurydzą. W oparciu o tą metodę wytworzono również linie DH z obu form rodzicielskich.

Zadaniem badawczym w publikacji I (**PI- Plant Cell Reports 2012**) było określenie podatności poszczególnych linii DH na indukcję EM w kulturach pylnikowych w trzech sezonach wegetacyjnych, oraz w oparciu o wysoce wysyconą mapę genetyczną wygenerowaną

dla populacji Saka3006×Modus znalezienie QTL istotnie sprzężonych z podatnością na indukcję EM.

W publikacji II (**PII- Euphytica 2015**), zadaniem badawczym było przeanalizowanie populacji mapującej Saka3006×Modus pod kątem produkcji siewek albinotycznych w kulturach pylnikowych i próba znalezienia QTL istotnie sprzężonych z tą cechą, ponadto znalezienie związku pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS), aktywnością systemu antyoksydacyjnego, endogennym poziomem hormonów a wydajnością procesu androgenyzy. W publikacji III (**PIII – Euphytica 2017**) zadaniem badawczym była charakterystyka zmian profilu białkowego pylników pod wpływem czynnika indukującego proces embriogenezy mikrospor oraz identyfikacja białek zaangażowanych w regulację procesu embriogenezy mikrospor. Tu chciałbym zwrócić uwagę, iż jest to pierwsza praca dostarczająca informacji na temat zmian proteomicznych zachodzących podczas indukowania procesu embriogenezy mikrospor w kulturach pylnikowych pszenżyta ozimego. Jest to istotna informacja z formalnego punktu widzenia, dowodząca wkładu Habilitantki w poszerzenie wiedzy w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. W pracy zidentyfikowano 31 białek związanych z następującymi procesami: zmiana kierunku rozwoju mikrospor, odpowiedź na stres, oraz regulacja procesu indukcji embriogenezy mikrospor. Większość scharakteryzowanych białek powiązanych z efektywną indukcją procesu embriogenezy mikrospor pszenżyta ozimego zaangażowanych było w procesy metaboliczne np. 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 publikacji IV (**PIV – Scientific Reports 2021**) zadaniem badawczym było określenie wpływu inhibitora metylacji DNA (5-azacytydyny - AC) na efektywność procesu EM w kulturach pylnikowych pszenżyta ozimego oraz specyfika zmian proteomicznych pylników pszenżyta ozimego pod wpływem inhibitora metylacji (AC). Zwrócę tu również uwagę na ewolucję podejścia do badanego materiału roślinnego i sukcesywną selekcję linii DH pod kątem skrajnej reakcji na badany proces embriogenezy mikrospor tak aby wyjaśnić mechanizmy na poziomie transkryptomu czyli regulacja epigentyczna procesu EM, a następnie proteomu. Natomiast na początku drogi był to duży zestaw linii DH (80 linii) wśród których Pani Doktor poszukiwała genotypów predysponowanych do procesu EM oraz opornych. W miarę redukcji materiału roślinnego pojawiały się coraz bardziej zaawansowane metody badawcze jak np. RT-PCR, elektroforezę dwukierunkową, MALDI-TOF/TOF, nano-LC MS/MS w połączeniu z technikami kultur in vitro które były stosowane od początku badań. Dzięki takiemu podejściu Kandydatka otrzymała nowatorskie wyniki pod kątem identyfikacji białek regulujących proces embriogenezy mikrospor przebiegający w warunkach typowych procedur, ale również w po zastosowaniu czynników zmieniających poziom metylacji DNA i zwiększających wydajność procesu EM.

W podsumowaniu swojego autoreferatu Pani dr Monika Krzewska prezentuje 9 istotnych jej zdaniem osiągnięć które pogrupowałbym w obszary poznawcze oraz aplikacyjne. W pierwszym obszarze wskazałbym:

1. Określenie wpływu demetylacji DNA na ekspresję genów, związanych z procesem indukcji EM, takich jak *GSTF2*, *TaTPDI-like* i *SERK2*, oraz wpływu obniżenia poziomu metylacji DNA na profil białkowy pylników pszenżyta ozimego w trakcie indukcji EM.

2. Wykazanie pozytywnego wpływu inhibitora metylacji DNA (5-azacytydyny) na efektywność indukcji EM.

3. Wskazanie konkretnych białek zaangażowanych w indukcję EM u pszenżyta ozimego
Te trzy osiągnięcia niewątpliwie są przyczynkiem w poszerzeniu wiedzy na temat molekularnego i fizjologicznego podłoża EM.

W grupie osiągnięć aplikacyjnych wymienić należy:

1. Lokalizację rejonów genomu pszenżyta i sprzężonych z nimi markerów molekularnych związanych z podatnością na indukcję embriogenezy mikrospor oraz regeneracją roślin zielonych i albinotycznych

2. Optymalizację metody embriogenezy mikrospor w kulturach pylnikowych pszenżyta ozimego oraz wytypowanie linii DH o wysokim stopniu podatności na proces EM, jako potencjalnego materiału wyjściowego dla hodowli pszenżyta.

Podsumowując tę część dorobku naukowego Habilitantki stwierdzam, że poziom prac badawczych Doktor Moniki Krzewskiej jest wysoki, a przedstawione w autoreferacie publikacje stanowią Jej najważniejsze osiągnięcie naukowe i całkowicie spełniają wymóg spójności tematycznej badań.

4. Informacja o spełnieniu przez kandydata kryterium dotyczącego wykazania się istotną aktywnością naukową.

Dorobek publikacyjny Pani dr Moniki Krzewskiej z wyłączeniem publikacji wchodzących do zestawu osiągnięcia naukowego, obejmuje 19 prac w czasopismach znajdujących się w bazie JCR o łącznej liczbie punktów 1445 i sumarycznym IF 73,51 (lub 78,515 po uwzględnieniu IF z 2021 czasopisma *Frontiers in Sustainable Food Systems*) oraz 3 artykuły w czasopismach recenzowanych spoza listy JCR o łącznej liczbie punktów 60.

Kandydatka wykazała się również dużą aktywnością w prezentacji wyników swoich badań biorąc udział w konferencjach. Jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora brała udział w 12 konferencjach naukowych w tym na 9 zagranicznych i 3 krajowych (12 posterów oraz współautorstwo jednego wykładu). Po doktoracie ta aktywność wzrosła ponieważ Kandydatka wzięła udział w 28 konferencjach w tym w 16 międzynarodowych oraz 12 krajowych (38 posterów oraz współautorstwo 15 prezentacji ustnych). Liczba cytowań prac Kandydatki bez autocytowań według bazy Web of Science wynosi 263, natomiast w bazie Scopus, która generuje szersze wyniki to 320 (stan na 13.02.2024). Indeks Hirscha wg. bazy Web of Science wynosi 12, według Scopus 14 (stan na 13.02.2024). Aktywność publikacyjna po uzyskaniu stopnia doktora w 2013 roku, Pani Moniki Krzewskiej znacznie wzrosła i od 2014 roku publikuje artykuły głównie w czasopismach z listy JCR. To na pewno warto podkreślić gdyż daje możliwość zaprezentowania wyników swoich badań szerszej międzynarodowej społeczności naukowej.

Poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego Kandydatka po uzyskaniu stopnia doktora publikowała w następujących czasopismach z listy JCR (w porządku chronologicznym):

Plant Growth Regulation × 2 (IF 1,67), Plant Cell Reports × 3 (IF 3,071), Plant Cell, Tissue and Organ Culture × 4 (IF 2,125), Protoplasma (IF 2,651), Journal of Proteomics × 2 (IF 3,722), Plant science × 2 (IF 3,591), International Journal of Molecular Sciences × 2 (IF 5,924), Antioxidants (IF 7,675), BMC Plant Biology (IF 5,26), Scientific Reports (IF 4,997), Frontiers in Plant Science (IF 3,677), Frontiers in Sustainable Food Systems (IF 5,005). Pewne krytyczne uwagi dotyczące wskaźników naukowych zawarłem już w paragrafie 3.2 (ale są to uwagi wyłącznie techniczne lub edytorskie).

Sięgając do początków aktywności naukowej Pani Doktor możemy przywołać badania prowadzone w Uniwersytecie Pedagogicznym w Krakowie. Efektem współpracy z Zakładem Genetyki i Cytologii Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego była praca magisterska pt. „Analiza przebiegu mejozy u dwóch mieszańców żyta”, a następnie publikacja: Krawczyk J., Krzewska (Hara) M. (2009) The karyotype analysis of selected species of rye (*Secale Poaceae*). In: Grass research. Frey L. (ed.), W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków: 96-107.

Habilitantka nawiązała współpracę z bardzo dobrymi placówkami badawczymi i współpraca ta miała wpływ na późniejsze zainteresowania naukowe oraz stosowane techniki badawcze stąd uważam za istotne przywołanie tych placówek.

Pierwsza placówka to Instytut Genetyki Roślin i Biotechnologii, Słowacka Akademia Nauk, Słowacja (Nitra). W tymże instytucie Kandydatka odbyła 3 krótkoterminowe staże w 2010, 2011 oraz 2012 roku. Tu zapoznała się z metodyką badań proteomicznych (metoda 2DE oraz fenolowa ekstrakcja białek, analiza komputerowa obrazu – PDQuest uzyskanych rozdzielonych elektroforetycznych białek). W tym ośrodku Kandydatka wykonała wstępne analizy profili białkowych pylników pszenżyta w aspekcie wydajności indukcji procesu EM, a wyniki były wykorzystane w aplikacji projektu NCN, Preludium I. Ponadto Pani Doktor wykorzystwała zdobyte umiejętności i wiedzę w realizacji projektu MRiRW - „Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz”, w wyniki uzyskane w oparciu o techniki przyswojone w czasie staży były podstawą do napisania 4 publikacji. Tu chciałbym podkreślić, że w grupie tych publikacji znalazły się dwie (P3 i P4) będące elementami osiągnięcia Habilitantki przedstawionego w Autoreferacie (Załącznik 2.). To kolejny formalny dowód istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Druga placówka to Stacja Doświadczalna Aula Dei Hiszpańskiej Rady Krajowej ds. Badań Naukowych (Estación Experimental de Aula Dei Consejo Superior de investigaciones Científicas, Saragossa Hiszpania). W tej placówce Pani Doktor realizowała część wspólnego projektu badawczego polsko – hiszpańskiego: „N-butanol as a trigger inducing microspore embryogenesis in in vitro cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (× *Triticosecale* Wittm.)”. Na tym stażu Kandydatka poznała kolejne techniki molekularne jak np. RT-PCR do analizy ekspresji genów, wykonała badania profilu ekspresji genów związanych z efektywnością indukcji procesu EM pszenżyta ozimego. W efekcie tej współpracy powstały 3 publikacje w tym publikacja P4 będąca elementem osiągnięcia Habilitantki. Tu również widzimy element spójności metodycznej i tematycznej programu stażowego Pani Doktor i cyklu artykułów powiązanych

tematycznie. Obydwa staże przyczyniły się do rozwoju warsztatu badawczego oraz wiedzy i umożliwiły przebadanie Kandydatce ciekawego materiału roślinnego scharakteryzowanego pod kątem zdolności do procesu EM w kulturach pylnikowych (publikacje P1 i P2), a następnie w zagłębienie się w mechanizmy proteomiczne transkryptomyczne związane z procesem androgenyzy w kulturach pylnikowych pszenżyta ozimego (publikacje P3 i P4).

Poza zagadnieniami przedstawionymi w cyklu artykułów Pani Doktor zajmowała się zagadnieniami z zakresu cytogenetyki np. określeniem struktury kariotypów gatunków z rodzaju *Secale* L. oraz ustaleniem stopnia ich pokrewieństwa. Kierunek ten był realizowany na początku drogi naukowej Kandydatki w Zakładzie Genetyki i Cytologii Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego. Kolejny obszar zainteresowań badawczych Habilitantki to zagadnienia z zakresu epigenetyki np. określenie wpływu inhibitorów metylacji DNA na indukcję procesu embriogenezy mikrospor u pszenżyta ozimego. Ta tematyka była realizowana w Zakładzie Biologii Komórki IFR PAN w Krakowie. W oparciu o wcześniejsze prace Pani Doktor i Zespołu ZBK IFR PAN udało się wyselekcjonować linie DH pszenżyta ozimego w istotny sposób różniące się pod kątem zdolności do indukcji procesu embriogenezy mikrospor oraz regeneracji roślin haploidalnych a następnie podwojonych haploidów. Badania te miały na celu weryfikację hipotezy dotyczącej wpływu obniżonego poziomu metylacji DNA na podniesienie efektywności indukcji procesu embriogenezy androgenicznej w kulturach izolowanych mikrospor. Habilitantka wraz z Zespołem wykazała duże znaczenie rodzaju zastosowanych inhibitorów metylacji DNA, stężenia oraz sposobu traktowania tymi inhibitorami w kontekście molekularnego podłoża indukcji procesu embriogenezy mikrospor, jak i diagnostyki w badaniu zjawisk epigenetycznych w rozwoju i różnicowaniu komórki roślinnej w tym zmianę drogi rozwojowej mikrospor. Uzyskane wyniki dały podstawę do dalszych badań nad możliwością praktycznego zastosowania inhibitorów metylacji w podnoszeniu wydajności procesu embriogenezy mikrospor u roślin zbożowych.

Pani dr Monika Krzewska brała udział w szkoleniach i kursach dotyczących szeroko pojętych metod analitycznych (np. w 2010 roku: Basic MASQuant Analyzer Training, IFR PAN w Krakowie), metod molekularnych, czy bioinformatyki (13th Poznan Summer School of Bioinformatics), sumarycznie było ich 6 na przestrzeni lat 2010-2022.

Za swoją działalność naukową/organizacyjną Kandydatka otrzymała wyróżnienia w 2014 roku (Wyróżnienie od Dyrektora IFR PAN za najwyższą liczbę publikacji w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej w grupie młodszych pracowników i Wyróżnienie od Dyrektora IFR PAN za prace organizacyjne przy tworzeniu strony internetowej Instytutu – IFR PAN w Krakowie),

Pani dr Monika Krzewska była wykonawcą w 6 projektach badawczych zrealizowanych oraz jest wykonawcą w jednym projekcie w toku realizacji. Ponadto w latach 2012-2014 była też kierownikiem grantu NCN, PRELUDIUM I „Identyfikacja białek związanych z podatnością na indukcję androgenyzy u pszenżyta (*× Triticosecale* Wittm.)”.

Tematyka projektów gdzie Habilitantka była wykonawcą jest związana z wykorzystaniem metod biotechnologicznych w otrzymywaniu haploidów zbóż (pszenica, pszenżyto, żyto) i rzepaku. Ponadto w projektach tych pojawiają się również aspekty fizjologiczne jak np. wpływ hormonów i stresu oksydacyjnego na indukcję i wydajność androgenyzy, oraz aspekt proteomiczny. Pani Doktor jest obecnie współwykonawcą w projekcie MRiRW (lata 2021-2026): „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Jak widać Habilitantka jest chętnie zapraszana do współpracy w badaniach z zakresu wykorzystania metod *in vitro* w procesie embriogenezy mikrospor, ale współpraca ta dotyczy również aspektów stresów abiotycznych jak np. niska temperatura i susza (Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz) gdzie Pani Doktor była odpowiedzialna za opracowanie wyników dotyczących proteomiki.

W swoim dorobku aktywności naukowej Habilitantka posiada również udział w programach europejskich np. projekt 548/N-COST/2009/0 „Lokalizacja QTL podatności na indukcję androgenezy w obrębie genomu pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittm.)” realizowany w ramach Akcji COST FA0604 (Akronim TRITIGEN - Triticeae genomics for the advancement of essential European crops) – w projekcie tym była wykonawcą w latach 2009-2012. Pani Doktor brała również udział w pracach zespołów badawczych wyłonionych na drodze konkursu wewnętrznego IFR PAN oraz polsko-słowackich, polsko-belgijskich i polsko-hiszczańskich projektach badawczych (siedmiokrotnie jako wykonawca i dwukrotnie jako kierownik i wykonawca). Prace te dotyczyły m.in. procesu androgenezy zbóż i rzepaku (w aspekcie wydajności ale również mechanizmów fizjologicznych, proteomicznych, transkryptomicznych), oraz odporności pszenżyta ozimego na pleśń śniegową.

Pani Doktor może się również wykazać współpracą z sektorem gospodarczym. W latach 2015-2018 w ramach badań naukowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej była wykonawcą w projekcie „Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenezy i krzyżowań oddalonych. W tym projekcie współpracowała z DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. oraz z Poznańską Hodowlą Roślin Sp. z o.o. biorąc udział w opracowaniu metody wytwarzania linii DH żyta i wdrożeniu tych linii do praktycznej hodowli roślin. Następnie w latach 2020-2021 w ramach współpracy z firmą Danko Hodowla Roślin Sp. z o. o. wytwarzała linie DH jęczmienia ozimego, które zostały włączone do programów hodowlanych.

Jeśli chodzi o całokształt oceny aktywności naukowej poza omawianym w poprzednim paragrafie cyklu publikacji to oceniam, że spełnia on wymagania merytoryczne i formalne Ustawy.

5. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Pani dr Monika Krzewska jest adiunktem w Instytucie Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (IFR PAN). Jej praca skupia się głównie na prowadzeniu badań naukowych, pozyskiwaniu środków na badania oraz prezentacji wyników swoich badań (publikacje, udział w konferencjach: postery, doniesienia ustne). Pomimo tego może się wykazać również dorobkiem dydaktycznym co m.in. jest związane z profilem ukończonej szkoły wyższej (Uniwersytet Pedagogiczny). Kandydatka w okresie studiów odbyła praktyki dydaktyczne prowadząc zajęcia w szkole podstawowej (przyroda), gimnazjum (biologia) oraz szkole średniej (biologia). Habilitantka prowadziła w 2018 roku również wykłady dla uczestników Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych PAN przy Instytucie Botaniki *im. W. Szafera* w Krakowie z przedmiotu „Proteomika - zastosowanie i narzędzia” oraz „Wybrane techniki badania proteomu” oraz w j. angielskim ”Modern analytical techniques in research on haploidization of plants”. Za dość istotne doświadczenie dydaktyczne uważam

pełnienie funkcji promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim pt. „Udział systemu antyoksydacyjnego i hormonów stresu w determinacji poziomu tolerancji jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na mróz i suszę glebową. Funkcja ta wymagała konsultacji na poziomie merytorycznym związanym ze stosowanymi procedurami badawczymi, ale też korekty pierwotnych wersji rozprawy. To na pewno wzbogaciło doświadczenie zawodowe Pani Doktor.

Reasumując ten obszar można stwierdzić, że nie jest to rozbudowany dorobek dydaktyczny czy organizacyjny, ale należy pamiętać, że Kandydatka nie była nigdy zatrudniona na etacie dydaktycznym. Biorąc pod uwagę działalność organizacyjną lub kierowniczą to dość istotną formalnie informacją jest fakt kierowania grantem w ramach konkursu NCN, PRELUDIUM I, 2011/01/N/NZ9/02541 „Identyfikacja białek związanych z podatnością na indukcję androgenezę u pszenżyta (*× Triticosecale* Wittm.)” w którym to projekcie Habilitantka pełniła funkcję kierownika, ponadto była kierownikiem w dwóch tematach badawczych wewnętrznych IFR PAN, w związku z tym była odpowiedzialna za całokształt spraw formalnych i rozliczenie projektu. To znacznie wzbogaciło doświadczenie zawodowe Pani Doktor.

Podsumowując ten obszar aktywności Habilitantki, uważam, że Pani dr Monika Krzewska jest pracownikiem wykazującym się aktywnością organizacyjną, ale również dydaktyczną.

6. Wniosek końcowy

Opierając się na pozytywnej ocenie osiągnięć naukowych przedstawionych przez Kandydatkę, ich oryginalności i wartości merytorycznej, jak również pozytywnie oceniając działalność organizacyjną Pani dr Moniki Krzewskiej, stwierdzam że Habilitantka spełnia wszystkie wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego. Prace naukowe Kandydatki posiadają istotny element poznawczy i aplikacyjny i wnoszą istotny wkład w poszerzenie wiedzy w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Przedstawiony dorobek naukowy spełnia kryteria art. 219 ust. 1 pkt. 2 i 3 ustawy z 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dziennik Ustaw z 2022 r. poz. 574 ze zm., dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Przedkładam zatem wniosek o nadanie Pani dr Monice Krzewskiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Tommas Womacha