



dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna, prof. UAM
Zakład Botaniki Ogólnej
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grzyb
pt. „Cytomorfologiczne i fizjologiczne przemiany leżące u podstaw nabywania embriogenicznej kompetencji przez eksplantaty paproci drzewiastej *Cyathea delgadii* Sternb.”

Podstawę formalną do wykonania recenzji stanowi pismo Prodziekana ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, powierzające mi obowiązki recenzenta na podstawie uchwały Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska z dnia 18 czerwca 2020 roku.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Ogrodzie Botanicznym Polskiej Akademii Nauk w Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie, pod kierunkiem Prof. dr hab. Anny Mikuły i dr Justyny Wróbel.

Informacje formalne

Rozprawę stanowi jednotematyczny cykl czterech wieloautorskich publikacji oryginalnych, opublikowanych w latach 2017-2020, opatrzonej krótkim omówieniem w języku polskim. Wszystkie prace, które weszły w skład rozprawy, zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR): dwie publikacje ukazały się w czasopiśmie *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* oraz po jednej w *Acta Physiologiae Plantarum* i *Plant and Cell Physiology*. Są to renomowane czasopisma z dziedziny Plant Science, w których artykuły przyjęte do druku zostały poddane skrupulatnym i rzetelnym recenzjom przez grono międzynarodowych ekspertów w rygorystycznym procesie redakcyjnym. Sumaryczny impact factor tych publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 9.883, a liczba punktów MNiSW to 295. W każdym z artykułów Doktorantka jest pierwszą Autorką. Na podstawie oświadczeń współautorów można również wnioskować, że jest ona Autorką wiodącą, która wykonała część doświadczalną pracy, jak również napisała pierwsze wersje manuskryptów i każdorazowo miała przypisany status autora korespondencyjnego, co świadczy o bardzo dużych umiejętnościach Autorki redagowania tekstów naukowych. Udział Pani mgr Grzyb obejmował bowiem wyprowadzenie embriogennych kultur *C. delgadii*, przygotowanie materiału do analiz, wykonanie badań, wizualizację wyników analiz strukturalnych i fizjologicznych oraz opracowanie wyników. Oczywisty jest zatem indywidualny i wyodrębniony wkład kandydatki do stopnia doktora przy opracowywaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej oraz interpretacji wyników tych prac, co jest zgodne z zapisami w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Prace badawcze były finansowane w ramach



dwóch grantów pozyskanych ze środków Narodowego Centrum Nauki, w tym w ramach projektu PRELUDIUM, którego Doktorantka była kierownikiem oraz ze środków na działalność statutową PAN OB-CZRB w Powsinie, co zostało odpowiednio odnotowane w rozprawie.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Grzyb jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, zaś na podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność przygotowania rozprawy. Tytuł pracy jest adekwatny, w pełni oddaje treść i cele rozprawy. Cel został jasno i zwięźle sformułowany, hipotezy badawcze wynikają z opisu realizowanych zadań w ramach kolejnych artykułów naukowych. Wyniki badań zostały omówione wnikliwie i umiejętnie. Cytowania zostały zastosowane prawidłowo, cytowane prace bardzo dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy, ponadto ich dobór oraz liczba są odpowiednie. Wszystkie formalne kwestie, związane z pisaniem pracy i przedstawieniem wyników badań własnych, nie budzą zastrzeżeń. Język pracy jest przejrzysty a zastosowana terminologia naukowa jest prawidłowa.

Ocena merytoryczna

Somatyczna embriogeneza, obok organogenezy w warunkach *in vitro*, jest skutecznym narzędziem biotechnologicznym do masowej produkcji wielu roślin o charakterze użytkowym. Przedstawiona do recenzji praca doktorska podejmuje trudny temat uwarunkowań związanych z nabywaniem lub/i pobudzaniem embriogenicznego potencjału przez eksplantaty paproci drzewiastej *Cyathea delgadii* na poziomie strukturalnym, fizjologicznych zależności oraz symplastowej komunikacji. Przedstawione wyniki są w dużej mierze nowatorskie, uzyskane dzięki stworzeniu unikalnego systemu eksperymentalnego dla paproci, modelu różnicowania zarodków somatycznych z pojedynczej komórki epidermy eksplantatu ogonka liściowego lub też z grupy komórek fragmentu międzywęzła, indukowanych na pożywkach bez dodatku roślinnych regulatorów wzrostu. *C. delgadii*, użyta podczas badań, jest jedynym jak dotąd gatunkiem paproci, dla którego opisano zdolność rozmnażania na drodze somatycznej embriogenezy. Dla tego układu określono warunki prowadzenia kultury w celu sterowania wydajnością procesu somatycznej embriogenezy. Co więcej, proces ten przebiega na drodze bezpośredniej, z pominięciem fazy kalusa. Doktorantka, wykorzystując ten wcześniej opracowany model badawczy, skupiła się na analizie symptomów towarzyszących konwersji komórki somatycznej eksplantatu w stan embriogeniczny oraz związanych z wczesnym etapem różnicowania zarodka somatycznego u badanego gatunku paproci. Badania te stanowią przykład niezwykle rzadko podejmowanych zagadnień wczesnej indukcji somatycznej embriogenezy, co jest dodatkowym walorem ocenianej pracy. Doktorantka wykorzystała niezwykłą zdolność eksplantatów *C. delgadii* do wzrostu bez regulatorów wzrostu w pożywce, do analiz hormonalnej regulacji embriogenezy w warunkach *in vitro*.

Autorka przedstawiła hipotezy badawcze oraz cel wraz z listą najważniejszych wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Założono, że „podstawą uzyskiwania embriogenicznego charakteru przez eksplantaty *C. delgadii* jest odpowiednia endogenna równowaga hormonalna, zaś wejście pojedynczych komórek somatycznych na drogę somatycznej embriogenezy jest regulowane ograniczeniem symplastowej łączności pomiędzy komórkami eksplantatu”. Hipotezę tę Autorka sukcesywnie i z powodzeniem zweryfikowała pozytywnie. Analizom poddano eksplantaty ogonków



liściowych i międzywęźli, pochodzące z etiolowanych sporofitów *C. delgadii* oraz ogonków pobieranych z nieetiolowanych roślin. W kolejnych publikacjach oryginalnych Doktorantka nakreśliła cykl charakterystycznych i specyficznych przemian zachodzących podczas analiz modelu jednokomórkowego pochodzenia zarodków somatycznych z epidermy ogonków liściowych badanego gatunku paproci. Na uwagę zasługuje ogrom analizowanych rezultatów i jednocześnie klarowna ich prezentacja, rzeczowa analiza oraz trafne spostrzeżenia w każdym z przedstawionych artykułów.

W pierwszej pracy eksperymentalnej (Grzyb i in. 2017, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*) określono poziom endogennych hormonów i cukrów w eksplantatach zdolnych i niezdolnych do indukcji somatycznej embriogenezy, jak również dynamikę zmian w poziomie endogennych hormonów i cukrów w trakcie 14-dniowej kultury eksplantatów zdolnych do wytworzenia zarodków. Stwierdzono, że poziom endogennych cukrów i badanych fitohormonów (auksyny, cytokininy, ABA) jest zależny od warunków świetlnych, w których przebywały rośliny donorowe. Etiolacja roślin donorowych powoduje obniżenie zawartości endogenego ABA i cukrów (glukozy, fruktozy i sacharozy) oraz zwiększenie poziomu endogennej auksyny IAA i kilku badanych cytokinin. Co ciekawe od tych warunków zależy także uruchomienie zdolności/kompetencji eksplantatu do formowania zarodków somatycznych. Wydaje się bowiem, że to brak światła podczas prowadzenia kultury staje się kluczowym elementem sterującym morfogenezą *in vitro*, zapewniając odpowiedni balans koncentracji poszczególnych hormonów, czyniąc tym samym jedynie etiolowany eksplantat zdolnym do indukcji somatycznej embriogenezy. Czy zatem można tę zdolność potencjalnie wykorzystać na wczesnym etapie indukcji somatycznej embriogenezy poprzez odpowiednie sterowanie dodatkami regulatorów wzrostu, na przykład przez zmiany zawartości auksyn/cytokinin/cukrów, co może być swoistym przełącznikiem programu różnicowania komórki i wejścia na szlak indukcji embriogenezy? Co więcej, czy tego rodzaju zabiegi mogą być potencjalnie zastosowane dla nieetiolowanych eksplantatów, aby nabyły charakteru embriogenicznego? W literaturze przedmiotu funkcjonują dwa opisywane typy procesów angażujące „zaindukowane embriogenicznie zdeterminowane komórki” IEDC (z ang. *Induced Embryogenic Determined Cells*), jak to ma miejsce podczas embriogenezy somatycznej pośredniej, dla odróżnienia od tych, które już pierwotnie taką kompetencję posiadały, czyli gdy zarodki somatyczne formują się bezpośrednio tylko z tych komórek roślinnych, które są kompetentne już w momencie izolowania z rośliny macierzystej, czyli z „proembriogenicznie zdeterminowanych komórek” PEDCs (z ang. *Pre-Embryogenically Determined Cells*). Jakie jest zdanie Autorki na ten temat w kontekście własnych badań? Rzeczywiście to brak światła, a nie zastosowana pożywka, pobudzał tylko komórki i tak predysponowane do różnicowania zarodków, ale czy potencjalnie możemy też włączyć w to inne czynniki?

Kolejna praca (Grzyb i in., 2018, *Acta Physiologiae Plantarum*) stanowi kontynuację podjętych badań, a jej głównym celem było określenie wpływu jaki wywierają inhibitory transportu i biosyntezy hormonów na indukcję somatycznej embriogenezy. Zastosowane inhibitory transportu auksyny (TIBA), biosyntezy ABA (fluridon) i biosyntezy etylenu (kwas salicylowy) całkowicie hamowały formowanie zarodków somatycznych, przypuszczalnie poprzez zmiany poziomu endogennych hormonów w trakcie inicjalnej kultury eksplantatów ogonków liściowych *C. delgadii*, a w konsekwencji zaburzenie poziomu fitohormonów skutkowało także zmianą zawartości endogennych cukrów (glukozy, fruktozy, sacharozy).



Skutkiem tego typu zaburzeń równowagi hormonalnej jest uniemożliwienie przekierowania programu rozwojowego komórek somatycznych w kierunku somatycznej embriogenezy i w efekcie zahamowanie tworzenia zarodków somatycznych.

W najnowszej publikacji z 2020 roku (Grzyb i in., 2020, *Plant & Cell Physiology*) Autorka przeanalizowała zmiany w komunikacji symplastowej komórek inicjalnego eksplantatu ogonka w czasie wczesnej indukcji somatycznej embriogenezy jak i wszystkie etapy postępującej izolacji symplastowej podczas formowania się i dojrzewania zarodka somatycznego paproci *C. delgadii*. Było to możliwe dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej i specyficznych niskocząsteczkowych fluorochromów transportu symplastowego, tj.: HPTS czy fluoresceina. Dodatkowo wzbogacono to analizami ultrastruktury komórki epidermy, tuż przed wystąpieniem jej pierwszych podziałów. Uzyskana dokumentacja fotograficzna jest bardzo dobrej jakości, a jako Recenzent prac naukowych życzyłabym sobie otrzymywać prace o tak wysokiej jakości obrazów i mikrografii. Doktorantka jednoznacznie wykazała, że warunkiem wyzwolenia embriogenicznej kompetencji jest właśnie ograniczenie symplastowej łączności pomiędzy komórkami eksplantatu. Chciałabym w tym miejscu zapytać Autorkę, czy w literaturze przedmiotu przedstawiane są także wyniki badań obrazujące możliwość symplastycznej komunikacji podczas innych typów morfogenezy *in vitro*, np. podczas organogenezy bezpośredniej, w wyniku której formowane są pąki, mające połączenie waskularne z eksplantatem pierwotnym? Zapewne jest to znakomita metoda, pozwalająca na odkrycie wczesnych etapów dyferencjacji poszczególnych regionów/tkanek pąków. Nasuwa mi się jeszcze pytanie metodyczne dotyczące tej pracy, jako, że Autorka badała żywotność komórek podczas prowadzenia kultur z zastosowaniem jodku propidyny i roztworu błękitu Ewansa, jakie były kryteria doboru właśnie tej metody, a nie innych dostępnych i równie skutecznych w przypadku materiału roślinnego? Czy chodziło tylko o możliwość ich niezakłóconej wizualizacji (po FDA) i rejestracji?

W ostatniej pracy (Grzyb i Mikuła, 2019, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*) Doktorantka podjęła się analizy wpływu typu eksplantatu, rozmiarów donorowego liścia, egzogennej sacharozy i desykcji powietrznej na pochodzenie zarodków somatycznych i efektywność somatycznej embriogenezy u paproci *C. delgadii*. Wszystkie badane czynniki wpływały istotnie na zmianę programu rozwojowego podczas inicjacji kultur i tworzenie zarodków. Jednakże kluczowe wydaje się w tym aspekcie pochodzenie materiału donorowego będącego źródłem eksplantatów. Eksplantat pierwotny istotnie wpływa bowiem na efektywność somatycznej embriogenezy, co więcej zarodki somatyczne otrzymane na eksplantacie ogonka były inicjowane podziałami pojedynczych komórek epidermy, zaś w przypadku międzywęźli powstawały poprzez jednoczesne podziały wielu sąsiadujących komórek epidermy i kory pierwotnej, co jednak wcale nie zwiększało ogólnej efektywności embriogenezy. Co niezwykle interesujące, 45-minutowe traktowanie roztworem sacharozy spowodowało aż 4-krotne zwiększenie efektywności somatycznej embriogenezy w przypadku kultur międzywęźli, zaś zahamowanie formowania zarodków na eksplantatach ogonków. Na podstawie analiz mikroskopowych Autorka interpretuje zwiększenie efektywności procesu somatycznej embriogenezy uzyskiwanego na międzywęźlach jako efekt zmiany drogi różnicowania somatycznych zarodków z wielo- w jednokomórkową, czyli analogiczną do uzyskiwanej na eksplantatach z pojedynczych komórek epidermy ogonków liściowych. Nasuwa się zatem pytanie dlaczego traktowanie roztworem sacharozy ogonków powodowało zahamowanie różnicowania zarodków somatycznych? Proszę Doktorantkę o próbę wyjaśnienia tego stanu rzeczy, zwłaszcza, że



jednym z wyników publikacji nr 1 było nagłe 6-krotne zwiększenie koncentracji sacharozy w szóstym dniu kultury, traktowane jako „przełącznik” dla wejścia na szlak somatycznej embriogenezy.

Wszystkie przytoczone powyżej prace są bardzo dobrze napisane, w których wstęp z przeglądem literatury jest omówieniem i usystematyzowaniem dotychczasowej wiedzy z przedmiotu badań. Wyniki są oryginalne i zawierają element nowatorski. Na uwagę zasługuje umiejętność dyskusji uzyskanych wyników badań i zestawienia ich z danymi literaturowymi, co nie jest proste, biorąc pod uwagę mnogość badanych czynników i rzadki model eksperymentalny. Cytowane prace zostały dobrane prawidłowo i wskazują na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Autorka dochodzi do kluczowych, jasno sprecyzowanych wniosków, wskazując czynniki decydujące o możliwości nabywania/uruchomienia kompetencji embriogenicznej, jak i uzyskiwania w pełni uformowanych i funkcjonalnych zarodków somatycznych. Tego rodzaju wnioski i usystematyzowanie wyników znajdują się na końcu dyskusji każdej z przedstawionych w rozprawie publikacji. Na uznanie zasługuje fakt, że wyniki dodatkowo podparte są dobrze dobranymi i przeprowadzonymi testami statystycznymi, takimi jak analizy wariancji, test t-studenta, test typu post-hoc LSD Fishera. Polskojęzyczne omówienie zamieszczone w pracy doktorskiej jest zakończone rozdziałem zatytułowanym „Dalsze plany badawcze”, w którym Doktorantka nakreśla potencjalne możliwości wykorzystania opracowanych w zespole badawczym Ogrodu Botanicznego PAN w Powsinie dwóch niezależnych modeli inicjacji somatycznej embriogenezy z embriogenicznie zdeterminowanych komórek u *C. delgadii* (z pojedynczych komórek eksplantatu ogonka lub z wielu komórek eksplantatu międzywęzła). Szczególnie interesujące i dość trudne wydaje się wyznakowanie w epidermie eksplantatu komórek zdolnych i niezdolnych do somatycznej embriogenezy, zanim pojawią się ich pierwsze podziały komórkowe dające początek różnicowaniu się zarodków somatycznych. Biorąc pod uwagę jednak wysokie kompetencje, bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i rozległą współpracę w zakresie analiz mikroskopowych, jestem pewna, że Doktorantka sprostą temu wyzwaniu bez problemów.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wartość merytoryczną rozprawy, znaczenie uzyskanych wyników oraz kompetencje Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Przedstawione nieliczne zapytania są podyktowane chęcią pobudzenia dyskusji i poznania opinii Doktorantki, zaś w niczym nie umniejszają wartości prezentowanej dysertacji. Uważam, że jest ona bardzo dobrym opracowaniem naukowym i wnosi nowe, istotne odkrycia, pozwalające lepiej poznać proces somatycznej embriogenezy u paproci *C. delgadii* oraz wskazać jego główne mechanizmy. Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, jako że uzyskana wiedza w zakresie czynników indukujących somatyczną embriogenezę może poszerzyć praktyczne wykorzystanie tego procesu np. u roślin, u których zazwyczaj ta wysoce efektywna droga regeneracji jest trudna do zainicjowania. Przedstawiona do oceny praca doktorska dowodzi, że Pani mgr Małgorzata Grzyb posiadała umiejętność stawiania problemów badawczych, planowania badań i formułowania hipotez wraz z ich weryfikacją a także konfrontowania wyników badań własnych z tymi uzyskanymi przez inne zespoły badaczy.



Przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789). Uwzględniając również przepisy prawne zawarte w art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Grzyb do dalszych etapów przewodu doktorskiego, celem nadania stopnia doktora w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową, jakość i oryginalność przeprowadzonych badań wnioskuję o uhonorowanie i wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grzyb stosowną nagrodą.

Poznań, 20.07.2020

Agnieszka Bagniewska-Zadworna