

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek
pt. „Badania nad przełamaniem latencji podziałowej, rozwojem kolonii komórkowych
oraz regeneracją roślin w kulturach protoplastów *Fagopyrum esculentum* Moench.
oraz *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.”**

Wprowadzenie

Regeneracja roślin *in vitro* z protoplastów została opisana dość dawno i otworzyła szerokie możliwości prowadzenia badań zarówno podstawowych jak i stosowanych. Protokoły regeneracji roślin z protoplastów otwierają nowe możliwości badania morfogenezy roślin, a jednocześnie stanowią punkt wyjścia do opracowywania biotechnologicznych metod doskonalenia roślin uprawnych. W ostatnim czasie potrzeba dysponowania takimi protokołami jest coraz większa, ponieważ umożliwiają one stosowanie technologii edytowania genów w układzie gdzie kompleksy białkowo-rybonukleinowe są dostarczane bezpośrednio do protoplastów, z których następnie regenerowane są rośliny. Jak dotychczas nie opracowano powtarzalnych i wydajnych protokołów regeneracji roślin z protoplastów dla uprawnych gatunków gryki - gryki tatarskiej i gryki zwyczajnej. Stąd też podjęta przez Kandydatkę tematyka badawcza, dotycząca kultur protoplastów gryki, jest w pełni uzasadniona. Tematyka rozprawy wpisuje się w aktualne trendy badawcze i jednocześnie stanowi podwaliny pod rozwój metod biotechnologicznych na potrzeby doskonalenia gryki. Należy podkreślić, że gryka zwyczajna wpisuje się głęboko w polską tradycję i kulturę kulinarną, a jednocześnie jest gatunkiem o stosunkowo niewielkiej zmienności genetycznej. Drugi badany gatunek, gryka tatarska, nie jest w Polsce uprawiana, ale ze względu na szereg ciekawych cech jest uznawana za potencjalny gatunek uprawny w bliskiej przyszłości.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani magister inżynier Magdaleny Zaranek, dotycząca kultur protoplastów gryki, została wykonana w Instytucie Biologii Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana doktora habilitowanego Aleksandra Betekhitna, profesora Uniwersytetu Śląskiego i Pani doktor habilitowanej Ewy Grzebelus, profesor Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Badania wykonane w ramach pracy wpisują się w prace nad biotechnologią gryki prowadzone przez zespół Profesora Betekhitna jak też w prace nad poznawaniem uwarunkowań zdolności do regeneracji roślin *in vitro* prowadzone przez zespół Pani Profesor Grzebelus. Należy podkreślić, że współpraca promotorów i wzajemnie uzupełniające się kompetencje naukowe przełożyły się na wysoki poziom badań wykonanych w ramach ocenianej rozprawy.

Dane formalne rozprawy

Rozprawa jest przygotowana w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (cykl prac). W jej skład wchodzi trzy oryginalne współautorskie prace, opublikowane w uznanych pismach naukowych ujętych w wykazie ministra. Prace te zostały opublikowane w latach 2023-2025. Dwie prace zostały opublikowane w piśmie BMC Plant Biology, a trzecia w Plant Cell Tissue and Organ Culture. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac jest wysoki i wynosi 10.9, a liczba punktów ministerialnych wynosi 380. Kandydatka jest pierwszym autorem w dwóch pracach (P1 i P3) i pierwszym równorzędnym autorem w trzeciej pracy (P2). Prace stanowiące rozprawę Kandydatka poprzedziła wstępem i uzasadnieniem podjęcia tematyki badawczej, przedstawiła hipotezy i cele badawcze, krótko omówiła materiały i metodykę badań, a także wyniki zawarte w poszczególnych publikacjach, a na zakończenie przedstawiła podsumowanie i wnioski oraz załączyła bibliografię. Rozprawa liczy 98 stron, a Kandydatka odwołuje się do 100 pozycji literaturowych. Do rozprawy dołączono streszczenia i komplet oświadczeń współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy. Z oświadczeń wynika, że wkład Kandydatki w badania był wiodący i merytorycznie znaczący - Kandydatka opracowywała i optymalizowała metodykę badań, wykonała większość prac badawczych, wykonywała obserwacje, analizowała i interpretowała otrzymane wyniki, uczestniczyła w przygotowaniu pierwszych i ostatecznych wersji manuskryptów. Oświadczenia współautorów publikacji są zgodne z oświadczeniami Kandydatki, a także z informacjami zamieszczonymi w poszczególnych publikacjach. W rozprawie, a także w poszczególnych publikacjach stanowiących rozprawę, zamieszczono informacje o tym, że badania zostały wykonane w ramach projektu OPUS19 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Ponadto, część badań była wykonana w ramach trzymiesięcznego stażu zagranicznego, który Kandydatka odbyła na Uniwersytecie Paul Sabatier w Tuluzie, we Francji. W pracy przedstawiono też informacje o tym, że wyniki badań uzyskane w ramach realizacji pracy były prezentowane na czterech konferencjach – trzech krajowych i jednej zagranicznej. Na podkreślenie zasługuje to, że trzykrotnie były to prezentacje ustne, a tylko jeden raz poster. Dodatkowo, w pracy zamieszczono informację, że Kandydatka jest współautorką podręcznika na temat metodyki prowadzenia kultur protoplastów gryki w monografii wydanej w 2024 roku przez wydawnictwo Springer.

Ocena rozprawy

Wstęp do rozprawy stanowi wprowadzenie literaturowe, w którym Kandydatka przedstawiła grykę i jej znaczenie użytkowe, omówiła kultury protoplastów, proces biogenezy ściany komórkowej oraz najważniejsze czynniki transkrypcyjne i białka związane z embriogenezą. Wprowadzenie zostało zilustrowane dwiema autorskimi rycinami, przedstawiającymi typy kalusów i ogólny schemat regeneracji roślin z protoplastów. Trochę zabrakło mi schematu ilustrującego budowę ściany komórkowej (podrozdział 6.3). Taki schemat ułatwiłby zrozumienie wyników zawartych w publikacji P3. Wprowadzenie jest napisane dość ogólnie, ale wobec tego, że jest uzupełnione szczegółowymi przeglądami literatury zawartymi w poszczególnych artykułach stanowiących rozprawę, jest w zupełności wystarczające.

W kolejnych rozdziałach pracy Kandydatka przedstawiła uzasadnienie podjęcia tematu badawczego, a następnie zdefiniowała hipotezy i cele badawcze pracy. Hipotezy są dobrze sformułowane, choć w moim odczuciu hipotezy druga i czwarta, dotyczące czynników wpływających na zdolności rozwojowe protoplastów, mogłyby być połączone.

W rozdziale materiały i metody Kandydatka przedstawiła wykorzystywane materiały, a następnie metody badawcze. Bardziej szczegółowo materiały i metody są opisane w poszczególnych publikacjach. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie polskiej odmiany gryki zwyczajnej, a w przypadku gryki tatarskiej, która nie jest w Polsce uprawiana, odmiany uprawianej w Europie środkowo-wschodniej. W swej pracy Kandydatka wykorzystwała szereg metod, które obejmowały techniki kultur *in vitro*, techniki mikroskopowe w połączeniu z immunodetekcją, analizy ekspresji genów i analizy proteomiczne w połączeniu z analizami statystycznymi i bioinformatycznymi. Należy podkreślić, że Kandydatka stosowała trudne metody, wymagające dużej precyzji i dbałości o szczegóły techniczne. Punktem wyjścia dla poszczególnych doświadczeń było wyizolowanie dobrej jakości żywotnych protoplastów i założenie z tych protoplastów kultur wolnych od mikroorganizmów. Tak więc wykonanie doświadczeń wymagało od Kandydatki bardzo dobrego przygotowania warsztatowego.

Zasadniczą część rozprawy stanowią trzy wieloautorskie publikacje naukowe, które zostały opublikowane w uznanych pismach o zasięgu międzynarodowym. Prace te są spójne tematycznie i przedstawiają nowe protokoły regeneracji roślin z protoplastów gryki, a także dostarczają nowej wiedzy na temat procesów zachodzących we wczesnych etapach regeneracji roślin gryki na drodze somatycznej embriogenezy.

Wykonane w pierwszym etapie prace były ukierunkowane na opracowanie protokołu izolacji protoplastów i regeneracji roślin z tych protoplastów dla gryki tatarskiej. Punktem wyjścia był protokół opracowany wcześniej dla marchwi. Testowano pozyskiwanie protoplastów z różnych typów kalusa i hypokotyli, stosując różne kombinacje enzymów, regulatorów wzrostu i innych czynników wpływających na izolację, immobilizację i podziały protoplastów oraz komórek kalusa. To pozwoliło na opracowanie wydajnego protokołu izolacji protoplastów, inicjacji kalusa i finalnie regeneracji roślin. Kluczowe w tych pracach było wykorzystanie do pozyskiwania protoplastów kalusa o wysokim potencjale regeneracyjnym oraz zastosowanie sulfokiny do przełamania latencji podziałowej. Ponadto, ważne było dobranie czynnika zestalającego podłoże oraz optymalnej kombinacji fitohormonów. Pomocne okazały się wykonane analizy histologiczne, które pozwoliły wnioskować o procesach morfogenetycznych zachodzących w rozwijającym się kalusie, co pomogło w ustaleniu warunków regeneracji roślin. Kandydatka systematycznie przedyskutowała uzyskane wyniki wskazując, że jest to pierwszy opublikowany protokół regeneracji roślin z protoplastów gryki tatarskiej (publikacja P1). Opracowanie protokołu izolacji protoplastów z gryki tatarskiej i regeneracji roślin z tych protoplastów niewątpliwie duży sukces Kandydatki, będący następstwem dobrze zaplanowanych doświadczeń i systematycznego badania czynników wpływających na kulturę protoplastów.

W drugim etapie prac Kandydatka podjęła udaną próbę opracowania protokołu regeneracji roślin z protoplastów gryki zwyczajnej. Podobnie jak w przypadku gryki tatarskiej udało się opracować wydajny protokół izolacji protoplastów i regenerację roślin. Ponownie, kluczowe okazało się wytypowanie do izolacji protoplastów kalusa o wysokim potencjale regeneracyjnym i zastosowanie sulfokiny do przełamania latencji podziałowej. Ponadto, w przypadku tego gatunku ważne było wykazanie, że tidiazuron skutecznie indukuje somatyczną embriogenezę (publikacja P2). Dyskutując uzyskane wyniki Kandydatka odniosła się do wcześniejszych prac, w tym własnej pracy dotyczącej gryki tatarskiej. Wskazała też, że po raz pierwszy dla gryki zwyczajnej opracowano protokół regeneracji roślin z protoplastów pozyskiwanych z embriogenego kalusa, wcześniej bowiem znany był tylko protokół regeneracji roślin z protoplastów pozyskiwanych z hypokotyli.

W ostatnim etapie badań, będącym zwieńczeniem wcześniejszych prac, Kandydatka mogła porównać procesy zachodzące we wczesnych etapach regeneracji roślin z protoplastów gryki zwyczajnej i gryki tatarskiej. Badania zostały wykonane dla kalusów uzyskanych z protoplastów, w 5, 30 i 50 dniu po izolacji protoplastów. Kandydatka wykonała analizy histologiczne ściany komórkowej, zbadała ekspresję wybranych genów kodujących białka związane z regeneracją roślin *in vitro* i przeprowadziła analizy porównawcze proteomu. W tej części badań należy podkreślić wysoką jakość analiz histologicznych, w których zastosowano różne sposoby immunodetekcji składników ściany komórkowej, to pozwoliło wnioskować o jej przebudowie we wczesnych etapach procesu regeneracji roślin. Jeżeli chodzi o analizę ekspresji różnych grup genów zaangażowanych w procesy regeneracji to mam tutaj pewien niedosyt - trochę szkoda, że Kandydatka, dysponując odpowiednimi materiałami, nie wykonała profilowania transkryptomowego. To pozwoliłoby całościowo rozpoznać geny zaangażowane we wczesne etapy regeneracji roślin gryki *in vitro*, i być może zidentyfikować nowe geny, kluczowe dla regeneracji roślin *in vitro* na drodze somatycznej embriogenezy. Analizy proteomiczne ujawniły, że w kalusach gryki, na stosunkowo wysokim poziomie ulegały akumulacji białka z grupy LEA, a także endochitynazy, związane z embriogenezą, co wykazywano wcześniej u innych gatunków (publikacja P3). Wyniki tej części badań zostały bardzo dobrze opublikowane, są to pierwsze prace pozwalające zrozumieć kluczowe procesy zachodzące we wczesnych etapach regeneracji roślin w kulturach protoplastów gryki.

W kolejnym rozdziale rozprawy Kandydatka przedstawiła podsumowanie najważniejszych wyników badań. W moim odczuciu ten rozdział nie jest potrzebny, gdyż Kandydatka przedstawiła podsumowania wyników poszczególnych publikacji, a ponadto w pracy zamieszczone są streszczenia rozprawy.

W ostatnim rozdziale pracy Kandydata przedstawiła siedem wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Wnioski te są zgodne z celami pracy i weryfikują postawione hipotezy badawcze. W moim odczuciu niektóre wnioski mają charakter podsumowania i myślę że mogłyby być lepiej sformułowane (wnioski 2, 4 i 5).

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek dostarcza nowej wiedzy na temat procesów zachodzących w procesie regeneracji roślin z izolowanych protoplastów dwóch gatunków gryki, a wymiernym wynikiem pracy są protokoły regeneracji roślin z protoplastów. Kandydatka wykonała szereg doświadczeń, które wymagały świetnego przygotowania warsztatowego, szczególnie w zakresie inicjacji i prowadzenia kultur protoplastów, ale także nowoczesnych metod mikroskopii i genomiki funkcjonalnej. Wykonane doświadczenia pozwoliły Kandydatce zweryfikować postawione hipotezy i osiągnąć cele pracy. Praca jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, a wyniki są świetnie udokumentowane. Należy podkreślić, że praca jest bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Nie mam żadnych wątpliwości, że Kandydatka posiada umiejętności pozwalające na samodzielne prowadzenie badań naukowych.

Pytania do Kandydatki

Wyniki badań Kandydatki zostały opublikowane w uznanych pismach naukowych i przeszły proces recenzowania. Są bardzo dobrze opracowane i dogłębnie przedyskutowane.

W związku z tym mam do Kandydatki pytania o charakterze dyskusyjno-polemicznym:

- (1) We wprowadzeniu wymieniono kluczowe czynniki transakcyjne związane z nabywaniem kompetencji embriogennych przez rośliny. Ostatnie badania wskazują na rolę czynników transkrypcyjnych z rodziny WOX (WUSCHEL-related homeobox). Czy takie czynniki mogą być zaangażowane w nabywanie kompetencji embriogennych w kulturach *in vitro* gryki?
- (2) W pracy Kandydatka odnosi się do wykorzystania "stabilnego genetycznie" kalusa gryki, między innymi w pierwszej hipotezie badawczej i publikacji P1. Jak należy rozumieć pojęcie stabilności genetycznej kalusa? Jakie warunki powinny być spełnione, aby można było uznać, że dany kalus jest genetycznie stabilny?
- (3) Podczas opracowywania protokołów regeneracji roślin gryki kluczowe okazało się zastosowanie fitosulfokiny. W jaki sposób ten związek został odkryty? Jaka jest specyfika jego budowy? Czy znany jest dokładny mechanizm molekularny działania fitosulfokiny?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny **rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek** pt. "Badania nad przełamaniem latencji podziałowej, rozwojem kolonii komórkowych oraz regeneracją roślin w kulturach protoplastów *Fagopyrum esculentum* Moench. oraz *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn." **w pełni spełnia wymogi formalne** stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o **dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania doktorskiego**. Jednocześnie, w związku z uzyskaniem przez Kandydatkę oryginalnych wyników badań które zostały opublikowane w renomowanych pismach naukowych, **wnoszę o wyróżnienie rozprawy**.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski