



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 02.07.2025

Dr hab. Marzena Popielarska-Konieczna, prof. UJ
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Instytut Botaniki, Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
+48 12 664 60 27
m.popielarska-konieczna@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Magdaleny Zaranek
zatytułowanej:

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

**„Badania nad przełamaniem latencji podziałowej, rozwojem kolonii
komórkowych oraz regeneracją roślin w kulturach protoplastów
Fagopyrum esculentum Moench. oraz *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.”**

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem Pana Promotora dr hab. Alexandra Betekhtina, prof. uczelni oraz Pani Promotor dr hab. inż. Ewy Grzebelus, prof. uczelni.

OCENA PRACY

Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze zbioru trzech artykułów naukowych wraz ze wspólnym opisem w języku polskim, który obejmuje (wg Spisu treści) następujące rozdziały: *Wstęp*, *Hipotezy i cele badawcze*, *Materiały i metody*, *Omówienie wyników przeprowadzonych badań* (zamieszczonych w poszczególnych publikacjach), *Podsumowanie* oraz *Wnioski*. Rozprawa jest uzupełniona o wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku angielskim i polskim, spis cytowanej literatury (*Bibliografia*), a także oświadczenia współautorów artykułów naukowych o ich wkładzie w powstanie poszczególnych publikacji. Wszystkie artykuły będące podstawą rozprawy są opublikowane w języku angielskim w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i indeksowanych w najważniejszych bazach bibliometrycznych: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* w roku 2023 (IF=2.3) i dwa artykuły w *BMC Plant Biology* w roku 2023 oraz 2025 (IF=4,3). Tematyka badań zaprezentowana w artykułach jest

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

spójna i dotyczy kultur protoplastów wybranych gatunków *Fagopyrum*. Wszystkie artykuły są wieloautorskie, dlatego istotne było określenie własnego wkładu Autorki rozprawy w powstanie danej pracy. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym Autorem, a jej indywidualny wkład był znaczący i polegał m.in. na optymalizacji i przeprowadzeniu eksperymentów, obserwacjach mikroskopowych, przeprowadzeniu analiz statystycznych, opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej i udziału w powstaniu ostatecznej wersji manuskryptów. Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania formalne.

Wartość naukowa rozprawy

Poznanie mechanizmów regulujących potencjał rozwojowy komórek roślinnych ma istotne znaczenie dla badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Praca doktorska przedstawia badania nad procesami, które zachodzą w kulturze protoplastów podczas ich rozwoju, pierwszych podziałów komórkowych, a następnie formowania kolonii komórkowych i kalusa o potencjale regeneracyjnym u wybranych gatunków z rodzaju *Fagopyrum*. Przedstawiona do recenzji praca dostarcza nowych istotnych i praktycznych danych na temat modyfikacji warunków kultury protoplastów w celu optymalizacji ich dalszego rozwoju. W pracy przeanalizowano także zmiany w składzie ściany komórkowej, jak również zmiany molekularne na poziomie proteomu oraz ekspresji genów i czynników transkrypcyjnych podczas pierwszych podziałów komórkowych, formowania kolonii komórkowych, a następnie minikalusa.

Część merytoryczna rozprawy obejmuje trzy publikacje naukowe (oznaczone jako P1, P2 oraz P3) wymienione w rozdziale 2 zatytułowanym *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*. Kolejny rozdział, *Wstęp* wprowadza w tematykę rozprawy. Następnie Doktorantka formułuje *Cele i hipotezy badawcze*. W kolejnym rozdziale *Materiały i metody* są zebrane informacje o materiale roślinnym i technikach zastosowanych w publikacjach P1, P2 oraz P3. Najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w rozdziale *Omówienie wyników prowadzonych badań*, stanowiącym właściwą część rozprawy. Rozdział ten został podzielony na trzy podrozdziały, z których każdy przybliża poszczególne publikacje: P1, P2 oraz P3. Kolejne rozdziały to *Podsumowanie* oraz *Wnioski*. Część merytoryczną kończy *Uzupełnienie* (o pozostałym dorobku naukowym Doktorantki), *Bibliografia* (obejmująca ponad 80 pozycji) oraz *Oświadczenia autorów*.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wstęp jest podzielony na kilka podrozdziałów, w których Doktorantka wyjaśnia główne zagadnienia dotyczące tematu jej rozprawy. Doktorantka opisuje znaczenie gospodarcze i uzasadnia wybór materiału badawczego, czyli gryki zwyczajnej, *Fagopyrum esculentum* i gryki tatarskiej, *Fagopyrum tataricum*, ze szczególnym uwzględnieniem kalusa jako źródła do otrzymania protoplastów. Doktorantka przedstawia zagadnienia związane z protoplastami roślinnymi, koncentrując się zarówno na specyfice warunków kultury *in vitro*, jak i na ich zdolnościach do plastyczności rozwojowej. Ponadto przybliży temat zmian w składzie chemicznym ściany komórkowej oraz ich wpływ na przebieg procesów determinujących losy komórki. *Wstęp* kończy przypomnienie o znaczeniu wybranych czynników transkrypcyjnych i białek związanych z potencjałem embriogennym.

Wydział Biologii

W Rozdziale 7 Doktorantka uzasadnia podjęcie tematu badawczego, natomiast w Rozdziale 8 formułuje hipotezy badawcze oraz wyznacza cele badawcze. Rozdział 9 to zwięzła prezentacja zastosowanego materiału roślinnego i metod badawczych w odniesieniu do każdej publikacji (P1, P2 oraz P3).

Instytut Botaniki

Rozdział 10 zatytułowany *Omówienie wyników prowadzonych badań* jest podzielony na trzy podrozdziały, z których każdy zawiera artykuł naukowy. Każda publikacja jest poprzedzona kilkustronicowym omówieniem wyników przedstawionych w danym artykule.

Przedmiotem publikacji P1 jest kultura protoplastów *F. tataricum*. W pracy przetestowano wiele wariantów kultury, od wyboru materiału donorowego, poprzez skład mieszaniny do maceracji, rodzaj podłoża do immobilizacji, skład pożywki bazowej. Efektem publikacji P1 jest po raz pierwszy uzyskana regeneracja z kultury protoplastów gryki tatarskiej oraz udowodnienie pozytywnego wpływu fitosulfokiny na rozwój protoplastów tego gatunku.

Wyniki uzyskane w P1 stały się przyczynkiem do przeprowadzenia badań nad regeneracją roślin *F. esculentum* metodą kultury protoplastów. Badania z tego zakresu były wprawdzie obiektem doniesień publikowanych od początku lat 80-tych ubiegłego wieku, jednak informacje o niskiej efektywności podziałów komórkowych, braku lub niskiej efektywności regeneracji skłoniły Doktorantkę do podjęcia prób nad modyfikacją procedur. W przypadku gryki zwyczajnej (podobnie jak u gryki tatarskiej) Doktorantka z sukcesem zastosowała kalus jako źródło protoplastów, suplementację pożywki fitosulfokiną oraz immobilizację w agarozie. Publikacja P2 to zarówno protokół efektywnej regeneracji gryki zwyczajnej, jak i szczegółowe wyniki badań nad wpływem warunków kultury na poszczególne etapy rozwoju protoplastów.

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Publikacje P1 i P2 ujawniły zmiany w przebiegu rozwoju minikalusa i regeneracji z protoplastów *F. tataricum* oraz *F. esculentum*. To skłoniło Doktorantkę do bardziej wnikliwej analizy procesów zachodzących w kulturze protoplastów tych dwóch gatunków. Doktorantka wzięła pod uwagę trzy punkty czasowe: 5 dzień (pierwsze podziały komórkowe) i 15 dzień (kolonie komórkowe). W przypadku formowania mikrokalusa był to 30 dzień kultury dla gryki zwyczajnej oraz 50 dzień kultury dla gryki tatarki. Efektem analiz jest Publikacja 3, która prezentuje obszerne wyniki dotyczące rozmieszczenia składników ściany komórkowej i zmian na poziomie molekularnym (proteomu oraz ekspresji wybranych genów) podczas rozwoju kolonii komórkowych z protoplastów gryki tatarki i gryki zwyczajnej. Co ciekawe, część wyników uzyskanych z badań proteomicznych została potwierdzona przez analizę ekspresji genów, jak w przypadku viciliny.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

W kolejnym Rozdziale 11 zatytułowanym *Podsumowanie* Doktorantka proponuje kierunki dalszych badań, w których można wykorzystać dane uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej, a także przybliżyć główne osiągnięcia pracy doktorskiej. Natomiast w rozdziale 12 Doktorantka wypunktowała wnioski, które wysnuła na podstawie przeprowadzonych badań.

Lektura rozprawy skłoniła mnie do sformułowania następujących pytań pod adresem Doktorantki:

1) Przedstawione badania są bardzo obszerne, obejmują analizy histologiczne, immunohistologiczne i molekularne. Na szczególną uwagę zasługują (zawarte w publikacji P3) analizy dotyczące zmian w rozmieszczeniu składników ściany komórkowej oraz obecności specyficznych białek w koloniach komórkowych. Stwierdzono m.in. obfitość arabinogalaktanów (nie tylko w ścianie komórkowej), natomiast dane proteomiczne wskazały m.in. na obecność endochitynaz. W literaturze można znaleźć doniesienia (doi: 10.1104/pp.112.203075, doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110700), sugerujące, że endochitynazy wpływają na rozpad arabinogalaktanów, a uwolnione w ten sposób glukany pełnią kluczową funkcję sygnałową w procesach rozwojowych, w tym somatycznej embriogenezy. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować eksperyment, który mógłby potwierdzić lub zaprzeczyć ewentualnej kluczowej roli endochitynaz w indukcji somatycznej embriogenezy w kulturze protoplastów gryki? Tym bardziej, że w dyskusji w Publikacji P3 jest wzmianka o możliwej roli endochitynaz w powstawaniu

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

cząsteczek sygnałowych, które mogą mieć wpływ na formowanie zarodków somatycznych gryki.

2) Bardzo ciekawy wynik, który uzyskała Doktorantka dotyczy wzrostu kumulacji białek typowo związanych z materiałami zapasowymi nasion w koloniach komórkowych. Taka strategia, wg Doktorantki: (...) może wskazywać na przygotowanie kultury do zdarzeń somatycznej embriogenezy, (...)"'. Ważnym źródłem budulca i energii jest także skrobia, której kumulacja w eksplantatach wg literatury (doi.org/10.1023/A:1022345011002, doi.org/10.1079/IVP2006827) może poprzedzać morfogenezę, w tym somatyczną embriogenezę. Doktorantka zaobserwowała ziarna skrobiowe w 50-dniowym mikrokalusie gryki tatarki (Publikacja P3). Jak Doktorantka wytłumaczy brak wzmianki o takich obserwacjach w publikacji P1? Ponadto, czy Doktorantka zaobserwowała ziarna skrobiowe w mikrokalusie gryki zwyczajnej? Jeśli nie, to z czego może to wynikać? Z wieku kultury? Mikrokalus gryki zwyczajnej z publikacji P3 miał podobną wielkość, jak mikrokalus gryki tatarki, ale nieco inny wiek.

Uwagi krytyczne

Rozprawa jest napisana w sposób jasny i poprawny stylistycznie, ale w tak obszernej pracy trudno uniknąć drobnych błędów. *Wstęp*, strona 9: „(...) pozwoliło na regenerację roślin w stosunkowo krótkim czasie tj. 2-5 miesięcy od momentu regeneracji.” – zapewne Doktorantka miała na myśli „od momentu izolacji”. *Wstęp*, strona 19: „U roślin jeno- jaki i dwuliściennych (...)”, powinno być „jedno- jak i dwuliściennych”.

W Rozdziale 12 zatytułowanym *Wnioski*, niektóre z nich (jak np. Wniosek 2) to niemal kopie zdań zamieszczonych w *Podsumowaniu*.

Zarówno w *Podsumowaniu*, jak i we *Wnioskach* brak odniesienia do postawionych w Rozdziale 8 hipotez i celów badawczych. W mojej opinii w rozdziale *Wnioski* oprócz wypunktowania najważniejszych wyników i wniosków, Doktorantka powinna skonfrontować je z hipotezami i celami badawczymi. Warto również scalić Rozdziały 11 i 12 w celu uniknięcia niepotrzebnych powtórzeń.

Powyższe uwagi, bardziej dotyczące kwestii redakcyjnych, nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Ocena końcowa:

W mojej opinii rozprawa Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek stanowi ważny wkład naukowy w badania nad regeneracją roślin metodą kultur protoplastów. Przedstawione badania są obszerne, a zastosowane liczne zaawansowane techniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

i uzyskane wyniki są wysokiej jakości i na międzynarodowym poziomie, czego dowodem jest ich opublikowanie w czasopismach naukowych z listy JCR. Niewątpliwym atutem prezentowanej rozprawy jest fakt, że jej wyniki są cenne nie tylko dla dalszych badań podstawowych, ale i aplikacyjnych w celu, np. poprawy plonowania gryki. Ponadto, za najważniejsze osiągnięcia rozprawy uważam:

- 1) Wykazanie, że kalus (morfogeny gryki tatarki oraz embriogeny gryki zwyczajnej) jest lepszym materiałem donorowym dla uzyskania regeneracji roślin z kultury protoplastów, niż hypokotyle siewek.
- 2) Wykazanie pozytywnego wpływu immobilizacji protoplastów w niskotopliwej agarozie oraz suplementacji pożywki fitosulfokina na rozwój kultury protoplastów gryki.
- 3) Wykazanie korelacji między rozmieszczeniem ekstensyn i łańcuchów bocznych ramnogalaktanów w ścianie komórkowej, a różnicowaniem się kolonii komórkowych.
- 4) Wykazanie, że w koloniach komórkowych dochodzi do akumulacji białek zapasowych charakterystycznych dla nasion oraz białek związanych z somatyczną embriogenezą, takich jak endochitynazy.
- 5) Wykazanie, że w koloniach komórkowych dochodzi do wzrostu ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z regeneracją roślin oraz genów związanych z somatyczną embriogenezą.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek *spełnia warunki* określone w art. 187 ustawy 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, z uwagi na wysoką jakość pracy oraz jej potencjał badawczy, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Zaranek.

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl

mgr Marzena Popielarska-Konieczna
Marzena Popielarska-Konieczna