

Kraków, 23.07.2025

dr hab. inż. Agnieszka Kielkowska, prof. URK
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Autor pracy: Reneé Pérez Pérez

Tytuł pracy: Protoplast-based approaches in *Fagopyrum esculentum* Moench. and *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn: insights into growth regulation, regeneration efficiency and hybrid cell wall dynamics

Temat rozprawy:

Rozprawa doktorska autorstwa pani Reneé Pérez Pérez koncentruje się na dwóch gatunkach gryki - *Fagopyrum tataricum* i *F. esculentum*. Dla obu gatunków prowadzono badania nad kulturami protoplastów oraz ich fuzją. W pierwszej kolejności badania skupiały się na selekcji materiału wyjściowego, optymalizacji izolacji protoplastów, optymalizacji warunków kultury i suplementów do pożywek, testowaniu metod immobilizacji protoplastów oraz na optymalizacji regeneracji roślin (publikacje P1 i P2). Następnie przeprowadzono eksperymenty nad elektrofuzją protoplastów obu gatunków i analizowano dynamikę odbudowy ściany komórkowej w kulturach protoplastów obiektów rodzicielskich oraz hybrydowych *F. esculentum* + *F. tataricum* (publikacja P3). Na końcu określono wpływ dodatku do pożywek inhibitorów i adsorbentów związków fenolowych na kultury protoplastów i regenerację roślin *F. tataricum* (publikacja P4).

Pani Reneé Pérez Pérez była pierwszą autorką jednej publikacji, dzieląc równorzędne autorstwo z drugim autorem (P4); drugą autorką w dwóch publikacjach (P1, P2), dzieląc równorzędne autorstwo z pierwszym autorem w publikacji P2; oraz trzecią autorką w jednej publikacji (P3). Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki i realizowane w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach i były prowadzone pod kierunkiem dr hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ, oraz dr Anny Milewskiej-Hendel.

Struktura

Rozprawa liczy 142 strony i zawiera wykaz publikacji, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele i hipotezy badawcze, metodykę oraz opis wyników, wraz z załączonymi publikacjami, suplementem i bibliografią. W suplemencie Autorka przedstawiła dodatkową aktywność publikacyjną realizowaną podczas studiów doktoranckich. Oświadczenia współautorów publikacji stanowiących rozprawę doktorską znajdują się na końcu rozprawy.

Trzon rozprawy stanowią cztery tematycznie powiązane publikacje (P1–P4), opublikowane w latach 2023–2024 w dwóch renomowanych czasopismach z dziedziny nauk biologicznych: *BMC Plant Biology* (P1 i P4) oraz *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (P2 i P3). Publikacje poprzedzone są ogólnymi streszczeniami w języku angielskim, zawierającymi zakres pracy oraz najważniejsze wnioski. Parametry bibliograficzne rozprawy to: łączny IF = 13,2; oraz łączna liczba punktów MNiSW = 480.

Cele, hipotezy i metody

Autorka sformułowała 6 celów badawczych obejmujących optymalizację kultur protoplastów i regeneracji roślin z kalusa otrzymanego z kultur protoplastów *F. tataricum* i *F. esculentum*, w tym wpływ inhibitorów szlaków biosyntezy fenoli oraz adsorbentów fenolowych, a także identyfikację kluczowych zmian strukturalnych, genetycznych i metabolicznych wywołanych tymi substancjami. Celem było również opracowanie protokołu elektrofuzyjnego prowadzącego do powstania komórek hybrydowych pomiędzy *F. esculentum* i *F. tataricum*, oraz efektywnego systemu selekcji takich komórek, a także analizę odbudowy ściany komórkowej metodą immunobarwienia.

Analogicznie do celów, Autorka przedstawiła 6 hipotez naukowych. Hipoteza pierwsza dotycząca czynników wpływających na rozwój protoplastów oraz trzecia dotycząca elektrofuzyjnych połączeń są bardzo ogólne i były już weryfikowane we wcześniejszych badaniach na różnych gatunkach, ale nie konkretnie na gryce. Pozostałe hipotezy, dotyczące odbudowy ściany komórkowej i zróżnicowanego odkładania arabinogalaktanów, ekstensyn, pektyn i celulozy w trakcie kultury oraz wpływu inhibitorów fenoli i adsorbentów związków fenolowych na proces regeneracji, są oryginalne i spełniają wymóg nowości naukowej stawiany rozprawom doktorskim.

W pracy zastosowano szeroki zakres technik, w tym kultury in vitro, utrwalanie materiału roślinnego i zatapianie w żywicy LR-white, cięcie bloczków żywicy na mikrotomie, barwienie cytologiczne (błękit toluidyny), immunobarwienie z wykorzystaniem przeciwciał, elektrofuzyjne łączenie protoplastów za pomocą elektroporatora i selekcję komórek hybrydowych z użyciem barwienia różnicowego fluorochromami i mikromanipulatora, obserwacje mikroskopowe (światło przechodzące i fluorescencja), analizy biochemiczne (metody kolorymetryczne Folina–Ciocâlțu i z chlorkiem glinu, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)), analizę metabolomiczną (spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości z elektrorozpylaniem infuzyjnym (FIE-HRMS) i ultrasprawa chromatografia cieczowa (UHPLC)), analizy molekularne (qPCR), cytometrię przepływową oraz analizy bioinformatyczne i statystyczne.

Najważniejsze wyniki i osiągnięcia

Publikacja P1 (Zaranek i in. 2023, *BMC Plant Biology*) przedstawia wyniki optymalizacji kultur protoplastów *F. tataricum* oraz regeneracji roślin z kalusa pochodzącego z protoplastów. Eksplantaty wykorzystywane do uzyskania protoplastów pochodziły z hipokotyli siewek oraz kalusa niemorfogenego i morfogenego. Aktywność celulazy i pektynazy umożliwiała izolację protoplastów z obu typów kalusa. Natomiast do skutecznej izolacji protoplastów z hipokotyli konieczne było uzupełnienie roztworu enzymatycznego o driselazę. Efektywniejsze tworzenie kolonii kalusowych zaobserwowano po zatopieniu protoplastów w agarozie, w porównaniu do matrycy alginianowej. Suplementacja pożywki do kultury fitosulfokina (PSK) sprzyjała odbudowie ściany komórkowej, stymulowała podziały mitotyczne komórek pochodzących z protoplastów, tworzenie agregatów, co w konsekwencji prowadziło do powstawania kalusa. Regeneracja roślin poprzez somatyczną embriogenezę i organogenezę zachodziła jedynie z protoplastów izolowanych z kalusa. Obserwacje histologiczne kalusów otrzymanych z protoplastów izolowanych z kalusa wykazały obecność komórek merystematycznych, natomiast kalus otrzymany z protoplastów pochodzenia hipokotylowego zbudowany był głównie z komórek miękiszowych z dużymi wakuolami i peryferyjnie położonymi jądrami, co sugeruje niższy potencjał regeneracyjny.

W publikacji P1, pani Reneé Pérez Pérez była odpowiedzialna za optymalizację pożywki regeneracyjnej dla kalusów *F. tataricum*, jednak nie uczestniczyła w doświadczeniach związanych z izolacją i kulturą protoplastów, ani nie miała znaczącego udziału w pisaniu publikacji.

Publikacja P2 (Zaranek i in. 2023, *PCTOC*) ma bardzo podobną strukturę jak P1, lecz skupia się na *F. esculentum*. Protoplasty izolowano z hipokotyli oraz kalusa embriogenego uzyskanego z niedojrzałych zarodków. W celu izolacji protoplastów testowano różne mieszaniny enzymatyczne zawierające celulazy, pektylazy, macerozym lub driselazę. Unieruchomienie wyizolowanych protoplastów w kroplach agarozy o niskiej temperaturze topnienia, wraz z dodatkiem α -fitosulfokiny (PSK), zwiększyło aktywność mitotyczną kultur, tworzenie kolonii i późniejszy rozwój mikrokalusów. W badaniu zastosowano także poliwinylpirolidon (PVP) w dwóch stężeniach, jednak nie zaobserwowano jego korzystnego wpływu na kulturę protoplastów. Mikro-kalus uzyskano z protoplastów pochodzących z obu eksplantatów i poddano je regeneracji. Rośliny zregenerowano zarówno z protoplastów pochodzących z kalusa, jak i z hipokotyli. Thidiazuron dodany do pożywki regeneracyjnej przyspieszał somatyczną embriogenezę, podczas gdy połączenie benzyloaminopuryny i kinetyny promowało zarówno somatyczną embriogenezę, jak i organogenezę u *F. esculentum*. Analiza dwóch linii embriogenych kalusów wykorzystywanych do izolacji protoplastów wykazała różnice w ich budowie histologicznej, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje dotyczące ich zdolności regeneracyjnych.

W publikacji P2 zaangażowanie pani Reneé Pérez Pérez było wyraźniejsze niż w P1 – uczestniczyła we wszystkich etapach doświadczeń, od izolacji po regenerację roślin pochodzących z kultur protoplastów *F. esculentum*. Przeprowadziła także analizy histologiczne i interpretację uzyskanych z tych analiz wyników oraz pisanie manuskryptu.

Publikacja P3 (Sala-Cholewa i in. 2024, *PCTOC*) dotyczy czaso-przestrzennej analizy regeneracji ściany komórkowej protoplastów pochodzących z kalusa *F. tataricum*, *F. esculentum* oraz ich komórek hybrydowych (heterokarionów). Komórki hybrydowe uzyskano za pomocą elektrofuzji protoplastów obu gatunków wcześniej zabarwionych różnicowo fluorochromami, następnie wyławiano je z mieszaniny pofuzyjnej za pomocą mikromanipulatora i zakładano kulturę poprzez immobilizację w kroplach agarozowych. Do analizy odbudowy ściany komórkowej wykorzystano przeciwciała wykrywające główne składniki ściany komórkowej tj. celulozę, arabinogalaktany, ekstensynę, ksyloglukan i pektyny. Wyniki wykazały brak istotnych różnic w odbudowie ściany komórkowej między komórkami hybrydowymi i rodzicielskimi, choć zaobserwowano pewne różnice w pojawianiu się i zanikaniu poszczególnych epitopów komponentów ściany komórkowej w czasie do 72 godzin.

W publikacji P3 pani Reneé Pérez Pérez była odpowiedzialna za zakładanie kultur protoplastów, eksperymenty elektrofuzyjne, odławianie komórek hybrydowych przy użyciu mikromanipulatora, wykonanie niektórych immunobarwień oraz analizę wyników. Uczestniczyła również w pisaniu manuskryptu.

Publikacja P4 (Pérez-Pérez i in. 2025, *BMC Plant Biology*) przedstawia wyniki optymalizacji regeneracji roślin *F. tataricum* z mikro-kalusa pochodzącego z protoplastów poprzez dodatek do pożywki adsorbentów i inhibitorów związków fenolowych. Protoplasty izolowano z dwóch różnych linii kalusa, zatapiano w kroplach agarozowych i prowadzono na pożywkach zawierających: kwas aminooksyoctowy (AOA), α -aminooksy- β -fenyloalaninowy (AOPP), chlorowodorek O-benzylohydroksyloaminy (OBHA), 2-aminoindan-2-fosfonowy (AIP) oraz poliwinylpirolidon (PVP). Pożywkę regeneracyjną suplementowano AIP i PVP. Komórki pochodzące z protoplastów dzieliły się na wszystkich pożywkach z wyjątkiem tych zawierających AOA (we wszystkich testowanych stężeniach) oraz 3% PVP, które hamowały podziały. Cytometria przepływowa wykazała, że regeneranty uzyskane z kultur traktowanych 10 μ M AIP i 1% PVP były diploidami, natomiast wyższe stężenia tych związków (100 μ M AIP i 3% PVP) hamowały regenerację. Traktowanie protoplastów AOPP i OBHA skutkowało regeneracją roślin tetraploidalnych. Analiza metabolomiczna wykazała, że AIP istotnie obniżał zawartość związków fenolowych, zwłaszcza rutyny i zwiększał stosunek zredukowanego do utlenionego glutationu, co wskazuje na zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Analiza transkryptomyczna wykazała podwyższoną ekspresję genów związanych z embriogenezą somatyczną (np. *LEC2*, *BBM*, *WUSCHEL*) w kalusie traktowanym AIP.

W publikacji P4 pani Reneé Pérez Pérez uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań, zakładała kultury protoplastów oraz eksperymenty regeneracyjne, mierzyła zawartość związków fenolowych i flawonoidów oraz brała udział w pisaniu manuskryptu.

Uwagi krytyczne:

1. **Wstęp** – opis heterostylii u *Fagopyrum* i opis morfologii kalusa są zbyt rozbudowane, zajmując aż cztery strony. Obie kwestie wykraczają poza główny zakres rozprawy i powinny zostać zredukowane do minimum. Dla kontrastu, informacje o kulturach protoplastów i ich fuzji – kluczowe elementy pracy – zostały przedstawione bardzo skrótowo. Brakuje krytycznego przeglądu dotyczącego izolacji protoplastów (w tym enzymów i buforów), ich oczyszczania, kultury oraz regeneracji. Tylko opis odbudowy ściany komórkowej jest wystarczająco szczegółowy. Autorka krótko opisuje podstawy

hybrydyzacji somatycznej, jednak nie uwzględnia metod selekcji produktów fuzji, które też zastosowała w swoich badaniach.

2. Tematy dotyczące kultur protoplastów i regeneracji powinny zostać omówione łącznie z efektami działania inhibitorów fenolowych i adsorbentów, ponieważ te substancje były stosowane w kulturze do poprawy jej efektywności. W związku z tym, kolejność publikacji w dyskusji powinna być: P1, P2, P4, P3.
3. **Hipotezy (s. 25)** – hipoteza 1 jest zbyt ogólna i pokrywa się z hipotezą 5 (dotyczącą adsorbentów i inhibitorów fenolowych oraz ich wpływu na kultury protoplastów). Obie hipotezy powinny zostać przereformowane, tak by były bardziej precyzyjne i zróżnicowane.
4. W streszczeniach publikacji autorka używa nieprecyzyjnych określeń, np. „*regeneration products*” (s. 12), „*green structures*”, „*study demonstrated the viability of the protoplast-to-plant system*” (s. 46) itd. Ponadto, termin ‘*cultivation*’ jest bardzo często używany przez Autorkę w kontekście kultur *in vitro* (np. s. 72, 85, 94), podczas gdy jest on bardziej odpowiedni do uprawy polowej lub szklarniowej. Należy unikać tego typu nieścisłości terminologicznych, bo budzi to wątpliwości co do znajomości prawidłowej terminologii.
5. **Materiały roślinne (s. 26)** – na początku akapitu Autorka wspomina o uprawie roślin w szklarni, a na końcu akapitu podaje, że protoplasty izolowano z hipokotyli i niedojrzałych zarodków. Związek między tymi informacjami nie jest jasny – czy rośliny szklarniowe służyły do pozyskania nasion, z których izolowano zarodki? Jeśli tak – należy to jednoznacznie zaznaczyć w tekście; jeśli nie – to należało pominąć opis uprawy szklarniowej.
6. **P1 (s. 30–44)** – w tej publikacji brakuje kluczowej informacji o pochodzeniu materiałów roślinnych *F. tataricum* (np. odmiana, linia hodowlana, inne źródło). Powinno to zostać uzupełnione.

Pytania:

1. **We wstępie (s. 17)** oraz w tekście publikacji P1, P2, P3 autorzy używają terminu „*cell aggregate*”, natomiast w publikacji P4 – „*cell colony*”. Proszę wyjaśnić różnicę między tymi pojęciami w kontekście kultur tkankowych roślin.
2. **P1 (s. 29)** – opis pożywki BM wymaga rewizji, ponieważ podane stężenia molowe są nierealistycznie wysokie. Przykładowo, 6 M pirydoksyny to ok. 1015 g/l, co jest dalece

nieprawidłowe. Najprawdopodobniej wystąpiły błędy w obliczeniach. Proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii.

3. **P1** – autorzy zastosowali dwa systemy unieruchamiania komórek: błonki alginianowe i krople agarozowe. Jakie są metody i korzyści unieruchamiania protoplastów? Proszę omówić potencjalne wady i zalety obu metod zastosowanych w pracy, również w kontekście różnych objętości zastosowanych do tworzenia błonek i kropli.
4. **P1 (s. 41)** – dlaczego autorzy użyli różnych antybiotyków (tikarcyklina disodowa i cefotaksym disodowy) w kulturach protoplastów pozyskanych z kalusa i hipokotyli? Proszę o wyjaśnienie tej kwestii, biorąc pod uwagę, że niektóre antybiotyki mogą wykazywać aktywność podobną do auksyn.
5. W kilku miejscach (np. s. 39, 57, 58 itd.) autorzy używają określenia „*protoplast division*”, które jest nieprawidłowe. Proszę o uzasadnienie, dlaczego sformułowanie to jest błędne.
6. **P4** – badanie wykazało, że zastosowanie AOPP i OBHA w pożywce skutkowało regeneracją roślin tetraploidalnych. Proszę przedstawić możliwe wyjaśnienie tego zjawiska.

Podsumowanie

Rozprawa pani Reneé Pérez Pérez pogłębia wiedzę z zakresu nauk biologicznych w kontekście wpływu warunków kultury na funkcjonowanie komórki roślinnej (żywołność, regeneracja ściany komórkowej, podziały komórkowe), oraz przedstawia molekularną i metaboliczną rolę związków fenolowych w regeneracji roślin *in vitro*. Praca zaowocowała również opracowaniem protokołu do indukcji somatycznej hybrydyzacji u *Fagopyrum* z wykorzystaniem elektrofuzji oraz systemu do manualnej selekcji komórek hybrydowych z wykorzystaniem barwienia różnicowego i mikromanipulacji.

Udział pani Reneé Pérez Pérez w realizacji pracy przedstawionej w rozprawie był istotny i spełnia wymagania ustawodawcy dotyczące współautorstwa, w tym kryterium indywidualnego wkładu kandydata. Oprócz czterech publikacji zawartych w rozprawie, Doktorantka była współautorką trzech rozdziałów w monografiach „*Methods in Molecular Biology*” wydawnictwa Springer. Wyniki badań zostały także zaprezentowane ustnie na dwóch konferencjach krajowych i w formie plakatu na jednej konferencji zagranicznej. W trakcie studiów Doktorantka odbyła również dwumiesięczny staż zagraniczny na Uniwersytecie w Heidelbergu.

W związku z powyższym, stwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, opiera się na właściwej metodologii i spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024, poz. 1571). Wniosuję zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o **dopuszczenie pani Reneé Pérez Pérez do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.



Dr hab. inż. Agnieszka Kiełkowska, prof. URK

Z uwagi na fakt, iż doktorantka nie posługuje się językiem polskim, poniżej dołączono również tłumaczenie powyższego tekstu na język angielski w punktach dotyczących komentarzy i kwestii do wyjaśnienia.

Critical comments:

1. Section Introduction – the description of heterostyly in *Fagopyrum* and the description of callus are overly extensive, occupying a total of four pages. Both topics fall outside the main scope of the dissertation and should be reduced to a minimum. In contrast, the information concerning protoplast cultures and protoplast fusion—key elements of the dissertation—is presented very briefly. The *Introduction* lacks a critical overview of protoplast isolation (including enzymes and buffers), purification, culturing, and the regeneration process. Only the description of cell wall reconstruction is adequate and sufficiently detailed. The Author briefly outlines the basics of somatic hybridization; however, the methods of selection of fusion products are missing.
2. Topics related to protoplast cultures and regeneration should be discussed together with the effects of phenolic inhibitors and adsorbents, as these substances were applied during culture, not during electrofusion experiments. Accordingly, the order of publications in the discussion should be revised to: P1, P2, P4, P3.
3. Section Hypothesis, page 25 – hypothesis 1 is too general and shares similar content with hypothesis 5 (regarding phenolics adsorbents and inhibitors and their effect on protoplast cultures). Both hypotheses should be rewritten to ensure greater precision and differentiation.
4. In the summaries of presented papers, the Author used imprecise descriptions such as ‘regeneration products’ on page 12, ‘green structures’, ‘study demonstrated the viability of the protoplast-to-plant system’ on page 46, and other similar. Furthermore, the term *cultivation* is repeatedly used (e.g., pages 72, 85, 94, etc.) in the context of *in vitro* tissue cultures, whereas this term is more commonly associated with field or greenhouse conditions. Such usage may suggest a lack of familiarity with correct scientific terminology and should be corrected and avoided in the future.
5. Section Plant Materials, page 26 – in the first paragraph, the Author provides information on plant growth in the greenhouse, and at the end of the paragraph states that protoplasts were isolated from hypocotyls and immature embryos. However, the connection between those two aspects is unclear. Were the greenhouse-grown plants used for seed production, with the seeds

subsequently used for embryo extraction? If so, this should be explicitly stated; if not, the description of plant cultivation should be omitted.

6. P1, pages 30-44 – this publication lacks crucial information on the plant material of *Fagopyrum tataricum* (e.g., cultivar, breeding line, or other source material). This should be specified.

Questions:

1. Section Introduction, page 17, and in publications P1, P2, P3 authors use terms ‘*cell aggregate*’ and in publication P4 they refer to ‘*cell colony*’. Please clarify the distinction between those two in the context of plant tissue cultures.
2. P1, page 29 – the description of BM medium requires revision, as the reported molar concentrations are unrealistically high. It seems likely that there were errors in calculations, as i.e. 6M of pyridoxine corresponds to approximately 1015 g per liter, which is implausible. Please explain.
3. P1 – Authors applied two systems of cell immobilization, namely alginate layers and agarose beads. What are the methods and benefits of protoplast immobilization? Please discuss the potential pros and cons of each of method used in the study, also considering the different aliquots applied for layers and beads.
4. P1, page 41 – why did Authors used different antibiotics (ticarcillin disodium or cefotaxime disodium) in callus- or hypocotyl-derived protoplast cultures? Please elaborate on this point particularly considering that some antibiotics can mimic auxin activity.
5. In several instances (e.g., pages 39, 57, 58 etc.) the Authors used the term ‘*protoplast division*.’ This statement is inaccurate. Please propose an explanation why.
6. P4 – the study showed that application of AOPP and OBHA to the culture medium resulted in the regeneration of tetraploid plants. Please provide a possible explanation for this outcome.



