



INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN
im. Franciszka Górskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
POLISH ACADEMY OF SCIENCES
The Franciszek Górski
INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY

Prof. dr hab. inż. Edyta Skrzypek
Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biotechnologii
ul. Niezapominajek 21
30-239 Kraków

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr René Pérez-Pérez pt. „Protoplast-based approaches in *Fagopyrum esculentum* Moench. and *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn: insights into growth regulation, regeneration efficiency and hybrid cell wall dynamics”.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z 22.05.2025 r.

Uzasadnienie wyboru tematyki badawczej

Od czasu wyizolowania po raz pierwszy przez Edwarda Cockinga w 1960 r. protoplastów przy zastosowaniu metody enzymatycznego trawienia ściany komórkowej coraz częściej przeprowadza się manipulacje z wykorzystaniem protoplastów roślinnych. Mają one głównie na celu udoskonalenie roślin poprzez zwiększenie ich produktywności oraz zawartości substancji biologicznie czynnych. Fuzja protoplastów jest narzędziem biotechnologicznym o szerokim zastosowaniu nie tylko w ulepszaniu upraw, ale i podstawowych badaniach biologicznych. Umożliwia ona tworzenie nowych mieszańców somatycznych pochodzących z różnych gatunków lub odmian. Ponadto przeprowadzenie fuzji protoplastów pozwala na wyhodowanie roślin wolnych od patogenów wirusowych i bakteryjnych, tolerancyjnych na herbicydy jak również roślin odpornych na działanie niekorzystnych czynników środowiska. Fuzja protoplastów pozwala na uzyskanie mieszańców roślin, których nie udaje się otrzymać tradycyjnymi metodami hodowli, np. przez krzyżowanie.

Wyprowadzanie kultur protoplastów i fuzja protoplastów nie są uważane za łatwe metody. Wymagają technicznych umiejętności i starannej optymalizacji, szczególnie w przypadku niektórych gatunków roślin, np. z rodzaju *Fagopyrum* oraz charakteryzują się niską częstotliwością fuzji i niskim wskaźnikiem przeżywalności. Rodzaj *Fagopyrum* zawiera bardzo dużo różnego rodzaju związków fenolowych, których synteza i utlenianie negatywnie wpływają na żywotność kultur *in vitro* i hamują proces regeneracji. Z drugiej strony, m.in. w związku z wysoką zawartością związków fenolowych, gryka jest cennym, a ciągle niedostatecznie docenianym gatunkiem uprawnym pod względem wartości żywieniowej czy terapeutycznej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy kompleksowej analizy regulacji procesu regeneracji roślin w kulturach protoplastów gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum*

Moench.) i gryki tatarki (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) poprzez optymalizację metod izolacji protoplastów, prowadzenia kultur kalusa i protoplastów oraz zastosowanie związków chemicznych ograniczających syntezę i/lub immobilizujących związki fenolowe, które przyczyniają się do obumierania kultur.

W pracy po raz pierwszy opisano skuteczną metodę elektrofuzji protoplastów *F. esculentum* Moench. i *F. tataricum* (L.) Gaertn oraz opisano dynamikę procesu odbudowy ściany komórkowej w komórkach rodzicielskich i hybrydowych u w/w gatunków *Fagopyrum*.

Wybór tematu, cele pracy i metody badawcze uważam za w pełni uzasadnione.

Ocena formalna

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Reneé Pérez-Pérez została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem dr hab. Alexandra Betekhtin, prof. UŚ (promotor) oraz dr Anny Milewskiej-Handel (promotor pomocniczy). Badania przedstawione w rozprawie sfinansowano w ramach projektu Sonata Bis pt.: "Genetic analysis of the *Fagopyrum* somatic hybrids" (2020/38/E/NZ9/00033) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanego przez dr hab. Alexandra Betekhtin, prof. UŚ.

Rozprawa doktorska mgr Reneé Pérez-Pérez składa się z cyklu czterech wieloautorskich artykułów naukowych opublikowanych w latach 2023-2025. Dwie prace ukazały się w BMC Plant Biology, a dwie w Plant Cell Tissue and Organ Culture. Czasopisma te posiadają współczynnik wpływu 4,3 i 2,3 wg Web of Science i mieszczą się odpowiednio w pierwszym (Q1) i w drugim (Q2) kwartylu w dziedzinie Plant Sciences. Sumaryczny IF artykułów składających się na rozprawę wynosi 13,2 sumaryczna liczba punktów MNiSW - 480, a liczba cytowań - 15 (Web of Science, 30.07.2025).

Doktorantka jest drugą autorką jednej z prac (P1), autorką z równym wkładem z pierwszym lub drugim autorem dwóch prac (P2 i P4) oraz trzecią autorką w kolejnej pracy (P3). Informacje zamieszczone w publikacjach w podrozdziałach „Author Contributions” wskazują na wkład mgr Pérez-Pérez w prowadzenie badań, opracowywanie wyników i przygotowanie manuskryptów. Zgodnie z tymi informacjami w dwóch pracach Doktorantka była również współautorką koncepcji badań - definiowania problemu badawczego. W tym miejscu chciałabym również zaznaczyć ważną rolę pozostałych współautorów publikacji w rozwoju naukowym Doktorantki, a w szczególności promotora dr hab. Alexandra Betekhtin, prof. UŚ, ponieważ realizacja rozprawy doktorskiej była możliwa dzięki otrzymaniu przez promotora projektu badawczego NCN.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest współautorką trzech rozdziałów w książce wyd. Springer pt. „Buckwheat: Methods in Molecular Biology”.

Ponadto, Doktorantka prezentowała wyniki badań w postaci wystąpień ustnych i posteru na trzech międzynarodowych konferencjach naukowych: 15th International Buckwheat Symposium „Buckwheat for health”, 9th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2024 and 6th Symposium on Physiology and Breeding of Cereals.

Pani mgr Pérez-Pérez odbyła również dwumiesięczny staż w Uniwersytecie w Heidelbergu w ramach programu Erasmus+.

Ocena merytoryczna

W skład rozprawy doktorskiej mgr Reneé Pérez-Pérez wchodzi następujące publikacje:

1. Zaranek M., Pérez-Pérez R., Milewska-Hendel A. *et al.* Promotive effect of phytosulfokine - peptide growth factor - on protoplast cultures development in *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *BMC Plant Biol* **23**, 385 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04402-9>
2. Zaranek M., Pérez-Pérez R., Milewska-Hendel A. *et al.* Efficient and rapid system of plant regeneration via protoplast cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **154**, 673–687 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02542-2>
3. Sala-Cholewa K., Milewska-Hendel A., Pérez-Pérez, R. *et al.* Reconstruction pattern of the cell wall in *Fagopyrum* protoplast-derived hybrid cells. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **157**, 26 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02740-6>
4. Pérez-Pérez, R., Pinski, A., Zaranek, M. *et al.* Effect of potent inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase and PVP on in vitro morphogenesis of *Fagopyrum tataricum*. *BMC Plant Biol* **25**, 469 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06440-x>

Na podstawie analizy oświadczeń Doktorantki oraz współautorów publikacji stwierdzam, że jej wkład w powstanie prac był znaczący i tym samym został spełniony wymóg formalny stawiany rozprawom doktorskim. Doktorantka brała udział w większości prac eksperymentalnych, które obejmowały: przeprowadzenie doświadczeń, wykonanie pożywek do kultur *in vitro*, optymalizację metod izolacji i prowadzenia kultur protoplastów, obserwacje makro i mikroskopowe kultur, przygotowanie preparatów histologicznych, optymalizację metody elektrofuzji protoplastów i analizę wyników. Ponadto, uczestniczyła w przygotowaniu manuskryptów oraz ich poprawie zgodnie z uwagami recenzentów.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają charakter eksperymentalny i zostały poddane weryfikacji merytorycznej przez recenzentów w procesie publikowania, dlatego moja opinia koncentruje się na ocenie spójności zbioru prac i oryginalności wyników.

Przedstawione do oceny opracowanie (opis cyklu publikacji) zawiera następujące rozdziały: (1) wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji, (2) informacje o źródle finansowania badań, (3) wykaz stosowanych skrótów, (4) streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim, (5) streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim, (6) wstęp, (7) cele i hipotezy badawcze, (8) materiał i metody badawcze, (9) opis najważniejszych wyników do załączonych publikacji, (10) wnioski, (11) załącznik z wykazem rozdziałów w książce „Buckwheat: Methods in Molecular Biology”, których była współautorką oraz konferencji międzynarodowych, w których prezentowała wyniki badań, (12) wykaz literatury oraz (13) oświadczenia Doktorantki i współautorów poszczególnych publikacji dotyczące indywidualnego udziału w badaniach.

Opis cyklu publikacji został przygotowany w sposób przejrzysty i z dużą starannością zarówno pod względem językowym jak i edycyjnym. We wstępie dobrze opisuje tło literaturowe dla podjętej tematyki i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do lektury dalszej części rozprawy. Doktorantka opisuje w nim rodzaj *Fagopyrum*, jego znaczenie i wyzwania hodowlane, kultury tkankowe i protoplastów, mechanizm odbudowy ściany komórkowej protoplastów oraz somatyczną hybrydyzację jako alternatywną drogę pokonywania barier krzyżowalności.

Następnie Doktorantka formułuje cele i hipotezy badawcze. Cele zostały sformułowane poprawnie dla zweryfikowania przedstawionych hipotez badawczych.

W dalszej części rozprawy Doktorantka opisuje w sposób bardzo syntetyczny, a zarazem zawierający wszystkie najistotniejsze informacje na temat materiału roślinnego i zastosowanych metod badawczych. W mojej ocenie, zarówno obiekt badawczy jak i wykorzystane w rozprawie metody zostały dobrane właściwie. Szeroki zakres badań składających się na rozprawę wymagał od Doktorantki poznania i opanowania różnorodnych technik.

Następnie, kolejno opisuje najważniejsze wyniki poszczególnych eksperymentów opublikowanych w cyklu prac wchodzącym w skład rozprawy. Przebieg eksperymentów oraz duża część wyników została przedstawiona w formie graficznej: schematów, wykresów i fotografii, co było dużym ułatwieniem dla czytającego.

Wszystkie prace eksperymentalne składające się na rozprawę doktorską prezentują bardzo dobry poziom naukowy, tworzą logiczną całość, a uzyskane wyniki są wartościowe i w znacząco wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat prowadzenia kultur protoplastów gryki – wydajności metody, warunków prowadzenia kultury i regeneracji roślin, a przede wszystkim określenie czasoprzestrzennej dynamiki odbudowy i składu ściany komórkowej hybryd *F. esculentum* + *F. tataricum*. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że jeden spośród trzech zastosowanych inhibitorów amoniakolizacji *L*-fenyloalaniny (PAL), kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP), hamował syntezę związków fenolowych ograniczając tym samym poziom stresu oksydacyjnego, co z kolei sprzyjało większej efektywności regeneracji. Zwiększona regeneracja roślin po traktowaniu AIP została również potwierdzona wyższą ekspresją genów związanych z embriogenezą: *LEC2*, *BBM* oraz *WOUSCHEL*.

W kolejnej części opisu Doktorantka sformułowała wnioski kolejno dla wyników badań zamieszczonych w cyklu publikacji. Wnioski zostały również opatrzone krótkim podsumowaniem wykonanych badań i możliwością ich praktycznego zastosowania.

Opis zamyka wykaz 89 pozycji literatury, które ściśle związane są z tematyką badań podjętą przez Doktorantkę.

Za największe osiągnięcia badawcze prezentowane przez Doktorantkę uważam:

- optymalizację metody regeneracji roślin gryki z protoplastów izolowanych z kalusa, która doprowadziła do zwiększenia wydajności o prawie 30% i skrócenia czasu regeneracji od kilku do kilkunastu miesięcy w porównaniu z danymi literaturowymi dotyczącymi regeneracji roślin z protoplastów izolowanych z hipokotyli,
- wykazanie, że syntetyczny regulator wzrostu tidizauron (TDZ) i aktywny biologicznie pentapeptyd, α -fitosulfokinę (PSK- α), stymulują podziały komórek, tworzenie kolonii komórek i regenerację w kulturach protoplastów,
- otrzymanie hybrydowych komórek *F. esculentum* + *F. tataricum* oraz udowodnienie braku znaczących różnic w początkowym okresie formowania *de novo* ściany komórkowej hybryd w porównaniu do protoplastów rodzicielskich *F. esculentum* i *F. tataricum*,
- wykazanie, że kwas 2-aminoindano-2-fosfonowy (AIP) znacząco zmniejsza stres oksydacyjny w kulturach protoplastów i zwiększa ekspresję genów regulujących embriogenezę.

Podsumowując stwierdzam, iż dysertacja została przygotowana poprawnie, w sposób zgodny z wymogami stawianymi pracom doktorskim. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu i ma bardzo dużą wartość poznawczą. Po raz pierwszy opisano protokoły wydajnej izolacji protoplastów i regeneracji roślin gryki oraz elektrofuzji *F.*

esculentum + *F. tataricum*. O znaczeniu i jakości badań świadczy również ich publikacja w renomowanych czasopismach naukowych.

Analizując wyniki prac składających się na rozprawę jako spójną całość, proszę Doktorantkę o odniesienie się do kilku kwestii:

1. Zmiany ploidalności roślin gryki tatarskiej obserwowano po zastosowaniu dwóch inhibitorów PAL: AOPP i OBHA (praca P4), czy zdaniem Doktorantki warunki prowadzenia kultur lub zastosowane regulatory wzrostu (prace P1 i P2) mogły zmienić ploidalność zregenerowanych roślin?
2. Jakie czynniki według Doktorantki zdecydowały o sukcesie elektrofuzji protoplastów gryki zwyczajnej z gryką tatarską?
3. Jakie zmiany zachodzą podczas późniejszych etapów formowania *de novo* ściany komórkowej hybryd i protoplastów macierzystych? Czy zdaniem Doktorantki możliwa jest regeneracja takich hybrydowych roślin i co ją ogranicza na obecnym etapie badań?
4. W jakim celu Doktorantka przeprowadzała fuzję protoplastów gryki zwyczajnej z gryką tatarską? Jakie możliwości dla rolnictwa i przemysłu stwarza wytworzenie takich hybryd? Jakie cechy gryki zwyczajnej i gryki tatarskiej byłyby pożądane przez rolników i konsumentów w „super hybrydzie” w/w gatunków?

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską mgr Reneé Pérez-Pérez oceniam pozytywnie. Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowa analiza procesu morfogenezy w kulturach protoplastów gryki oraz skuteczna elektrofuzja protoplastów gryki zwyczajnej z gryką tatarską przeprowadzona przez Doktorantkę, właściwy wybór materiału badawczego, wskazanie udziału regulatorów wzrostu i inhibitorów syntezy związków fenolowych w tym procesie oraz potencjalne zastosowanie aplikacyjne uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym i merytorycznym oceniana dysertacja mgr Reneé Pérez-Pérez spełnia wymogi 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).

W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Reneé Pérez-Pérez z zakresu nauk biologicznych. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Reneé Pérez-Pérez do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Kraków, 04.08.2025 r.

Adres/Address:
Niezapominajek 21
30-239 Kraków, Polska/Poland
Bank: 31 1130 1150 0012 1266 3720 0001

Centrala/Phone: tel. +48 124251833
Dyrekcja/Management: tel./fax + 48 124251844 (102)
Księgowość/Chief Accountant: tel. +48 124251834 (104)
Lab. Fitotron/Phytotron Lab.: tel. +48 124253301

Regon: 356730850
NIP: PL 677-22-12-521
e-mail: ifr@ifr-pan.edu.pl
www.ifr-pan.edu.pl