

Kraków, 10.08.2020 r.

Prof. dr hab. inż. Iwona Żur
Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego*
Polska Akademia Nauk w Krakowie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grzyb

pt. „Cytomorfologiczne i fizjologiczne przemiany leżące u podstaw nabywania embriogenicznej kompetencji przez eksplantaty paproci drzewiastej *Cyathea delgadii* Sternb.”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Mikuły (promotor) i dr Justyny Wróbel-Marek (promotor pomocniczy) w Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej Polskiej Akademii Nauk Ogród Botaniczny w Powsinie.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z wytycznymi wynikającymi z Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i jej nowelizacji z dnia 3 lipca 2018 r. (art. 179 ust. 1).

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Autoreferatu, liczącego 31 stron i obejmującego wykaz dorobku naukowego, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezę badawczą i cel pracy, opis materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników i posumowanie badań. Autoreferat zawiera również opis dalszych planów badawczych i spis cytowanej literatury. Część drugą stanowi cykl czterech opublikowanych artykułów naukowych oraz oświadczenia doktorantki i współautorów o charakterze i zakresie pracy w poszczególnych publikacjach.

W skład rozprawy wchodzi trzy prace oryginalne opublikowane w latach 2017-2019 oraz jedna praca oryginalna przyjęta do druku w roku 2020. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. impact factor, IF) wynoszących od 1,364 do 3,929 (łącznie IF=9,883). We wszystkich pracach mgr Małgorzata Grzyb jest pierwszym autorem, a jej wkład w ich powstawanie był zasadniczy, obejmując: współudział w opracowywaniu koncepcji analiz, przygotowywanie materiału roślinnego, udział w eksperymentach, analizie i opracowywaniu wyników oraz w przygotowywaniu manuskryptów do publikacji. Wykaz dorobku naukowego zawiera listę pozostałych publikacji

oryginalnych, rozdziałów monografii naukowych oraz prezentacji na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Całość uzupełnia wykaz realizowanych projektów badawczych, odbytych szkoleń i staży naukowych oraz uzyskanych nagród.

Ocena merytoryczna

Przedłożona do recenzji rozprawa stanowi cykl publikacji dotyczących procesu embriogenezy somatycznej (ang. *somatic embryogenesis*, SE) i czynników warunkujących kompetencję komórek epidermy jednego z gatunków paproci drzewiastej (*Cyathea delgadii* Sternb.). Temat pracy doktorskiej jest niezwykle interesujący ze względu na unikalny model eksperymentalny pozwalający na uzyskanie szeregu nowych informacji dotyczących m.in. roli czynników hormonalnych i sygnalizacji międzykomórkowej w indukcji procesu SE.

Oryginalne artykuły naukowe składające się na rozprawę doktorską są tematycznie spójne, a tytuł rozprawy jest adekwatny do przedmiotu badań. Ze względu na fakt, iż opublikowane prace zostały uprzednio poddane ocenie przez edytora i recenzentów, niniejsza recenzja koncentruje się na ocenie autoreferatu, będącego autorskim podsumowaniem uzyskanych wyników.

Streszczenie rozprawy zawiera najważniejsze informacje dotyczące celu pracy i uzyskanych wyników. Tego rodzaju posumowanie powinno być syntetyczne jednak w mojej opinii niektóre fragmenty tej części rozprawy są zbyt ogólnikowe, brakuje np. informacji o rodzaju zastosowanych inhibitorów transportu i biosyntezy hormonów, zastosowanych modyfikacji kultury eksplantatów czy opisu zmian strukturalnych zachodzących w komórkach epidermy i kory związanych z indukcją SE.

Czterostronicowy wstęp rozprawy obejmuje syntetyczny przegląd historii badań poświęconych procesowi SE oraz opis uwarunkowań hormonalnych i symplastowej komunikacji międzykomórkowej rozważanych jako elementy regulujące uruchamianie tego procesu. Ostatni podrozdział przedstawia unikalny model eksperymentalny jaki stanowi tropikalna paproć drzewiasta - *Cyathea delgadii*, ze względu na indukcję procesu SE bez udziału egzogennych substancji wzrostowych oraz uwarunkowanie drogi rozwoju zarodków somatycznych od warunków świetlnych w jakich rozwijają się rośliny donorowe.

Ta część rozprawy również w niektórych aspektach jest zbyt ogólnikowa, np. ze względu na specyfikę modelu eksperymentalnego pożądane byłoby zamieszczenie przeglądu danych dotyczących potencjalnej roli światła, węglowodanów oraz czynników stresowych (zwłaszcza stresu osmotycznego) w indukcji SE. Interesujący byłby również bardziej szczegółowy opis komunikacji symplastowej, np. rodzaju transportu i regulacji przepustowości plasmodesm. Nieadekwatny jest też tytuł jednego z podrozdziałów – „4.1. Fizjologiczne aspekty indukcji SE” – który, w rzeczywistości odnosi się jedynie do regulacji hormonalnej. Co więcej, ze względu na zakres badań, rozdział ten powinien również zawierać informacje na temat zastosowanych inhibitorów syntezy i transportu substancji wzrostowych.

Hipoteza badawcza i cele pracy zostały prawidłowo, jasno sformułowane i przedstawione w sposób nie budzący zastrzeżeń.

Kolejny rozdział rozprawy zawiera opis materiału roślinnego stanowiącego obiekt badań oraz zastosowanych metod badawczych. Niestety schemat przeprowadzonych eksperymentów przedstawiono jedynie graficznie, na stosunkowo trudnej do interpretacji rycinie, nie ułatwiającej zrozumienia szczegółów metodycznych poszczególnych eksperymentów. W tekście tego rozdziału brak natomiast szeregu dość istotnych informacji np. po jakim czasie kultury wykonywano analizy biochemiczne i prowadzono obserwacje mikroskopowe. Tylko z załączonej ryciny wynika również, iż w badaniach zastosowano inkubację eksplantatów w roztworze sacharozy oraz desykcję eksplantatów w przepływie sterylnego powietrza. Zwyczajowo też, wprowadzane parametry, w tym wypadku współczynnik zdolności do produkcji somatycznych zarodków, powinny zostać zdefiniowane. Podobnie, wątpliwości budzi opis analizy statystycznej, gdyż wiarygodność średniej uzyskana z „minimum 2 powtórzeń biologicznych” może być istotnie różna, w zależności od tego co rozumiemy pod pojęciem „powtórzenia biologicznego”, które również powinno być wyraźnie zdefiniowane.

W odniesieniu do tego rozdziału rodzi się też pytanie natury merytorycznej: czy pomiar zawartość tylko kwasu indolilo-3-octowego (IAA) spośród endogennych auksyn był przemyślany i zamierzony? Wprawdzie aktywność pozostałych endogennych auksyn jest znacząco niższa lub nawet poddawana w wątpliwość (jak ma to miejsce w przypadku kwasu indolilo-3-masłowego) jednak ich udziału w procesie indukcji SE i różnicowania zarodków somatycznych nie można całkowicie wykluczyć.

Część rozprawy prezentująca uzyskane wyniki również w wielu miejscach jest zbyt ogólnikowa, zmuszając czytelnika do poszukiwania dodatkowych informacji w załączonych publikacjach. Generalnie brak informacji o dynamice rozwoju zarodków somatycznych *Cyathea delgadii*: czyli opisu zmian cytomorfologicznych zachodzących w komórkach epidermy eksplantatów, w trakcie analizowanego (nieco różnego w poszczególnych eksperymentach) okresu kultury *in vitro*. Innymi słowy, z tekstu autoreferatu nie wynika czy obserwowanym zmianom na poziomie fizjologicznym i metabolicznym towarzyszą kolejne etapy rozwoju zarodków somatycznych.

Zastosowany model badawczy umożliwił porównanie równowagi hormonalnej oraz zawartości wybranych węglowodanów w esplantatach inicjalnych o zróżnicowanym poziomie kompetencji do indukcji rozwoju embriogenicznego oraz monitorowanie zmian zachodzących w pierwszych etapach rozwoju zarodka somatycznego. Uzyskane dane, zamieszczone w publikacji 1 mają charakter nowatorski, poszerzając zakres wiedzy dotyczącej mechanizmu indukcji SE u roślin zarodnikowych. Moje zastrzeżenia budzi jedynie sformułowanie drugiego wniosku, gdyż ściśle rzecz biorąc etiolacja nie powoduje „obniżenia” czy „poniesienia” poziomu analizowanych hormonów czy cukrów – co można byłoby stwierdzić analizując dynamikę zmian zachodzących w czasie. W tym wypadku, nie znając poziomu wyjściowego, a porównując poziom akumulacji badanych substancji pomiędzy różnymi eksplantatami możemy jedynie stwierdzić, iż zawartość analizowanych substancji jest niższa lub wyższa w tkankach etiolowanych w porównaniu do tkanek nie-etiolowanych.

Zarzut zbyt ogólności dotyczy zwłaszcza opisu wyników przedstawionych w publikacji 2, w którym Autorka rozprawy całkowicie pominięła wpływ traktowania stosunkowo szerokim zakresem stężeń inhibitorów biosyntezy i transportu substancji wzrostowych na efektywność procesu SE, skupiając się jedynie na wynikach uzyskanych dla najwyższych stężeń. Co więcej, również w tym przypadku opis wpływu zastosowanych inhibitorów na poziom endogennych fitohormonów, równowagę hormonalną i zawartość cukrów jest bardzo pobieżny. Jako fizjologa moje poważne zastrzeżenia budzi również sprowadzenie roli kwasu salicylowego do roli inhibitora etylenu, z pominięciem jego głównej funkcji – udziału w reakcjach obronnych inicjowanych w odpowiedzi na różnego typu stresy środowiskowe. Wprawdzie hormon ten jest związany głównie z odpowiedzią roślin na stres biotyczny, jednakże spora liczba doniesień postuluje jego udział również w odpowiedzi na różnego typu abiotyczne czynniki stresowe m. in. stres osmotyczny, suszę czy stres temperaturowy. Oddziaływanie kw. salicylowego jest najprawdopodobniej związane z aktywacją genów kodujących czynniki antyoksydacyjne zaangażowane w usuwanie reaktywnych form tlenu, które to coraz częściej uważane są za substancje sygnałne indukujące proces embriogenezy w warunkach *in vitro*.

Bardzo interesujące wyniki uzyskano w badaniach dotyczących komunikacji symplastowej komórek eksplantatów ogonka liściowego *Cyathea delgadii* w trakcie indukcji SE i wstępnych fazach formowania zarodka somatycznego (publikacja 3). Wykazanie, iż uzyskaniu kompetencji komórek eksplantatów, a następnie inicjacji różnicowania zarodka somatycznego towarzyszy ograniczenie komunikacji symplastowej jest istotnym uzupełnieniem wiedzy dotyczącej mechanizmu indukcji i regulacji SE. Ponownie jednak uważam, iż ze względu na zastosowane interesujące metody badawczej bardziej szczegółowy opis i graficzne przedstawienie schematu eksperymentu i jego wyników (analogicznie do grafik zamieszczonych w publikacji) byłyby dużym ułatwieniem i znacząco podniosły czytelność niniejszej rozprawy.

Ze względu na przedmiot badań dotyczący wpływu rodzaju eksplantatu i czynników stresogennych na inicjację jedno- lub wielokomórkowej drogi rozwoju zarodków somatycznych wyniki przedstawione w publikacji 4, w mojej opinii powinny być omówione w pierwszym podrozdziale tej części rozprawy. Najistotniejszym osiągnięciem tej części prac badawczych jest udowodnienie, iż za pomocą stresu osmotycznego można sterować sposobem inicjacji zarodków somatycznych, zmieniając drogę rozwoju z wielo- na jednokomórkową. Istotnym skutkiem ubocznym, o charakterze aplikacyjnym, jest podniesienie efektywności procesu SE.

W części podsumowującej badania Autorka przedstawiła syntetyczny opis zagadnień stanowiących temat rozprawy oraz uzyskane rezultaty. Ta część rozprawy została poprawnie sformułowana potwierdzając osiągnięcie założonych celów i wiarygodną weryfikację hipotezy badawczej. Autorka załączyła również plany dalszych badań, które wydają się uzasadnione w świetle uzyskanych dotychczas wyników.

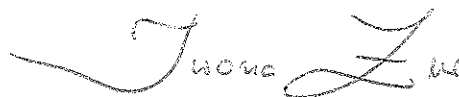
Końcowa część rozprawy zawiera spis literatury obejmujący 59 pozycji, w większości z ostatniej dekady świadcząc o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną, w sposób jasny i przystępny.

Podsumowując stwierdzam, że prace eksperymentalne stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy zostały prawidłowo zaplanowane i rzetelnie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i wnoszą nowe, ważne informacje w dziedzinie stanowiącej przedmiot badań. Co więcej, niektóre z uzyskanych wyników mają potencjał aplikacyjny i mogą zostać wykorzystane do opracowania bardziej efektywnych metod mikrorozmnażania, być może nie tylko dla gatunku będącego obiektem badań.

Przedstawione w recenzji uwagi krytyczne dotyczą głównie zbyt pobieżnego przedstawienia problematyki badawczej oraz metodyki i wyników poszczególnych eksperymentów, co nie umniejsza wartości merytorycznej recenzowanej pracy.

W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w art.179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Małgorzaty Grzyb do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. W. Z.' with a stylized flourish.