

Warszawa, 28.05.2025 r.

Prof. dr hab. Anna Mięka
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej 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.”**

**Praca wykonana pod kierunkiem promotorów: dra hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ
i dr hab. Ewy Grzebelus, prof. URK w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej
Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach**

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z dnia 25 kwietnia 2025 r. powołująca mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Zaranek.

2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Zaranek jest zbiorem trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2023-2025. Prace ukazały się w czasopismach naukowych notowanych w bazie JCR, mieszczących się w pierwszym kwartylu (Q1), tj.: BMC Plant Biology (dwie prace) i Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Są to renomowane czasopisma z dziedziny Plant Science, w których publikowane prace są poddawane wnikliwym i rzetelnym recenzjom przez grono międzynarodowych ekspertów, w rygorystycznym procesie redakcyjnym. Wskaźniki bibliometryczne mieszczą się w przedziale od 2.3 do 4.3, zaś punkty MEiN od 100 do 140. Sumaryczny roczny współczynnik oddziaływania jest wysoki i wynosi 10,9, zaś liczba uzyskanych punktów MEiN to 380.

Artykuły składające się na dysertację są 5- (dwie prace) i 10-autorskie. We wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem, w żadnym nie jest autorem korespondencyjnym. Wyraźnie został zaznaczony indywidualny wkład Doktorantki w powstanie prac. Zgodnie z oświadczeniami współautorów Kandydatka optymalizowała warunki doświadczeń nad izolacją i kulturą protoplastów oraz regeneracją roślin, przygotowywała materiał roślinny do badań mikroskopowych, molekularnych i proteomicznych, prowadziła obserwacje mikroskopowe i analizy statystyczne otrzymanych wyników, analizowała i opracowywała wyniki, przygotowywała manuskrypty do opublikowania. Dzięki temu nabyła umiejętność

samodzielnego prowadzenia eksperymentalnej pracy naukowej, wykonywania analiz, posługiwania się technikami mikroskopowymi, opracowywania wyników i przygotowywania prac do druku.

Przedstawiony cykl artykułów naukowych został poprzedzony 28-stronicowym, oryginalnym, syntetycznym opisem nadającym trzem pracom spójny charakter. Obejmuje on: spis treści, wykaz użytych skrótów, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy (z danymi bibliometrycznymi), zestawienie konferencji, w których Doktorantka aktywnie uczestniczyła, informacja o źródle finansowania i odbytym stażu naukowym. W części merytorycznej wstępu Doktorantka przybliżyła wiedzę na temat znaczenia gryki i pozyskanego z niej kalusa, protoplastów roślinnych, ściany komórkowej, a także czynników transkrypcyjnych oraz białek związanych z embriogenezą somatyczną. Ta część pracy została wzbogacona o dwie ryciny. Jedna z nich została wykonana przy użyciu platformy BioRender, co zostało odpowiednio zaznaczone. Następnie przedstawiła uzasadnienie podjęcia tematu badawczego oraz hipotezy i cele badawcze. Dalej krótko omówiła wykorzystany materiał roślinny oraz zastosowane metody badawcze. Zasadniczą część dysertacji stanowią 3 oryginalne publikacje, z których każda jest poprzedzona 3- lub 4-stronicowym komentarzem. Dysertację kończy podsumowanie, siedem wniosków, informacja o dorobku naukowym oraz lista cytowanej literatury obejmująca 100 pozycji. Ostatnim punktem rozprawy są oświadczenia współautorów artykułów stanowiących dysertację.

Należy dodać, że 114-stronicową rozprawę doktorską uzupełnia bogata dokumentacja fotograficzna, dołączona do trzeciej publikacji jako „Supplementary material”. Stanowi ją 18 plansz złożonych z 6-8 zdjęć każda, na których przedstawiono zbiorczo wyniki analizy mikroskopowej wykonanej z użyciem badanych epitopów i barwień na obecność lipidów. Należy podkreślić, że uzyskana dokumentacja mikroskopowa jest bardzo dobrej jakości. Rycina 19 załączonego materiału uzupełniającego podsumowuje wyniki analizy proteomicznej. Takie podejście sprawiło, że mimo obszerności zgromadzonych wyników, publikacja trzecia przekazuje wiedzę w sposób głęboko przemyślany, klarowny i uporządkowany.

Badania w ocenianej rozprawie doktorskiej zostały wykonane w ramach projektu OPUS 19 finansowanego przez NCN, kierowanego przez dra hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa doktorska mgr M. Zaranek nie budzi żadnych zastrzeżeń.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wybór tematyki badawczej, cel i znaczenie

Kultura protoplastów, opisana po raz pierwszy prawie 7 dekad temu, oferuje obecnie nowe możliwości prowadzenia selekcji *in vitro*, modyfikacji genetycznych i badań podstawowych. Protoplasty można łączyć, transformować i edytować, co czyni je idealnymi modelami do badania cyklu komórkowego, biogenezy ściany komórkowej czy totipotencji komórek roślinnych. Współczesne narzędzia, w tym udoskonalone metody izolacji protoplastów i integracja technologii CRISPR/Cas9, zwiększają precyzję i szybkość manipulacji genami, podnoszą skuteczność wprowadzania określonych cech do upraw. Mogą zatem z powodzeniem służyć poszerzaniu zmienności genetycznej roślin i tworzeniu materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian. Badania przedstawione w niniejszej pracy koncentrują się na dwóch

najczęściej uprawianych gatunkach gryki, tj. rośliny o dużym potencjale dla przemysłu spożywczego, paszowego i farmaceutycznego. Cechują się one jednak niestabilnym plonem i dużą podatnością na stresy biotyczne i abiotyczne. Naprzeciw tym problemom wychodzą niekonwencjonalne metody hodowli, u podstaw których leży efektywna kultura protoplastów. Prezentowana w rozprawie tematyka badawcza doskonale wpisuje się w ten aktualny i ważny nurt biotechnologii roślinnej. Doktorantka podjęła się opracowania protokołu regeneracji *Fagopyrum tataricum* i *F. esculentum* w kulturze protoplastów jako podstawy badań nad poznaniem mechanizmów rozwoju i różnicowania komórek na etapie formowania się tkanki kalusowej. Z punktu widzenia badań podstawowych jest to pierwszy kluczowy krok, którego realizacja otwiera drogę dalszym badaniom nad wdrożeniem u gryki zaawansowanych programów hodowlanych.

Pracę wykonano pod kierunkiem dwóch promotorów – uznanych specjalistów w dziedzinie cytogenetyki molekularnej roślin, skupionych na badaniach nad organizacją i ewolucją genomów roślinnych z jednej strony, z drugiej zaś na rozwijaniu metod regeneracji roślin z protoplastów i stosowaniu technik molekularnych w hodowli roślinnej.

Autorka sformułowała 6 hipotez badawczych, które logicznie korespondują z kolejnymi etapami prowadzonych badań. Jednakże **drugą hipotezę zakładającą, że „rodzaj zastosowanego podłoża do immobilizacji protoplastów wpływa na ich zdolności rozwojowe” można uznać za zweryfikowaną wcześniej przez innych badaczy.** Odpowiedź z góry jest twierdząca.

Cele rozprawy zostały sformułowane w 4 odrębnych punktach. Biorąc pod uwagę tytuł dysertacji wydaje się, że pierwszym celem powinno być przełamanie latencji podziałowej. Dopiero osiągnięcie tego celu otwiera drogę do stawiania i realizowania kolejnych. **W pracy brakuje celu nadrzędnego. Proszę o jego zdefiniowanie.**

Zastosowane metody badawcze i najważniejsze osiągnięcia

Protoplasty izolowano z morfogenego i niemorfogenego kalusa (linii w różnym wieku: 1-letnich, 2-, 4-, 7- i 10-letnich) oraz z hipokotyli 10-dniowych siewek. W sumie przebadano 6 różnych strukturalnie i morfogenetycznie typów materiału roślinnego *F. tataricum* i 3 *F. esculentum*. Założenia doświadczalne związane z doбором materiału roślinnego należy ocenić wysoko. Dzięki jego zróżnicowaniu możliwe było pokazanie zależności pomiędzy typem tkanki a potencjałem regeneracyjnym otrzymanych z niej protoplastów. Zastosowane w pracy techniki i metody badawcze stanowią kompleksowy zestaw narzędzi, które umożliwiły właściwą realizację postawionych celów. Na warsztat eksperymentalny Doktorantka wybrała praco- i czasochłonną kulturę protoplastów. Prowadziła również kultury inicjalnego i otrzymanego *in vitro* materiału roślinnego. Zastosowała szeroki wachlarz technik mikroskopowych i barwień do analiz cyto-histologicznych oraz specyficznych przeciwciał do badań immunocytochemicznych. Wykorzystała technikę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) do analizy białek oraz technikę RT-qPCR do analizy czynników transkrypcyjnych oraz genów kodujących wybrane białka. Opis metodyki zawarty w publikacjach jest prawidłowy i wyczerpujący, wsparty odpowiednią literaturą.

W związku z wykorzystaniem do izolacji protoplastów materiału wyjściowego utrzymywanego w kulturze przez wiele lat, nasuwa się pytanie czy potencjał

regeneracyjny prezentowany przez linie kalusa morfogenne jest stabilny w czasie? Genom których linii gryki, morfogennych czy niemorfogennych, wykazuje większą stabilność w kulturze *in vitro* i dlaczego?

Celem badań opublikowanych w dwóch pierwszych artykułach było opracowanie wydajnego i szybkiego systemu regeneracji roślin *F. tataricum* i *F. esculentum* w kulturach protoplastów (cel nr 1; str. 26). Dla osiągnięcia celu testowano różne czynniki stymulujące efektywność izolacji i kultury: 1) rodzaj materiału donorowego, 2) obecność driselazy w mieszaninie do maceracji, 3) wpływ immobilizacji protoplastów w kroplach agarozowych i alginianowych, 4) wzbogacenie pożywki w wybrane auksyny i cytokiny oraz 5) zastosowanie fitosulfokiny (PSK), putrescyny, CPPU, PVP, AIP. Efekt badanych parametrów został wyrażony wydajnością izolacji protoplastów (z 1g św.m. tkanki), żywotnością protoplastów i wydajnością kultury (wyrażoną liczbą utworzonych agregatów komórkowych). Doktorantka wykazała, że protoplasty pochodzące z kalusa morfogenne *F. tataricum* są zdolne do odtworzenia ściany komórkowej, wielokrotnych podziałów i formowania minikalusa w ciągu 50 dni kultury, a następnie regeneracji roślin drogą embriogenezy somatycznej oraz organogenezy. W przypadku *F. esculentum* proces formowania minikalusa zachodził szybciej, bo w ciągu 30 dni, a regeneracja roślin następowała poprzez somatyczną embriogenezę. **W rozprawie doktorskiej brakuje ilościowych danych nt. wydajności regeneracji roślin. Dowodów na regenerację obu gatunków dostarczają jedynie poglądowe fotografie. Proszę Doktorantkę, by podczas publicznej obrony wykazała, że cel pierwszy został w pełni osiągnięty tzn., że opracowany w kulturze protoplastów system regeneracji roślin jest nie tylko szybki, ale również wydajny.** Obecnie wiadomo jedynie (str. 59), że z tkanki pochodzącej z protoplastów izolowanych z hipokotyli *F. esculentum* uzyskano w sumie (we wszystkich eksperymentach) 9 roślin, zaś z linii NL2 nastąpił „obfity rozwój zarodków somatycznych”. W przypadku *F. tataricum* nie znajduję żadnych informacji na ten temat.

Z opisu prac nad pozyskaniem roślin gryki drogą somatycznej embriogenezy wynikają pewne nieścisłości, które stawiają pod znakiem zapytania tę drogę regeneracji w opisywanym systemie. Ze str. 55 dysertacji (część: Plant regeneration) wynika, że „zarodki somatyczne pochodzące z linii NL2 przenoszono do podłoża regeneracyjnego (RM_MS3) i pasażowano co 2 tygodnie aż do momentu uzyskania pędów”. Na stronie 59 dysertacji stwierdzono, że „dla rozwinięcia silnego systemu korzeniowego, rośliny trzymano w podłożu ukorzeniającym przez 4-5 tygodni”. **Czy dobrze rozumiem, że zarodki somatyczne wymagały ukorzeniania? Proszę o komentarz.**

Celem badań przedstawionych w trzeciej publikacji było opisanie procesów i zmian zachodzących podczas rozwoju kolonii komórkowych w kulturach protoplastów gryki na poziomie proteomu, komponentów ściany komórkowej oraz ekspresji wybranych genów i czynników transkrypcyjnych. Badania skoncentrowano na kluczowych etapach rozwoju kultury obejmujących: pierwszy podział (5. dzień), formowanie kolonii komórkowych (15. dzień) i rozwój minikalusa (30. lub 50. dzień zależnie od gatunku). Badania histologiczne wykazały różnice w składzie komórkowym kolonii i minikalusów, w tym obecność komórek merystematycznych, parenchymatycznych i komórek gromadzących związki fenolowe.

Analiza komponentów ściany komórkowej z użyciem przeciwciał wykazała stabilne rozmieszczenie ksyloglukanów i pektyn oraz zróżnicowaną (zależną od czasu hodowli i gatunku) lokalizację arabinanów, galaktanów i białek arabinogalaktanowych. Zmianom tym towarzyszyły wzrost akumulacji białek zapasowych nasion (vicilin, oleozyn, SBP) oraz białek związanych z somatyczną embriogenezą (z grupy endochitynaz i LEA). Stwierdzono także, że wraz z rozwojem minikalusów zwiększa się ekspresja *LEC1*, a obniża *BBM*. Dodatkowym atutem tej publikacji jest bogata dokumentacja fotograficzna doskonale obrazująca przestrzenno-czasowe rozmieszczenie hemicelulozy, pektyn, białek arabinogalaktanowych, ekstensyn i lipidów.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

1. wykazanie pozytywnego wpływu fitosulfokiny α na przerwanie latencji podziałowej protoplastów kalusa i hipokotyli *Fagopyrum esculentum* i *F. tataricum*;
2. opracowanie protokołu kultury protoplastów dwóch gatunków gryki zakończonego regeneracją roślin, w tym po raz pierwszy dla gryki tatarskiej;
3. opisanie zmian w składzie ściany komórkowej i białek oraz profilu ekspresji genów i czynników transkrypcyjnych podczas nabywania embriogenicznej kompetencji przez komórki somatyczne gryki, a tym samym pogłębienie wiedzy o mechanizmie inicjowania procesu somatycznej embriogenezy.

Należy podkreślić aktywność mgr inż. Magdaleny Zaranek w zakresie prezentowania wyników uzyskanych badań podczas konferencji i spotkań naukowych, gdzie wygłosiła 3 referaty i przedstawiła 1 poster. Dwie konferencje miały charakter międzynarodowy, dwie kolejne - ogólnopolski. Ponadto (poza dorobkiem stanowiącym dysertację), Doktorantka jest współautorką jednej oryginalnej publikacji naukowej, która ukazała się w renomowanym czasopiśmie z bazy JCR oraz pracy przeglądowej opublikowanej jako rozdział w książce Springer. W trakcie realizacji pracy doktorskiej mgr M. Zaranek odbyła trzymiesięczny staż zagraniczny w ramach programu Erasmus+ na Uniwersytecie w Tuluzie (Francja), gdzie wzbogaciła swoją wiedzę i praktyczne umiejętności z zakresu biologii molekularnej, przygotowania wektorów ekspresyjnych oraz ekstrakcji i separacji białek roślinnych.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji pracą proszę Doktorantkę o rozwinięcie następującego zagadnienia:

Czym można tłumaczyć korzystny wpływ fitosulfokiny na żywotność protoplastów? Co z literatury wiadomo na temat jej roli w procesie odbudowy ściany komórkowej przez protoplasty? Czy znany jest mechanizm działania fitosulfokiny?

4. Ocena końcowa rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Zaranek zawiera wyniki wartościowych, oryginalnych badań, które dostarczają powtarzalny protokół kultury protoplastów dwóch, ważnych gospodarczo gatunków gryki. Ponadto otrzymane wyniki w istotny sposób poszerzają wiedzę na temat mechanizmów rozwoju i różnicowania się komórek tkanki kalusowej. Szczególnie ważnym osiągnięciem na tym polu jest pogłębienie

wiedzy w zakresie nabywania przez komórki roślinne kompetencji do embriogenezy. Uzyskane w efekcie przedstawionych badań wyniki mogą być podstawą dalszych prac nad praktycznym wykorzystaniem opracowanego protokołu do wdrażania zaawansowanych programów hodowlanych u gryki.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pt. „Badania nad przełamaniem latencji podziałowej, rozwojem kolonii komórkowych oraz regeneracją roślin w kulturach protoplastów *Fagopyrum esculentum* Moench. oraz *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 r. poz. 1571) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Zaranek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Anna Mikuła