



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr hab. Aneta Słomka, prof. UJ
Instytut Botaniki
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel. 12 664 50 20
email: aneta.slomka@uj.edu.pl

Kraków, 10.08.2025 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Reneé 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"**

wykonanej pod kierunkiem

**dr. hab. Alexandra Betekhtina, prof. UŚ (promotor pracy doktorskiej)
oraz dr Anny Milewskiej-Hendel (promotor pomocniczy pracy
doktorskiej)**

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Ocena merytoryczna

Zastosowane metody badawcze jako przejaw nowatorskości i innowacyjności pracy doktorskiej

Obiektami badań były dwa gatunki, *Fagopyrum esculentum* (gryka zwyczajna) oraz *F. tataricum* (gryka tatarka). Doktorantka zastosowała bardzo szeroki wachlarz zaawansowanych metod. W celu optymalizacji hodowli protoplastów użyła różnych kombinacji enzymów trawiennych oraz zoptymalizowała składy pożywek, w tym stężenia cytokinin i dodatki, takie jak PSK (peptydowy roślinny hormon), inhibitory syntezy fenoli (AOA, AOPP, OBHA, AIP) i adsorbenty (PVP). Przeprowadziła elektrofuzję protoplastów w celu uzyskania komórek mieszańca somatycznego, które następnie selekcjonowano przy użyciu mikromanipulatora. Analizę rekonstrukcji ściany komórkowej heterokarionta i protoplastów rodzicielskich przeprowadzono za pomocą immunobarwień wykorzystując zestaw siedmiu przeciwciał skierowanych przeciwko różnym epitopom (białka arabinogalaktanowe, ekstensyna, ksyloglukan, pektyny) oraz stosując barwienie celulozy. Dodatkowo, wykorzystano cytometrię przepływową do określenia stopnia ploidalności roślin, a także metody kalorymetryczne oraz chromatografii cieczowej (HPLC) do identyfikacji związków fenolowych. Wykonano także niecelowaną analizę metabolomiczną za pomocą spektrometrii mas z jonizacją elektrosprejem o wysokiej rozdzielczości i analizę ekspresji genów związanych z embriogenezą somatyczną przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy. Nadrzędnym celem wszystkich przeprowadzonych badań było opracowanie i optymalizacja protokołów hodowli *in vitro* dla gryki, co ma posłużyć jako podstawa do m.in. modyfikacji genetycznych i pozyskiwania nowych odmian.

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl

Nowe, znaczące dla nauki wyniki uzyskane w pracy doktorskiej

Badania nad gryką tatarką skupiły się na optymalizacji hodowli protoplastów i kalusa, a także na szczegółowej analizie wpływu inhibitorów fenoli. Najważniejsze w mojej ocenie uzyskane wyniki to wykazanie, że w kalusie,



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

który ulegał brązowieniu i którego zdolności regeneracyjne malały z wiekiem (choć nie do końca wynika to z publikacji I) inhibitory PAL (enzym szlaku fenylopropanoidowego), takie jak AIP i adsorbenty fenoli, takie jak PVP, wykazały bezpośredni wpływ na regenerację kalusa. AIP okazał się szczególnie skuteczny, redukując poziom związków fenolowych, co zapobiegało brązowieniu kalusa i poprawiało jego żywotność. Traktowanie AIP prowadziło do obniżenia stresu oksydacyjnego oraz do wzrostu poziomu ekspresji kluczowych genów (LEC2, BBM, WUS), które są związane z embriogenezą somatyczną. Zoptymalizowane warunki pozwoliły na uzyskanie diploidów, podczas gdy niektóre inne dodatki prowadziły do powstawania tetraploidów.

Z kolei badania nad gryką zwyczajną koncentrowały się na opracowaniu wydajnego i szybkiego protokołu regeneracji z protoplastów, co dotąd było dużym wyzwaniem, ze względu na długi czas potrzebny do uzyskania roślin. Szczególnie ważne dla nauk podstawowych wyniki to: wyższość kalusa embriogennego z niedojrzałych zarodków nad kalusem z hipokotyli. Fakt zastosowania TDZ do podłoża regeneracyjnego znacząco przyspieszył proces regeneracji, skracając czas uzyskania roślin z mikrokalusa do zaledwie trzech miesięcy, w porównaniu do 9-18 miesięcy w poprzednich badaniach. Istotny okazał się dodatek PSK do podłoża hodowlanego jako kluczowy dla zainicjowania podziałów komórkowych w protoplastach, podczas gdy adsorbenty fenoli (takie jak PVP) nie miały znaczącego wpływu na ten etap rozwoju. Opracowanie tego protokołu, w połączeniu z protokołem dla gryki tatarskiej, posłużyło jako podstawa do pomyślnego przeprowadzenia elektrofuzji protoplastów obu gatunków, co umożliwiło uzyskanie heterokariontów.

Uzyskane wyniki i zastosowane metody świadczą o bardzo wysokim poziomie merytorycznym przedstawionej do oceny pracy.

Uwagi merytoryczne do pracy doktorskiej

Z tytułu funkcji recenzenta podejmuję się dyskusji z Doktorantką. O ile w publikacji I gęstość protoplastów oraz wydajność ich podziałów są bardzo dobrze udokumentowane, to procesy regeneracji dużo gorzej. Owszem opisane i zobrazowane są kolejne kroki prowadzące do uzyskania roślin, ale bez żadnych danych liczbowych. Głównym i jedynym udziałem Doktorantki w publikacji I była optymalizacja medium regeneracyjnego dla gryki tatarskiej. Te wyniki nie są jednak opisane w pracy. Wiadomo tylko, że jest to medium z użyciem cytokinin. Zwykle medium regeneracyjne zawiera również auksyny. Skąd było wiadomo, że nie należy używać auksyn u obu gatunków. Również auksyny nie zostały użyte do ukorzeniania. Proszę o wyjaśnienie - dlaczego. Zwykle również regeneracja na drodze organogenezy wymaga innych pożywek niż w przypadku uzyskiwania roślin na drodze somatycznej embriogenezy. Czy oba gatunki gryki są zatem optymalnym systemem do badań *in vitro*, skoro w kalusie są komórki ukierunkowane na różne procesy rozwojowe?

Zastanawia mnie również fakt skąd Doktorantka wie, że przedstawiane na zdjęciu 2 (s.17), Ryc. 7 (publikacja I) oraz Ryc. 4 (publikacja II) komórki, są komórkami zawierającymi związki fenolowe. Z artykułów nie wynika by były robione barwienia na związki fenolowe. Czy dobrze rozumiem, że jest to wnioskowanie na podstawie obserwacji morfologicznych kalusa tj. widoczne brązowienie komórek oraz oparte o informacje podawane przez innych autorów? Uważam, że jeśli wskazywana jest dokładna lokalizacja i identyfikacja tych komórek, to obecność związków fenolowych powinna zostać wykazana inną metodą barwienia niż tylko błękit toluidyny. Zwłaszcza, że w ramach dalszych badań dodawane są różne substancje tj. adsorbenty fenoli czy inhibitory obniżające poziom związków fenolowych, a także badana jest zawartość tych związków metodą chromatografii cieczowej.

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

Nieco dyskusyjny jest dla mnie tytuł artykułu I: "Promotive effect of phytosulfokine". W mojej ocenie wpływ PSK na kalus jest nieistotny statystycznie jak wynika z Ryc. 5, chociaż widać pewną tendencję wzrostową. Z kolei dla hipokotyli nie ma przedstawionego wariantu samej pożywki, tylko z dodatkiem PSK, są za to przedstawione wyniki dla pożywki PSK z dodatkami, co nie pozwala ocenić jak działa samo PSK (Ryc. 6, publikacja II). Uważam, że ewidentny wpływ PSK na zdolności do proliferacji komórek występuje u gryki zwyczajnej, nie tatarskiej, co wynika z Ryc. 3 (publikacja II). Proszę Doktorantkę o komentarz w tej sprawie.

W odniesieniu do publikacji III – czy kontynuowano rozwój heterokariontów? Czy uzyskano rośliny na drodze somatycznej hybrydyzacji? W tym miejscu trzeba zaznaczyć, że wizualizacje 3D opracowane przez Doktorantkę są zachwycające i obejmują aż 42 przestrzenne rekonstrukcje rozmieszczenia poszczególnych epitopów.

W przypadku publikacji IV, w ocenie recenzentki wniosek (zamieszczony w streszczeniu i dyskusji), że AIP poprawia zdolności regeneracyjne u gryki tatarskiej jest na wyrost. Na podstawie przedstawionych wyników na stronie 7. publikacji, nie można stwierdzić, że zastosowane związki wpływają na wydajność podziałów protoplastów. Wprowadzie tzw. "plating efficiency" w przypadku traktowania 10 μ M AIP jest o 6% wyższe od kontroli, ale jest to nieistotne statystycznie. Również, mimo że podana jest masa kalusów uzyskanych z rozwijających się protoplastów, to jest ona mniejsza od kontroli (Ryc. 2). Ponadto nie ma żadnych danych liczbowych dotyczących liczby uzyskanych wierzchołków przybyszowych/eksplantat.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Ocena formalna pracy doktorskiej

W odniesieniu do wymogów art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571) przedstawiona do oceny rozprawa doktorska powinna być: 1) zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, 2) oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego oraz 3) prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pani mgr Pérez Pérez jako pracę doktorską przedstawiła cykl czterech spójnych tematycznie artykułów, w których opracowała i szczegółowo opisała modele hodowli dwóch gatunków gryki oparte o kultury protoplastów, które to modele potencjalnie mogą być wykorzystywane w różnych programach hodowlanych mających na celu ulepszanie tych ważnych ekonomicznie roślin. O ile punkty 1) i 2) są spełnione z nawiązką, o tyle moją wątpliwość budzi udział Doktorantki w tych bardzo szeroko zakrojonych badaniach. Bardzo dobrze, że w publikacjach II-IV (w przeciwieństwie do publikacji I) Pani mgr Pérez Pérez odpowiadała już za wszystkie etapy prowadzenia kultur *in vitro* *F. esculentum* i *F. tataricum*, choć zastanawia fakt, dlaczego w publikacji II, linię L1 prowadziła równorzędna pierwsza autorka. Dlaczego również w niektórych publikacjach (np. III) Doktorantka nie uczestniczyła w opracowywaniu i pisaniu wyników oraz dyskusji, a jedynie opisaniu (łącznie ze schematami) materiałów i metod. Z punktu widzenia młodego adepta nauki ważne jest by nie tylko znać metody, ale także aby umieć kompilować wyniki i je interpretować. Oczekiwałabym większego udziału Doktorantki w pisaniu i interpretacji wyników (wersja robocza) w artykułach składających się na rozprawę doktorską, a nie jedynie współudziału w pisaniu artykułów, jak napisano w oświadczeniu do publikacji IV. Problem współautorstwa w publikacjach, zwłaszcza tych przedkładanych do oceny w procedurach awansowych, jest skomplikowany. To przecież właśnie dzięki działaniom zespołowym, współautorstwu odbywa się znaczący postęp w naukach biologicznych. W tym miejscu chcę zaznaczyć, że gdyby oddzielić wyniki uzyskane i opracowane przez Doktorantkę od tych uzyskanych i

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

opracowanych przez pozostałych współautorów, całość i tak stanowiłaby rozprawę doktorską na bardzo dobrym poziomie. Gdyby wziąć pod uwagę wszystko, praca jest wybitna, na poziomie rozprawy habilitacyjnej. Szkoda tylko, że Doktorantka spośród załączonych publikacji nie wyekstrahowała, albo przynajmniej nie podkreśliła wyników uzyskanych i opracowanych przez siebie. Nie mniej jednak niniejsze uwagi nie umniejszają wartości pracy doktorskiej Pani mgr Pérez Pérez, a są raczej dywagacją na temat potrzeby lepszego podkreślania własnych osiągnięć w przypadku dorobku podlegającego ocenie przy uzyskiwaniu stopni i tytułów naukowych.

Odnosząc się dalej do punktu 3) - napisany przez Doktorantkę wstęp jest doskonałym wprowadzeniem do omawianej problematyki i świadczy o bardzo dobrej znajomości problemu i umiejętności stawiania hipotez badawczych. Przedstawione w opracowaniu czterech publikacji wyniki są napisane nieco lakoniczne i zmuszają czytelnika do szczegółowego zapoznania się z publikacjami, poprzez chociażby to, że odnoszą go do tabel, rycin przedstawionych w publikacjach. Nieco zabrakło mi chociaż krótkiego rozdziału podsumowującego całość wyników uzyskanych w publikacjach I-IV, syntetycznie spinającego wszystko. W moim przekonaniu dwustronnicowe konkluzje (rozdzielone na poszczególne publikacje) pozostawiają niedosyt. Warte rozważenia byłoby również zamieszczenie publikacji i ich opisów nie w porządku chronologicznym (daty opublikowania), tylko tematycznym, na przykład połączenie i wspólne opisanie wyników publikacji I i IV.

Podsumowując pod względem formalnym praca spełnia wszystkie wymogi stawiane w przywołanej ustawie.

Ocena ogólna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym niezwykle wysoko oceniam cykl prac składający się na rozprawę doktorską Pani mgr Pérez Pérez. Tematycznie wpisują się one w najbardziej aktualne trendy badawcze, wykorzystują bardzo zaawansowane techniki, prowadzą do ważnych odkryć jak choćby uzyskanie heterokariontów *F. tataricum* + *F. esculentum*, czy opisanie zoptymalizowanych protokołów regeneracji obu gatunków. Szeroki wachlarz metod badawczych, sposobów analizy wyników, który poznała Doktorantka zapewnia Jej bardzo dobre podstawy do dalszego samodzielnego prowadzenia badań naukowych na światowym poziomie w przyszłości. Mimo uwag w kwestiach formalnych, które odnoszą się raczej do formy prezentacji wyników uważam, że przedstawiona do oceny praca nie tylko spełnia wymogi art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571), ale także zasługuje na wyróżnienie. Zatem w obu sprawach tj. o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr René Pérez Pérez, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Z poważaniem

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl

Wydział Biologii

Instytut Botaniki