

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Imię i nazwisko kandydata: mgr Iwona Chłosta

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analizy biochemiczne, ultrastrukturalne i molekularne kultury tkankowej kalusa wyprowadzonego z bielma kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A.Chev. (A. Chev.)”

Promotor: dr hab. Marzena Popielarska - Konieczna, prof. UJ

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany):.....

Recenzent: dr hab. Ewa Dubas, prof. IFR PAN

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Podjęta w dysertacji problematyka badawcza, dotycząca naukowych i praktycznych aspektów alternatywnych ścieżek rozwoju u rodzaju *Actinidia*, jest atrakcyjna i aktualna. Obiektem badań był najbardziej znany gatunek kiwi - *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A.Chev. (A. Chev.), którego smaczne owoce osobników żeńskich posiadają w swoim składzie wiele substancji odżywczych i bioaktywnych o charakterze prozdrowotnym. Co ciekawe, w warunkach eksperymentalnych kultury *in vitro*, wyizolowane z nasion kiwi bielmo (endosperma) posiada potencjał do regeneracji poliploidalnych roślin. Uzyskanie nowych genotypów o zwielokrotnionej liczbie chromosomów jest niezwykle cenne dla gospodarki. Ponieważ nowy materiał biologiczny cechuje często bujny wzrost i większa odporność na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, to otrzymane linie mogą być szeroko wykorzystywane w nowoczesnych programach hodowlanych.

Istnieje zatem ogromna potrzeba opracowywania uniwersalnej metody *in vitro* pozwalającej na efektywne uzyskanie z bielma *A. chinensis* var. *deliciosa* pożądanej liczby jednorodnych genetycznie osobników żeńskich. Osiągnięcie zamierzonego celu skutkowałoby uzyskaniem wynalazku biotechnologicznego, który można byłoby opatentować.

W przedstawionej do recenzji pracy mgr Iwona Chłosta zastosowała metodologię obejmującą szereg standardowych technik mikroskopowych, które zostały wzbogacone o nowoczesne techniki molekularne oraz narzędzia bioinformatyczne. Doktorantka scharakteryzowała czynniki morfogenetyczne oraz mechanizmy kontrolujące morfogenezę kiwi *in vitro*, wyodrębniając przy tym ulegające zróżnicowanej ekspresji geny markerowe. Doktorantka zaproponowała również użycie wybranych markerów molekularnych, w tym sprzężonego z płcią markera *SmY*, jako narzędzia do wczesnej identyfikacji płci, na poziomie kalusa i regenerantów w fazie juvenilnej. Doktorantka, wykazała ponadto, że metodę alternatywną przy dookreślanu płci na etapie kalusa, stanowić może cytometria przepływowa.

Doktorantka uzyskała wyniki, które wnoszą do nauki nowe informacje, stanowiąc tym samym osiągnięcie naukowe.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Przedstawiona do recenzji praca spełnia obowiązujące standardy pracy doktorskiej. Praca liczy 123 strony i jest autoreferatem obejmującym streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezy badawcze i cele pracy, plany i zadania badawcze, wyniki pracy (cykl trzech jednotematycznych i opublikowanych artykułów naukowych; Publikacje I-III), omówienie uzyskanych wyników i posumowanie badań. Autoreferat zawiera również informacje o źródle finansowania badań, spis cytowanej literatury oraz oświadczenia doktorantki i współautorów o charakterze i zakresie pracy w poszczególnych publikacjach.

W skład rozprawy wchodzi trzy wieloautorskie oryginalne prace opublikowane w roku 2021. Prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. impact factor, IF) wynoszących od 1,123 do 4,964 (łącznie $IF_{2021}=10,745$; 5-letni $IF_{2021}=11,218$; sumaryczna liczba punktów MEiN=240). Doktorantka jest głównym autorem w trzech publikacjach punktowanych na liście MEiN, z kwartyli Q1, Q2 oraz Q4 w dziedzinie Plant Sciences wśród czasopism indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection, w tym w Journal Citatio Reports. We dwóch pracach mgr Iwona Chłosta jest pierwszym, a w jednej drugim autorem, mając wkład w powstanie publikacji równy z tym, jaki wniósł pierwszy autor. Doktorantka wniosła równy, jak promotor wkład w powstanie publikacji I oraz publikacji III, a o 5% większy niż promotor w publikacji II (szacowany udział procentowy doktorantki w powstanie poszczególnych prac wynosił: publikacji I – 25%, publikacji II – 35%, publikacji III – 35%). Doktorantka nie jest autorem korespondencyjnym w żadnej z prac. Kilkuosobowy zespół przy realizacji licznych i ambitnych zadań jest rzeczą naturalną i oczywistą w przypadku nauk przyrodniczych, jednak dobór pierwszego autora był tu arbitralny. Z przedłożonych oświadczeń, do publikacji I-III, można wyodrębnić, rzeczywiste działania zrealizowane przez Doktorantkę, która brała udział w realizacji badań, uzyskiwaniu, analizie i interpretacji wyników oraz pisała roboczą wersję danego artykułu. Współautorzy każdego z opublikowanych artykułów naukowych zaakceptowali wkład Doktorantki w powstanie dzieła, zwyczajowo określony kolejnością autorów oraz stosownymi, ujętymi w przypisach atrybucjami.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Przedłożona do recenzji rozprawa stanowi cykl publikacji dotyczących procesu morfogenezy i czynników warunkujących kompetencję komórek bielma wyizolowanego z nasion kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* A.Chev. (A. Chev.). Temat pracy doktorskiej jest niezwykle interesujący ze względu na unikalny model eksperymentalny pozwalający na uzyskanie szeregu nowych informacji o ultrastrukturze, funkcji i ploidalności bielma w tym m.in. o roli czynników molekularnych w indukcji struktur *protuberances* przypominających primordia *in planta* oraz o zastosowaniu markera chromosomu Y w badaniach identyfikacyjnych płci.

Składające się na rozprawę dokorską trzy oryginalne artykuły naukowe są tematycznie spójne, a tytuł rozprawy nawiązuje szczególnie do metodologii badań. Ze względu na fakt, iż opublikowane prace zostały uprzednio poddane ocenie przez edytora i recenzentów, niniejsza recenzja koncentruje się przede wszystkim na ocenie autoreferatu, będącego autorskim podsumowaniem uzyskanych wyników poddanych dyskusji w świetle dostępnej literatury światowej.

Streszczenie rozprawy zawiera krótkie wprowadzenie w problematykę badawczą, cel pracy i uzyskane wyniki w świetle potencjalnych praktycznych korzyści. Niedosyt budzą pominięte informacje metodologiczne: o warunkach kultury *in vitro*, w tym o czynnikach m.in. takich jak wiek eksplantatu, rodzaj pożywki, stężenie substancji wzrostowych i cukrów, warunki fizyczne w jakich prowadzona jest kultura.

Czternastostronicowy wstęp rozprawy obejmuje syntetyczny przegląd literatury poświęconej definiowaniu i charakterystyce tkanki kalusowej w kulturach *in vitro*, w tym poliploidalnego kalusa pochodzenia bielmowego ze strukturami *protuberances* o szczególnym potencjale do morfogenezy. W dalszej kolejności rozważany jest aspekt konieczności identyfikacji płci na wczesnym etapie w kontekście planowania hodowli gatunków dwupiennych, do których należy obiekt badań - kiwi smakowite *A. chinensis* var. *deliciosa* A.Chev. (A. Chev.). W szczegółowej charakterystyce gatunku podkreślone zostały problemy, z jakimi zmagają się hodowcy, a mianowicie dwupiennność, przedłużona faza juwenilna, czy brak dymorfizmu płciowego u młodocianych osobników. W ostatnim podrozdziale Doktorantka częściowo nakreśla istotę postępu biologicznego z wykorzystaniem kultur *in vitro* bielma, jako strategii przewyższania niniejszych ograniczeń w hodowli tradycyjnej.

Ta część rozprawy, w świetle najnowszej literatury, zawiera pojedyncze błędy merytoryczne (np. mylna definicja totipotencji i przypisanie cech totipotentnych jedynie do procesu somatycznej embriogenezy) oraz w niektórych aspektach jest zbyt ogólnikowa. Przykładowo, ze względu na specyfikę modelu eksperymentalnego, w którym porównywany jest kalus organogeny i nieorganogeny, pożądane byłoby zamieszczenie przeglądu danych dotyczących wieku eksplantatu, potencjalnej roli światła, węglowodanów oraz fitohormonów (zwłaszcza takich, jak kwas abscysynowy (ABA) czy gibereliny (GA)) w indukcji morfogenezy. Co więcej, ze względu na zakres badań, rozdział ten powinien również zawierać informacje na temat roli zastosowanych w pożywkach egzogennych fitohormonów z grupy auksyn i/lub cytokinin w zależności od warunków świetlnych i czasu trwania kultury. Głębszej analizy literatury wymaga też opis struktury bielma kiwi z uwzględnieniem charakterystyki mechanizmów regulacji genetycznej (genów, czynników transkrypcyjnych) i epigenetycznej (np. metylacja, acetylacja).

Ze względu na rosnące wśród konsumentów zainteresowanie właściwościami prozdrowotnymi owoców kiwi, interesujące byłoby również poruszonej kwestii składu chemicznego bielma (woda, węglowodany przyswajalne, błonnik (celuloza), białka, tłuszcze, witaminy, sole mineralne, metabolity, antyoksydanty) warunkującego przydatność owoców/nasion w określonych gałęziach przemysłu. Uzupełnienie takich treści stanowiłoby idealne połączenie z charakterystyką owoców kiwi w podrozdziale 3.6. W kontekście przeprowadzonych w pracy badań, istotnym byłoby także omówienie mechanizmów wytwarzania pełnowartościowych nasion, z poruszeniem kwestii, w jakiej postaci gromadzone są substancje budulcowe i zapasowe oraz jak przestrzennie wygląda depozycja tychże substancji w bielmie (różne typy białek, skrobia).

Główna hipoteza badawcza i cel pracy zostały sformułowane i przedstawione w sposób mało przejrzysty. Główna hipoteza badawcza jest stwierdzeniem *post factum* z przytoczoną cytacją z 2005 roku. Głównym celem pracy jest natomiast kontynuacja badań i uzupełnienie brakującej wiedzy na temat wybranych aspektów organizacji tkanki kalusowej i procesu organogenezy pośredniej *A. chinensis* var. *deliciosa*. Ponieważ, cel dla całej pracy jest zazwyczaj ogólny, to może bardziej trafnym byłoby sformułowanie takiego celu głównego dysertacji, który zakładałby np. opracowanie metody *in vitro* pozwalającej na uzyskanie z bielma *A. chinensis* var. *deliciosa* pożądanej liczby jednorodnych genetycznie roślin lub charakterystyka potencjału bielma do indukcji kalusa i regeneracji jednorodnych genetycznie żeńskich siewek *A. chinensis* var. *deliciosa* w kulturach *in vitro*.

Sformułowanie szczegółowych hipotez badawczych i celów pracy z odniesieniem do konkretnych publikacji (I-III) nie budzi większych zastrzeżeń. Zwracam jednak uwagę, że podobnie jak w tytule pracy, tak i w celach mylnie używane są metody, techniki i narzędzia badawcze zamiast problemów badawczych. Przykładowo, struktury *protuberances*, przypominając primordia *in planta*, są raczej wskaźnikiem potencjału do organogenezy, a analizy histologiczne, histochemiczne i ultrastrukturalne cech *protuberances* to techniki i metody.

Kolejny rozdział rozprawy zawiera plany i zadania badawcze. Graficzna wizualizacja planu badań ułatwia jedynie częściowe zrozumienie, a mianowicie na jakich etapach eksperymentu realizowano

dany cel szczegółowy. Załączenie tylko ogólnej ryciny bez szczegółowego opisu materiału roślinnego oraz zastosowanych metod badawczych, nie ułatwia interpretacji wyników zaprezentowanych w kolejnym rozdziale pracy doktorskiej. W moim mniemaniu, na rycinie brakuje informacji o stopniu dojrzałości histologicznej kalusa, regenerujących pędów przybyszowych oraz siewek. Co więcej, brakuje także informacji o składzie hormonalnym pożywek i warunkach świetlnych kultury *in vitro*. Podanie szczegółowych informacji o rodzaju warstwy komórek *protuberances*, z których regenerują pędy przybyszowe byłoby także bardzo pomocne w zrozumieniu całego procesu morfogenezy w całościowym ujęciu eksperymentu.

W odniesieniu do tego rozdziału, rodzi się pytanie natury merytorycznej: czy prawidłowe było wykonanie profilu ekspresji genów oraz porównawczej analizy bioinformatycznej dla kalusa nieorganogenego (uzyskanego w ciemności po dwóch latach kultury na pożywce zawierającej 2,4-D (2 mg/l) i kinetynę (5 mg/l)) oraz kalusa organogenego (uzyskanego na świetle po czterech latach kultury na pożywce zawierającej tidiazuron (0,5 mg/l))?

Roli światła w procesie indukcji kalusa organogenego i różnicowania struktur *protuberances* nie można wykluczyć. Światło działa na roślinę bezpośrednio, jako czynnik morfogenetyczny, będący bodźcem inicjującym określone zmiany rozwojowe. Efekt światła i odbierających sygnał świetlny fitohormonów widoczny jest na każdym z poziomów, począwszy od morfologii i anatomii, a skończywszy na poziomach fizjologicznym i molekularnym.

Dyskusja, licząca 17 stron, została poprowadzona w sposób właściwy. Doktorantka wykazała się wiedzą zarówno z zakresu embriologii, umiejętnościami właściwej interpretacji wyników innych autorów dostępnych w piśmiennictwie, jak również właściwym, krytycznym odniesieniem tych danych do uzyskanych przez siebie wyników opublikowanych w załączonych pracach I-III. W tej części pracy można odnaleźć wiele fragmentów, brakujących we wstępie. Słusznym byłoby odniesienie się do kilku wartościowych w tematyce badań prac: Gaillochet i Lohmann (2015; plastyczność rozwojowa obserwowana w roślinnych kulturach *in vitro* świadczy o cechach pluripotencji komórek kalusa na wczesnych etapach morfogenezy), De Giorgi i wsp. (2021, prawidłowy rozwój kutikuli na siewkach uwarunkowany jest prawidłowościami w budowie i funkcji bielma w nasieniu).

Autorka załączyła również plany dalszych badań, które wydają się uzasadnione w świetle uzyskanych dotychczas wyników.

W części podsumowującej badania wraz z wnioskami końcowymi, Autorka dysertacji przedstawiła syntetyczny opis uzyskanych rezultatów. Ta część rozprawy została poprawnie sformułowana, potwierdzając osiągnięcie założonych celów szczegółowych i wiarygodną weryfikację hipotez badawczych.

Końcowa część rozprawy zawiera spis literatury obejmujący 208 pozycji, w większości opublikowanych po roku 2000, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Układ pracy jest logiczny, poprawny pod względem metodologicznym i odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Autorka zachowuje normy przygotowania i redagowania tekstu naukowego. Praca składa się z 11 głównych rozdziałów, w których zawarto odpowiednie wprowadzenie teoretyczne, hipotezy badawcze i cele badań, plany i zadania badawcze, wyniki pracy, dyskusję. Pracę zamyka krótkie podsumowanie wraz z wnioskami, informacja o źródle finansowania wykonanych badań, spis literatury oraz oświadczenia współautorów.

Opatrzona staranną szatą graficzną praca napisana jest poprawną polszczyzną. Zdarzają się jednak w pracy powtórzenia i błędy stylistyczne, które utrudniają poprawne zrozumienie wypowiedzi np. „uzyskanie pomyślniej organogenezy”; „płeć roślin może być ustalona w oparciu o mechanizm, powszechnie występujący u roślin”; „poliploidyacja odgrywa ważną rolę w nowoczesnych programach hodowlanych”; „powstawanie PLBs nie jest związane z procesem embriogenezy somatycznej, a innym szlakiem ekspresji genów”; „ECM w komórkach o wysokiej aktywności metabolicznej tworzyła zwartą sieć wystającą z zewnętrznej ściany komórkowej”.

4. Uwagi krytyczne

Część rozprawy prezentująca plany i zadania badawcze jest zbyt ogólnikowa, przez co zmusza czytelnika do poszukiwania, w załączonych publikacjach I-III, dodatkowych informacji, szczególnie dotyczących opisu części empirycznej: materiałów i metod.

Generalnie brak informacji o dynamice zmian na poziomie fizjologicznym i metabolicznym towarzyszących opisanym zmianom cytologicznym i molekularnym zachodzących w komórkach struktur *protuberances* w trakcie kultury *in vitro*. Wątpliwym jest także stwierdzenie w Publikacji I, że ekspresja genu *RAP-TOR1* jest istotnie ważna do determinacji (ang. crucial) powstawania struktur *protuberances* z zawiązkami pędów przybyszowych (PT-SH). Przedstawione na Fig. 8 g wyniki wraz z analizą statystyczną nie wskazują, aby gen ten pełnił przypisywaną mu funkcję. Brak bowiem dla ekspresji genu *RAP-TOR1* dla kalusa organogennego (OC) i PT-SH różnic statystycznych.

W Publikacji III, z kolei, wątpliwości budzi wielkość próby (ilość powtórzeń) użytej do analiz statystycznych (12 roślin pochodzenia endospermalnego oraz sześć roślin kontrolnych). Z kolei na Fig. 4 pomiary dotyczące zagęszczenia aparatów szparkowych zostały wykonane dla 9 roślin kontrolnych i 10 roślin pochodzenia endospermalnego o ploidalności 9Cx. Ze względu na niską kosztocłonność badań do oszacowania liczby i rozmiarów aparatów szparkowych, dobrze byłoby wykorzystać metodę wykonywania odcisków dolnej strony epidermy liścia. Mikroskopowe obrazy odcisków wiernie odzwierciedlają kształt komórek epidermy oraz aparatów szparkowych.

Nasuwać się także liczne pytania: Czy sprawdzono stabilność genetyczną uzyskanych regenerantów i czy oceniono płodność oraz sprawdzono bariery krzyżowalności? Jak adaptują się do warunków stresowych otrzymane regeneranty? Jak dziedziczne są poszczególne markerowe cechy w kolejnych pokoleniach w kontekście możliwości krzyżowania wstecznego?

Płodność mieszańców hekso- i nonaploidalnych nie jest bez znaczenia, ponieważ możliwe jest krzyżowanie wsteczne, a uzyskane potomstwo charakteryzuje się dużą zmiennością. Uzyskanie nowych, przynajmniej częściowo płodnych cyto- i genotypów stwarza nowe możliwości badania mechanizmów ewolucji i adaptacji do środowiska.

Czy rozważane jest przygotowanie projektu dedykowanego ocenie i ujawnieniu potencjalnych zależności pomiędzy ekspresją wybranych markerów płci i proliferacji oraz antygenów proliferacyjnych w kalusie o różnym stopniu dojrzałości?

Przedstawione w recenzji uwagi krytyczne dotyczą głównie zbyt ogólnego przedstawienia problematyki badawczej oraz braku szczegółów metodycznych poszczególnych eksperymentów, co nie umniejsza wartości merytorycznej recenzowanej pracy.

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Podsumowując stwierdzam, że prace eksperymentalne stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy zostały rzetelnie przeprowadzone według zaplanowanego harmonogramu, a uzyskane wyniki w załączonych do Autoreferatu oryginalnych publikacjach I-III wnoszą nowe, ważne informacje w dyscyplinie stanowiącej przedmiot badań. Co więcej, niektóre z uzyskanych wyników, w tym (1) opracowany sposób wytwarzania bielmowego pochodzenia pędów przybyszowych o potencjale do regeneracji roślin kiwi oraz (2) wczesna selekcja płci żeńskiej z wykorzystaniem markera *SmY* na poziomie kalusa pochodzenia endospermalnego i regenerantów w fazie juvenilnej mają potencjał aplikacyjny i mogą zostać wykorzystane do opracowania bardziej efektywnych metod rozmnażania dla gatunku będącego obiektem badań.

W mojej ocenie przygotowanie rozprawy wymagało opanowania wielu zagadnień z zakresu embriologii roślin, cytogenetyki, biologii molekularnej, statystyki i analizy bioinformatycznej danych, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Iwony Chłosty** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Iwony Chłosty** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

NIE

Uzasadnienie można odnaleźć powyżej w tekście dotyczącym wartości naukowej rozprawy.



.....11.07.2022.....

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta

INFORMACJE DLA RECENZENTA:

1. Informacja o wymogach Rady jednostki dotycząca konstrukcji rozprawy doktorskiej [link do strony: http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty](http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty)
2. Po obronie rozprawy doktorskiej Komisja doktorska przedstawia Radzie jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski ocenę publicznej obrony oraz projekt uchwały w sprawie nadania kandydatowi stopnia doktora.
3. Proszę o przesłanie elektronicznej wersji recenzji na adres: nauki.biologiczne@uj.edu.pl

Równocześnie proszę przesłać podpisany oryginał recenzji na adres:

**Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Dziekanat Wydziału Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków**