



Prof. dr hab. Dorota Kwiatkowska
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 3.06.2023

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR. MOHIBA ABDULLAHA
ZATYTUŁOWANEJ „CULTURE OF THE ISOLATED ENDOSPERM OF KIWIBERRY,
ACTINIDIA ARGUTA: AN EXPERIMENTAL MODEL FOR BASIC RESEARCH AND
PRACTICAL APPLICATIONS”**

Mikropropagacja roślin prowadzona w kulturach *in vitro* ma duże znaczenie użytkowe, szczególnie w hodowli roślin, a zrozumienie procesów rozwojowych zachodzących w trakcie mikropropagacji jest ważne z punktu widzenia histogenezy roślin. Nie dziwi więc, że rozprawa doktorska Pana Mgr. Mohiba Abdullaha poświęcona jest z jednej strony aspektom użytkowemu, w szczególności doborowi składu pożywki w kolejnych etapach regeneracji roślin z bielma nasion *Actinidia arguta* różnych odmian uprawnych, a z drugiej badaniom o charakterze podstawowym, czyli strukturze tkanek *A. arguta* pojawiających się w kolejnych etapach regeneracji pędów.

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana Mgr. Mohiba Abdullaha mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w zakresie dyscypliny nauk biologicznych. Praca została wykonana w Instytucie Botaniki Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Marzeny Popielarskiej-Koniecznej, prof. UJ, oraz Pani Dr Moniki Tulei, w roli ko-promotora.

Rozprawa została napisana w języku angielskim. Składają się na nią cztery części. Pierwsza z nich to *Wstęp (General Introduction)*, czyli wprowadzenie do dwóch kolejnych rozdziałów, w których omówiono *Wyniki badań wraz z materiałem i metodami*. Jeden z nich poświęcony jest w ogólności treści artykułu naukowego opublikowanego w 2021 r. w czasopiśmie naukowym *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Druga część zawiera wyniki ujęte w manuskrypcie będącym w trakcie przygotowania. Mgr Abdullah w obydwu manuskryptach jest pierwszym autorem, pełnił więc istotną rolę w ich przygotowaniu. Kolejny rozdział to *Dyskusja* wyników zawartych w poprzednich rozdziałach (*General Discussion*). Po nim następują: podsumowanie obejmujące najważniejsze wyniki i wnioski (*Major Findings and Conclusion*), *Spis literatury* oraz szczegółowy spis rycin i tabel.

Wstęp rozprawy to dość zdawkowe wprowadzenie do problemów badawczych prezentowanych w dwóch kolejnych rozdziałach. Pierwszy podrozdział *Wstępu* poświęcony jest taksonomii, występowaniu i znaczeniu użytkowemu przedstawicieli rodzaju *Actinidia*. Wskazano w

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
ul. Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec
tel. 32 36 89 400, 32 20 09 351, e-mail: wnp@us.edu.pl



nim także liczby chromosomów różnych gatunków tego rodzaju oraz zróżnicowanie tej cechy wśród odmian uprawnych *A. arguta*. W mojej opinii w podrozdziale tym za duży nacisk położono na aspekty użytkowe a brakuje np. informacji o pozycji taksonomicznej rodzaju *Actinidia*. Kolejny podrozdział poświęcony jest pochodzeniu, składowi, funkcji i znaczeniu bielma. Choć to właśnie bielmo nasion *A. arguta* wykorzystano jako eksplantat w prezentowanych badaniach, podrozdział ten zajmuje raptem niecałą stronę. Dlatego wspomniane zagadnienia omówiono tylko pobieżnie, pomijając np. charakterystykę nasion badanego gatunku, rozwój i strukturę bielma, albo istotny dla prezentowanych w rozprawie wyników problem zmian zachodzących w nasionach w trakcie długoterminowego przechowywania. Podrozdział dotyczący wykorzystania bielma w kulturach *in vitro* jest natomiast dłuższy, jednak w większości poświęcony ogólnemu omówieniu zjawisk rozwojowych zachodzących w kulturach *in vitro*, a nie problemowi wykorzystania bielma jako eksplantatu. Kolejny krótki podrozdział dotyczy znaczenia mikrotechniki botanicznej. Jest on pełen ogólnikowych stwierdzeń o znaczeniu tych metod. Biorąc pod uwagę, że prezentowana rozprawa nie jest pracą metodyczną, podrozdział ten w mojej opinii jest zbędny. W ostatnim podrozdziale przedstawiono cel badań, którym było uzyskanie w pełni rozwiniętych poliploidalnych „regenerantów” pochodzących z bielma *A. arguta* oraz wykorzystanie izolowanego bielma jako modelowego eksplantatu do badań histologicznych organogenezy pędu *de novo*. W podrozdziale tym sformułowano także dwa pytania, na które miały odpowiedzieć prezentowane badania. Pierwsze z nich to raczej hipoteza robocza o istnieniu zróżnicowanej odpowiedzi izolowanego bielma na skład pożywki, wiek nasion oraz wykorzystywaną odmianę uprawną. Drugie to już naprawdę pytanie o to, jakie zmiany strukturalne zachodzą w eksplantatach pochodzących z bielma wykładanego na różne pożywki w kulturach *in vitro*.

Pierwszy z rozdziałów *Wyników*, w którym omówiono oryginalne badania Doktoranta i współpracowników, dotyczy optymalizacji warunków kultur *in vitro* izolowanego bielma wykorzystywanych do uzyskiwania roślin *A. arguta* o różnym stopniu ploidalności. Wyniki przedstawione w tym rozdziale podlegały ocenie recenzentów a prezentująca je praca została opublikowana w *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. W szczególności badano wpływ składu pożywki, wieku nasion, z których izolowano bielmo, oraz odmiany uprawnej *A. arguta* na efektywność uzyskiwania materiału w kolejnych etapach kultur, czyli na indukcję kalusa, formowanie zawiązków pędów przybyszowych, rozwój pędów przybyszowych, ukorzenianie pędów i aklimatyzację do uprawy w glebie. Do analiz wykorzystano trzy odmiany uprawne *A. arguta*, a bielmo pozyskiwano z ich nasion bezpośrednio po zbiorze dojrzałych owoców lub po rocznym okresie przechowywania wysuszonych nasion. Stężenia i rodzaje regulatorów wzrostu dobierano dla trzech rodzajów pożywek, stosowanych kolejno do: (i) indukcji tworzenia kalusa i formowania na nim zawiązków pędów przybyszowych; (ii) indukcji rozwoju w tym wydłużania pędów przybyszowych; (iii) indukcji tworzenia korzeni przybyszowych na uzyskanych pędach. Dla regenerantów określono stopień ploidyżacji wykorzystując metodę cytometrii przepływowej. Na podstawie tych badań wskazano najlepsze kombinacje wieku materiału, z którego pozyskiwano eksplantaty, oraz składu pożywek dla poszczególnych odmian. Przeprowadzono także wstępną

analizę histologiczną i morfologiczną wczesnych stadiów tworzenia pędów przybyszowych z kalusa. Moje uwagi merytoryczne do tej części rozprawy są następujące: (i) W rozdziale brakuje zwięzłego omówienia powstawania z kalusa pędów przybyszowych i początkowych etapów ich rozwoju oraz wprowadzenia przy tej okazji wykorzystywanych terminów (np. *adventitious shoot bud primordium*, *adventitious shoot bud*, *elongating adventitious shoot*). Uporządkowanie terminów pozwoliłoby być może uniknąć takich dziwnych sformułowań, jak „*elongation of adventitious shoot bud primordia*”; (ii) Poważnym niedociągnięciem jest brak analizy statystycznej, która pozwoliłaby zweryfikować istotność różnic pomiędzy wykorzystywanymi pożywkami, odmianami, etc.; (iii) Wyjaśnienia wymaga, w jaki sposób porównywano „ogólny wigor wzrostu” pędów, czy też wzrost korzeni; (iv) Nowe liście na pędach, które zrzuciły liście wcześniej utworzone, nie pojawiają się w węzłach, jak opisano w pracy, ale powstają na pędach bocznych wyrastających w kątach starszych liści. Mam też kilka uwag dotyczących prezentacji wyników: (i) Rycina 2.1 nie przedstawia nasion, jak podpisano w legendzie, ale pędy z owocami; (ii) Na Ryc. 2.2 brakuje skali; (iii) Rycina 2.10d przedstawiająca eksplantat z regenerującymi pędami pod powiększeniem 30x nie pozwala na analizę ultrastrukturalną, jak napisano w pracy; mam też wątpliwości, czy można jednoznacznie na jej podstawie stwierdzić, że na powierzchni kalusa znajdują się „*globular like cells*” (domyślałam się, że chodzi o kuliste komórki) a nie kuliste skupienia komórek; (iv) Dlaczego w Tab. 2.4 prezentującej poziom DNA podano tylko wartości średnie, bez odchylenia standardowego, czy wartości minimalnych i maksymalnych?

Drugi rozdział *Wyników* prezentowanych w ocenianej rozprawie poświęcony jest charakterystyce morfologicznej i histologicznej kolejnych stadiów regeneracji pędów w kulturze *in vitro* opisanych w poprzednim rozdziale: od kalusowania eksplantatów do powstawania pędów przybyszowych z kalusa. Do analiz wybrano jedną z wcześniej opisanych odmian uprawnych *A. arguta*, z której uzyskiwano liczne pędy przybyszowe. Prowadzono kulturę na dwóch rodzajach pożywek, tak by uzyskać kalus morfogeny i niemorfogeny, z którego odpowiednio powstawały, bądź nie powstawały pędy przybyszowe. Z tych dwóch rodzajów kultur pobierano materiał do analiz histochemicznych i w początkowych etapach rozwoju także ultrastrukturalnych. Po utrwaleniu materiału wykonano przekroje anatomiczne, a następnie zastosowano pięć barwników/reakcji (lub ich kombinacje) w celu wykrycia na przekrojach różnych składników. Równolegle prowadzono obserwacje morfologii eksplantatów pod mikroskopem stereoskopowym. Taka metodyka pozwoliła na: identyfikację wczesnych etapów tworzenia pędów przybyszowych; analizę wzoru ścian komórkowych, umożliwiającą wskazanie dzielących się różnymi płaszczyznami komórek; wskazanie miejsc, w których tworzą się pasma tkanki przewodzącej; identyfikację materiałów zapasowych gromadzonych w komórkach w kolejnych stadiach tworzenia pędów przybyszowych. Wyniki te porównano z obserwacjami kalusa niemorfogenego. Moje uwagi merytoryczne do tej części rozprawy są następujące: (i) Na Ryc. 3.2-3 zaznaczono miejsca na powierzchni eksplantatu, które przypominają powierzchnię eksplantatu z pierwszego tygodnia kultury, które nazwano resztkami bielma. Czy nie są to raczej fragmenty warstwy obumarłych komórek pokrywanej izolowane bielmo? Co znajduje się pod tą warstwą? (ii) W jaki sposób

porównywano rozmiary ciał białkowych i innych skupień materiałów zapasowych w poszczególnych etapach kultury? (iii) Mam wątpliwości co do opisu pasm tkanki waskularnej. Na podstawie jednego przekroju podłużnego trudno z pewnością stwierdzić, że system waskularny, szczególnie w zawiązkach pędów tworzonych w tak nietypowych warunkach, jest dobrze rozwinięty. Ponadto na niektórych przekrojach widać raczej pasma prokambium (Ryc. 3.8d). Uwagi dotyczące sposobu prezentacji są następujące: (i) W tekście nie ma odwołania do Ryc. 3.1. Rycina 3.1a ma ponadto chyba nieprawidłową skalę. Czy owoce *A. arguta* osiągają długość 20 cm? (ii) Określenie czasu, w którym pobierano materiał do analiz, jest mylące. Sformułowanie 1-, 2-, 4- a następnie 6-cio tygodniowe interwały oznacza, że materiał zbierano w 1-ym, a następnie po 3-im, 7-ym i 13-tym tygodniu; (iii) Brakuje informacji, czy materiał był odpowietrzany na początku utrwalania w glutaraldehydzie; (iv) Przy niektórych stwierdzeniach dotyczących układu bądź kształtu komórek brakuje odniesienia do mikrofotografii (miejsca zaznaczyłam na wydruku); (v) Na jakiej podstawie na Ryc. 3.6h wyróżniono krystaloidy białkowe i ziarna skrobi wskazane strzałkami o różnych kolorach? (vi) Omawiając preparaty oglądane w mikroskopie fluorescencyjnym nie podano informacji na temat światła wzbudzającego i wykorzystywanych filtrów; (vii) Analiza przekrojów z materiału pobieranego po 6 tygodniach kultury jest pełna powtórzeń i trudna w odbiorze, co wynika po części z tego, że omawiane są po kolei poszczególne sposoby barwienia zamiast poszczególne typy tkanek, czy struktur.

Dyskusja składa się z krótkiego wprowadzenia i czterech podrozdziałów, których tytuły sugerują, że zostaną omówione kolejno: (i) powstawanie *de novo* pędów z bielma izolowanego z nasion *A. arguta*; (ii) znaczenie odmiany uprawnej, „wieku eksplantatu” (problem terminologii wyjaśniam poniżej), ukorzeniania i poziomu ploidalności; (iii) histochemia i ultrastruktura bielma *A. arguta*; (iv) histochemia eksplantatów w kolejnych etapach kultury. Jest to niestety najgorzej napisana część rozprawy. Po pierwsze treść podrozdziału pierwszego w słabym stopniu odpowiada tytułowi. Zawiera on przede wszystkim informacje o regulatorach wzrostu dodawanych do pożywek w różnego typu kulturach, w których wykorzystywano różne eksplantaty, inne niż bielmo, a o kulturze bielma *A. arguta* tylko wspomniano. Podobnie pierwszy długi akapit ostatniego podrozdziału nie ma nic wspólnego z jego tematem (treść dotyczy znowu wykorzystania różnych regulatorów wzrostu w kulturach *in vitro*, zamiast tytułowej analizy histochemicznej). Zawartość drugiego podrozdziału odpowiada wprawdzie tytułowi, ale ze względu na bardzo dziwne zestawienie haseł w tym tytule także poszczególne akapity podrozdziału wydają się nie być ze sobą związane. Najniżej oceniam najdłuższy czwarty podrozdział, którego treść poza wspomnianym powyżej pierwszym akapitem, właściwie sprowadza się do omówienia kolejnych metod barwienia preparatów wykorzystywanych przez różnych badaczy. W *Dyskusji* brakuje natomiast: (i) próby interpretacji obserwowanych zmian strukturalnych, np. tych dotyczących obecności różnej postaci materiałów zapasowych w komórkach; (ii) dyskusji nad rolą warstwy polisacharydowej obserwowanej na powierzchni kalusa i regenerujących pędów; (iii) analizy potencjalnych przyczyn zróżnicowania poziomu ploidalności regenerantów.



Podsumowanie (Główne wyniki i wnioski) zawiera krótkie streszczenie najważniejszych wyników oraz wnioski dotyczące metody kultur bielma *A. arguta* najlepiej nadającej się do mikropropagacji.

Mam ponadto istotne uwagi dotyczące języka rozprawy. W tekście roi się od pomyłek gramatycznych, stylistycznych i niefortunnych sformułowań, które często utrudniają zrozumienie tekstu (np. część „zdań” pozbawionych jest orzeczenia). Przykładowe pomyłki zaznaczyłam na kopii rozprawy. Niektóre sformułowania są szczególnie rażące. Na przykład niefortunne jest używane w rozprawie sformułowanie „*tetraploid endosperm explants*”. Jak rozumiem, chodzi o bielmo nasion powstających na tetraploidalnej roślinie matecznej, ale „*tetraploid endosperm explants*” oznacza, że to bielmo jest tetraploidalne. Podobnie określenie wiek explantatu („*age of explant*”), który w części eksperymentu wynosi rok, jest nieprawidłowe. Chodzi raczej o wiek nasion, z których izolowano bielmo.

Mimo licznych uwag krytycznych doceniam znaczenie merytoryczne ocenianej rozprawy, choć w mojej ocenie rozprawa tylko w stopniu dostatecznym spełnia ustawowe wymogi. Za szczególnie ważne i cenne wyniki prezentowane w rozprawie Pana Mgr. Abdullaha uważam:

- Opracowanie skutecznej metody mikropropagacji *Actinidia arguta* z bielma izolowanego z nasion
- Przedstawienie szczegółowej analizy anatomicznej wczesnych stadiów powstawania pędów przybyszowych z kalusa uzyskanego z bielma nasion *Actinidia arguta*

Uwagi i pytania dotyczące rozprawy przedstawiłam powyżej w trakcie jej omawiania.

Dorobek naukowy Doktoranta

Pan Mgr Mohib Abdullah ma już w swoim dorobku naukowym trzy oryginalne artykuły naukowe. W jednym z nich jest pierwszym autorem. Kolejny artykuł jest w trakcie przygotowania.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, chciałabym zwrócić uwagę na znaczenie użytkowe prezentowanych wyników oraz możliwość wykorzystania szczegółowej analizy histochemicznej przedstawionej w rozprawie do dalszych badań regeneracji i rozwoju roślin w kulturach *in vitro*.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z *art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana Mgr. Mohiba Abdullaha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

