



UNIwersytet Rolniczy  
im. Hugona Kollataja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii  
dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK  
e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

Kraków, 22 października 2021

## RECENZJA

### **pracy doktorskiej spec. Petra Berko pt. Kultura komórek macierzystych włósników korzeniowych ogórka jako alternatywa dla korzeni włósnikowatych**

#### OPIS FORMALNY PRACY

Praca doktorska Pana spec. Petra Berko została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Wojciecha Burzy, prof. nadzw. SGGW w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Przedstawione w niniejszej pracy badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego MNiSW (N N302 655040) oraz programu stypendialnego Erasmus Mundus IAMONET-RU.

Praca obejmuje 144 strony maszynopisu z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych. Otwiera ją *Streszczenie* w j. polskim i angielskim oraz *Wykaz stosowanych skrótów*, szczególnie przydatny w niniejszym opracowaniu ze względu na złożoność zastosowanej terminologii.

W rozdziale *Wstęp i cel pracy* Autor zasygnalizował problem badawczy, jednoznacznie sformułował cel podjętych badań oraz hipotezę badawczą. Dla zweryfikowania postawionej hipotezy podzielono planowane badania na sześć precyzyjnie określonych etapów.

*Przegląd literatury* (26 stron) stanowi syntetyczny opis istniejącego stanu wiedzy nt. (1) budowy korzenia ze szczególnym uwzględnieniem struktury merystemu korzeniowego oraz różnicowania się włósników korzeniowych; (2) specyfiki różnych typów kultur *in vitro* w kontekście syntezy związków biologicznie czynnych, w tym na skalę przemysłową; (3) funkcji i sposobów produkcji ryboflawiny oraz (4) krioprezerwacji materiału biologicznego. Treści przedstawione w tym rozdziale uważam za właściwie dobrane i wyczerpujące w kontekście tematyki pracy doktorskiej.

*Materiały i metody* zostały przedstawione na 17 stronach maszynopisu. Materiały roślinne zostały opisane w sposób systematyczny i kompletny. Natomiast mam zastrzeżenia co do kompletności danych odnośnie pozostałych materiałów i zastosowanych procedur, do czego szczegółowo odniosę się w dalszej części recenzji.

*Wyniki* stanowią zasadniczą część pracy i obejmują 35 stron, w tym 4 tabele, 3 ryciny i 6 bardzo starannie zestawionych i opisanych tablic z dokumentacją fotograficzną. Elementem wyników jest także 6 tabel wyników szczegółowych zestawionych w wyodrębnionym, ostatnim rozdziale pracy. Rezultaty badań są przedstawione z reguły czytelnie, choć w części opisowej, na początku wybranych sekcji tematycznych znajdują się informacje metodyczne, które są bądź powtórzeniem z rozdziału *Materiały i metody*, bądź takimi elementami metodyki, które w poprzedzającym wyniki rozdziale się nie znalazły. O ile w kontekście złożoności poszczególnych eksperymentów pewne (syntetyczne) wprowadzenie metodyczne może mieć swoje uzasadnienie, o tyle niewypunktowane w stosownym rozdziale detale metodyczne już nie.

*Dyskusja* stanowi właściwe uzupełnienie i komentarz do sekcji opisującej wyniki przeprowadzonych eksperymentów, sytuując je w szerszym kontekście prac prowadzonych przez inne zespoły jak i wcześniejszych, unikatowych badań z tego zakresu prowadzonych w zespole Promotora. Jest dobrze skonstruowana, dojrzała i jednocześnie ciekawie napisana, obejmuje 20 stron i jedną rycinę.

*Wnioski* to zbiór ośmiu punktów stanowiących nie tylko syntezę przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych wyników, ale także uwzględniających szerszy kontekst badań przedstawiony w dyskusji.

*Spis literatury* obejmuje 177 pozycji z zakresu badań opisanych w pracy doktorskiej, świadczący o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Autora do prowadzenia badań. Jest on również bardzo wartościowym zestawieniem piśmiennictwa dotyczącego m.in. komórek macierzystych oraz systemów roślinnych kultur *in vitro* i ich wykorzystania do syntezy związków biologicznie czynnych.

Całość zamyka rozdział *Tabele szczegółowych wyników* w którym znajdują się zestawienia dla kultury indukowanych z syntetyzujących ryboflawinę primordiów korzeniowych totipotencjalnych komórek macierzystych, przedstawiające m.in. przyrost świeżej masy, poziom akumulacji ryboflawiny, czy wpływ prędkości mieszania na tempo proliferacji tkanki. W sumie jest to 6 tabel z dużą liczbą danych, które nie zostały przywołane w tekście.

Generalnie, praca napisana jest poprawnie językowo, choć Autor nie ustrzegł się trudnych w odbiorze zdań wielokrotnie złożonych, błędów fleksyjnych oraz nierozróżniania rzeczowników policzalnych od policzalnych (np. na str. 71 w przypisach do tabeli 4 pisze 'ilość kolb' zamiast liczba kolb).

## **MERYTORYCZNA OCENA ROZPRAWY**

Temat pracy doktorskiej Pana Petra Berko dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia jakim jest indukcja komórek macierzystych u roślin. Zagadnienie szeroko eksplorowane w kontekście komórek zwierzęcych, ale mniej znane w odniesieniu do komórek roślinnych. Przedstawione w niniejszej pracy nowatorskie badania zostały starannie zaplanowane i wykonane, a uzyskane wyniki dobrze zinterpretowane. Wnoszą one nie tylko nową wiedzę na temat możliwości indukcji totipotencjalnych komórek macierzystych u roślin ale także mają znaczący potencjał aplikacyjny związany z wykorzystaniem opracowanej platformy biotechnologicznej do przemysłowej produkcji substancji biologicznie aktywnych. Dobór

materiału badań, jak i zastosowanych metod badawczych, jest kompleksowy i ogólnie nie budzi moich zastrzeżeń. Najważniejszymi, moim zdaniem, osiągnięciami wynikającymi z opisanych badań było: (1) udoskonalenie podstaw metodycznych dla indukcji i kultury komórek macierzystych włósników korzeniowych ogórka; (2) wykazanie przydatności kultur TR(PK)-iTkm ogórka do inicjowania TR(K)-iTkm gatunków pokrewnych; (3) opracowanie efektywnej procedury krioprezerwacji dla otrzymanych kultur iTkm ogórka oraz (4) opracowanie podstaw prowadzenia iTkm w warunkach kultury bioreaktorowej. O ile waga naukowa przedstawionych badań, w moim odczuciu jest bez wątpienia znacząca, mam pewne zastrzeżenia do ich przedstawienia, które szczegółowo zostały wypunktowane w dalszej części recenzji.

## **UWAGI, KOMENTARZE I PYTANIA**

### **Rozdział *Przegląd literatury***

1) Rozdział ten jest przygotowany kompleksowo i starannie i praktycznie wyczerpuje temat. Brakuje mi w nim jednak akapitu/podrozdziału w sposób systematyczny zestawiający informacje nt. typów komórek macierzystych u roślin i ich właściwości w odniesieniu do zwierzęcych komórek macierzystych.

### **Rozdział *Materiały i metody***

1) Autor prowadził badania z wykorzystaniem bardzo dużej liczby różnorodnych pożywek, które umiejętnie zestawił w tabeli 3. Jednak z uwagi na brak przypisów do wszystkich kodów zastosowanych w tabeli, tabela nie jest w pełni czytelna np. nie podano co oznaczają cyfry przy kodach literowych, staje się to dopiero jasne po wnikliwym przestudiowaniu zawartości tabeli. Także sugerowałabym bardziej precyzyjny opis zastosowanych pożywek w tekście (sekcja 3.2) tzn. pokazujący różnice jakościowe między poszczególnymi wariantami, co w kontekście prowadzonych eksperymentów jest bardzo istotne. W obecnej postaci opis sprowadza się właściwie tylko do podstawowych informacji ogólnych o pożywkach i odesłaniu czytelnika po szczegóły do tabeli.

2) W sekcji 3.3 Autor pisze o interwałach w jakich były pasażowane kultury natomiast nie ma informacji na czym pasaż polegał. Ponadto podane interwały to 14 dni podczas gdy z lektury wyników dowiadujemy się, że kultury pasażowano także w innych przedziałach czasowych. Informacje wymagają uporządkowania.

3) W sekcji 3.7 pojawiają się terminy: kultura krótko- i długookresowa, dla których nie podano wyjaśnienia. Także nie jest jasne, w którym momencie z korzeni zarodkowych pobierano eksplantaty do inicjacji kultury: tuż po izolacji zarodków z nasion? Z lektury tekstu wynika, że raczej nie, ale precyzyjnego toku postępowania nie przedstawiono. A jak to wyglądało w przypadku gatunków z których nie izolowano zarodków (cebula, lucerna, burak). Przejrzysty schemat ideowy obrazujący zawilosci metodyczne obejmujące przygotowanie eksplantatów korzeniowych oraz inicjację kultur TR(K/PK)-iTkm byłby bardzo pomocny.

4) Sekcja 3.10.2 – proszę doprecyzować na czym polegała wizualna metoda oceny przeżywalności komórek po krioprezerwacji i w jaki sposób zbierano dane liczbowe z tej analizy.

5) Sekcja 3.11 – proszę uściślić jaka była objętość pożywki w bioreaktorze (Autor podaje w tekście dwie różne wartości: 2L i 1L) oraz jaką objętość stanowiło inokulum.

6) Nie podano informacji o teście TTC, do którego Autor odnosi się w wynikach - sekcja 4.2.1

7) Niedopatrzeniem w tej części pracy jest brak podstawowych informacji nt. organizacji układów eksperymentalnych tj. ile powtórzeń biologicznych testowano w poszczególnych eksperymentach czy ile eksplantatów pierwotnych testowano w poszczególnych wariantach pożywkowych. Jedyna informacja o powtórzeniach biologicznych została podana dla doświadczeń obejmujących krioprezerwację kultur iTKM (sekcja 3.10.3). Także Autor nie zamieścił informacji nt. statystycznej analizy danych. Proszę o stosowne wyjaśnienia.

## Rozdział *Wyniki*

1) Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Autor wskazał optymalne warunki inicjacji, stabilizacji i proliferacji kultur iTKM. Myślę, że cennym uzupełnieniem opisu wyników tej części eksperymentów (sekcje 4.1.1., 4.1.2 oraz 4.1.4) byłby schemat uwzględniający najważniejsze parametry/elementy wymienionych etapów na tle standardowej metody opracowanej wcześniej w zespole Promotora.

2) W sekcji 4.1.2 Autor wskazuje na linie charakteryzujące się najwyższym nominalnym tempem przyrostu świeżej masy/zdolnością do syntezy i akumulacji RF. Czy te wnioski znajdują potwierdzenie w analizie statycznej? Pobodnie w sekcji 4.3.1 i 4.3.2 Autor wnioskuje o optymalnych parametrach prędkości wytrząsania kultury w bioreaktorach na podstawie wartości nominalnych, bez przeprowadzenia stosownej analizy statystycznej wyników.

3) Sekcja 4.2 – jak w praktyce prowadzono selekcję homogenicznych agregatów do kapsułkowania? Jakie agregaty klasyfikowano jako małe a jakie średniej wielkości?

4) Rycina 13 – z czego wynikają stosunkowo duże wartości błędu standardowego dla zawartości RF w kulturach poddanych krioprezerwacji? Dlaczego dla przyrostu świeżej masy nie wyznaczono błędu standardowego?

5) Rozdział ten jest ilustrowany bardzo starannie przygotowanymi tablicami z mikro- i makrofotografiami. Brakuje mi jednak fotografii kolbek z kulturami pokazującymi etap inicjacji, stabilizacji i proliferacji iTKM. Na podstawie jakich przesłanek na Tablicy 3/fot I Autor wskazał, że jeden z agregatów dwukomórkowych charakteryzuje występowanie podziałów samoodnawiających a drugi różnicujących – moim zdaniem oba agregaty są albo efektem podziału asymetrycznego (podziały różnicujące) albo jeden z nich (wskazany dłuższą strzałką) pokazuje komórkę niepodzieloną.

## Rozdział *Tabele szczegółowych wyników*

1) Z zasady materiały ilustracyjne (tj. tabele, ryciny, schematy) powinny być czytelne, bez pośliskowania się tekstem z części opisowej dla szczegółowych wyjaśnień – zatem wszelkie

skrótów zastosowane w tabelach tego rozdziału powinny być wyjaśnione w przypisach do każdej tabeli. Ponadto przy prezentowaniu danych liczbowych powinno się stosować pewną konsekwencję w podawaniu liczby miejsc po przecinku.

## PODSUMOWANIE

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską Pana Petra Berko, mimo wskazanych powyżej uwag, oceniam pozytywnie. Jest ona wartościowym opracowaniem, które spełnia wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim. Wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autora w zakresie prowadzonych badań oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, której odzwierciedleniem jest właściwe sformułowanie hipotez naukowych i celów badawczych, prawidłowe zaplanowanie eksperymentów, zastosowanie odpowiednich metod badawczych oraz wielopłaszczyznowa analiza otrzymanych wyników i ich wnikliwa dyskusja. Przedstawione badania cechują się wysokim poziomem naukowym i wnoszą nowe informacje nt. indukowanych totipotencjalnych komórek macierzystych u roślin. Otrzymane wyniki są oryginalne, bez wątpienia nowatorskie, mają dużą wartość poznawczą, a w dalszej perspektywie również potencjalne możliwości aplikacyjne.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* o (Dz.U. z 2003 r. Nr 65 poz.595, wraz z póź. zm.) jak również zapisy *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018r. poz. 1668)* i **wniosuję o dopuszczenie Pana spec. Petra Berko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK

