

Bydgoszcz, dnia 23 października 2021 r.

## Recenzja pracy doktorskiej

*spec. Petra Berko*

„Kultura komórek macierzystych włóśników korzeniowych ogórka  
jako alternatywa dla korzeni włóśnikowatych”

**Uwaga wstępna:** nie dysponuję dokumentami, z których mogłabym wnioskować czy określenie „spec.” przed nazwiskiem Kandydata odpowiada polskiemu stopniowi magistra. Zakładam zatem, że Rada Naukowa Jednostki, działając na podstawie przepisów obowiązujących w 2013 r., uznała za prawnie uzasadnione wszczęcie przewodu doktorskiego spec. Petra Berko i przeprowadzenie jego kolejnych etapów.

### Wprowadzenie

Recenzowana praca dotyczy szerokiego i ciekawego zagadnienia jakim jest inicjacja i utrzymanie ustabilizowanej kultury roślinnych komórek macierzystych *in vitro*, a w kolejnym etapie ich wykorzystanie w procesie syntezy metabolitów wtórnych. Zamierzenie to mieści się w bardzo aktualnym nurcie badań światowych nad poszukiwaniem alternatywnego i efektywnego sposobu pozyskiwania substancji biologicznie czynnych w stosunku do metody z użyciem mikroorganizmów, w tym bakterii *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium acetobutylicum*, grzybów *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii* czy drożdży *Candida famata*.

Modelem badawczym w recenzowanej rozprawie były kultury *in vitro* ogórka (*Cucumis sativus* L.), gatunku będącego obiektem wieloletnich badań w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Celem doświadczeń przedstawionych w przedmiotowej pracy było zainicjowanie kultury *in vitro* komórek macierzystych włóśników korzeniowych (trichoblastów) ogórka poprzez ich odróżnicowanie, a następnie nabycie „kompetencji” do

rozpoczęcia innej drogi rozwojowej niż pierwotnie zaprogramowana. Ocenie poddano również zdolność komórek macierzystych i ich pochodnych do syntezy ryboflawiny i do regeneracji roślin ogórka o prawidłowej morfologii.

### **Dane formalne o rozprawie**

Recenzowana rozprawa zawiera dziesięć rozdziałów: Streszczenie, Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp i cel pracy, Przegląd literatury, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis literatury i Tabele szczegółowych wyników.

Streszczenie w wersji polskiej i angielskojęzycznej zamieszczono na str. 7, pozostałe rozdziały przedstawione są na str. 22 -124. Część opisowa uzupełniona została materiałem ilustracyjnym obejmującym 14 rysunków i 6 tablic z 55 fotografiami z mikroskopu odwróconego, konfokalnego i elektronowego. Wśród zamieszczonych rysunków 8 obrazuje wyniki omawianej rozprawy, a 6 pochodzi z publikacji innych autorów. Pod rysunkami 1-6 brak adnotacji o zgodzie autorów (wydawnictwa) na ich wykorzystanie.

### **Ocena rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera główną tezę, zgodnie z którą, cyt. **„stworzono podstawy metodyczne otrzymywania oraz wykorzystania w nowoczesnej biotechnologii roślin KKMWK (kultury komórek macierzystych włośników korzeniowych) ogórka....”**

Stwierdzenie to wzbudza moje poważne wątpliwości, gdyż w żadnym punkcie pracy nie udokumentowano pochodzenia kultury z trichoblastów, ani też nie przedstawiono dowodów odróżnicowania tych komórek do „stanu macierzystości”.

Z bardzo skomplikowanego tekstu Autora wnioskuję, aczkolwiek nie wiem czy słusznie, że synteza ryboflawiny i jej pochodnych jest cechą charakteryzującą wyłącznie trichoblasty i powstające w wyniku ich odróżnicowania komórki macierzyste ogórka. Nie jest to w żaden sposób poparte wynikami badań własnych, ponadto pozostaje w sprzeczności z badaniami innych autorów wskazujących na syntezę (obecność) ryboflawiny w komórkach epidermy i kory pierwotnej korzenia.

Stan „odróżnicowania” komórek obserwowanych i opisywanych przez Autora nie został w żaden sposób zweryfikowany, np. poprzez ocenę poziomu syntezy rRNA, udokumentowaną modyfikację białek histonowych czy zmianę struktury chromatyny w jądrach komórkowych.

Te istotne braki pracy nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, iż kultury komórkowe opisywane przez p. Petra Berko pochodzą rzeczywiście z trichoblastów. Jest to – w mojej ocenie – bardzo poważny mankament.

Nie zgadzam się ze stwierdzeniem Autora, że „**zagadnienie roślinnych i(P/T) KM praktycznie nie jest szerzej znane w literaturze. Badania nad iTKM prowadzone w KGHBR należy uznać raczej za wyjątek (Burza 2013).**” Odnoszę się szczegółowo do tej kwestii w punkcie „Spis literatury”.

### **Wyniki i ocena dokumentacji fotograficznej**

W pierwszym zdaniu rozdz. 4. WYNIKI Autor stwierdza „**Opracowano szybką i wydajną metodę inicjacji kultury.... przez fazę krótkookresowej KPK na pożywkach z regulatorami wzrostu**”, (str. 68). Ponownie stwierdzam, iż nie znajduję dowodu na inicjację kultury komórek macierzystych właśnie z trichoblastów, ani też na dedyferencjację tych komórek.

Dokumentacja fotograficzna jest nieprzekonywująca i wielce wątpliwa. Poniżej podaję najbardziej jaskrawe przykłady:

**Tablica 1** zawiera 11 zdjęć z zespołami komórek emitujących zieloną fluorescencję. Brak odpowiadających obrazów z mikroskopu świetlnego uniemożliwia identyfikację sfotografowanych obiektów. Interpretacja zdjęć zamieszczonych w opisie Tablicy **1D-H** i **1J-L** jest zatem niewiarygodna. Na podstawie zdjęcia **1H** nie sposób stwierdzić czy podziały komórek są „samoodnawiające czy różnicujące”. Na fotografii **1I** widzę dwie komórki potomne bezpośrednio po podziale, jedna z gęstą cytoplazmą, druga z dwiema wakuolami, a nie „kilkukomórkową strukturę”.

**Tablica 2E-F** i **2H-I** zawiera zdjęcia na podstawie których ponownie nie można stwierdzić czy podziały komórek są symetryczne czy też asymetryczne. Na fotografii **2G**, wg Autora, „uchwycono efekt odróżnicowania”. Na jakiej podstawie sformułowano taką tezę?

**Tablica 3G** przedstawia, wg Autora, „masowe odróżnicowanie *de novo* do stanu macierzystości oraz podziały samoodnawiające”. Nie mogę dokonać weryfikacji takiego stwierdzenia. Zdjęcie **3I** jest błędnie zinterpretowane. W mojej ocenie przedstawia asymetryczny podział komórki (strzałka krótsza) i komórkę niepodzieloną z dużą wakuolą i gęstą cytoplazmą na jednym biegunie (strzałka dłuższa).

**Tablica 5** – w odniesieniu do zdjęć **A, B, D, E, G, H, J** ponownie stwierdzam brak odpowiadających obrazów z mikroskopu świetlnego i niemożność weryfikacji zamieszczonych opisów. Jak, wg Autora, „udało się zobrazować proces odróżnicowania *de novo* komórek protodermy/egzodermy do stanu macierzystości”? Interpretacja obrazów **C** i **I** z mikroskopu elektronowego jest wręcz kuriozalna. Te

zdjęcia, poza powiększeniem, niczym się nie różnią, zatem opis jest jedynie nieprawidłową interpretacją Autora. Na tak niewielkim powiększeniu niemożliwe jest zidentyfikowanie proplastydów czy kropli lipidowych (!).

**Tablica 6** – Fotografie **A, E, F, G** są niemożliwe do oceny ze względu na brak odpowiadających obrazów z mikroskopu świetlnego.

## **Wnioski**

Wnioski powinny być najbardziej znamienitą częścią rozprawy doktorskiej wieńczącą „dzieło”. Nie powinny być podsumowaniem wyników - jak w przypadku recenzowanej pracy - ale raczej przedstawiać wizję Autora co do możliwego wykorzystania wyników w badaniach podstawowych, bądź też w praktyce.

Niestety, w rozprawie p. Petra Berko ta część jest zdecydowanie naj słabsza i niezrozumiała pod względem językowym:

**Wniosek 2**, cyt. „Przeprowadzone badania cytologiczne i ultrastrukturalne pozwoliły na jednoznaczne przypisanie KKMWK do większej rodziny nowej generacji roślinnych kultur  $_{RF-iTKM}$  pod zunifikowaną nazwą  $TE(K/PK)_{RF-iT^TKM}$ ”.  
**Nie ma takich dowodów pracy.**

**Wniosek 3**, cyt. ”Identyfikacja struktur PEM jako izolowanych symplastowo zgrupowań  $TR(K/PK)_{RF-iT^TKM}$  dowodzi embriogenicznego potencjału kultury. Obserwowane tłumienie pełnej realizacji potencjału morfogenetycznego jest zapewne efektem występowania utrwalonej pamięci epigenetycznej eksplantatu pierwotnego” **jest niezrozumiały.**

## **Spis literatury**

W pracy zacytowano dane ze 177 artykułów naukowych, prac magisterskich, doktorskich i streszczeń konferencyjnych. Stwierdzam, że niestety tylko 9 prac, tj. 5,1%, (w tym 2 prace magisterskie i 1 doktorska) pochodzą z ostatnich 5 lat (2016-2020). Wiedza Autora w przedmiotowym temacie wydaje się więc nieaktualna, nie poparta najnowszymi wynikami badań nt. macierzystych komórek roślinnych i produkcji ryboflawiny przez mikroorganizmy.

## Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa miała w swoim założeniu ciekawy i przyszłościowy cel, jakim jest kultura *in vitro* macierzystych komórek roślinnych - w tym przypadku odróżnicowanych trichoblastów ogórka - jako alternatywnej metody pozyskiwania substancji biologicznie czynnych.

Oceniam, że praca, pomimo szczytnych i aktualnych założeń, jest na niskim poziomie naukowym pomimo bardzo długiego czasu realizacji (ponad 8 lat). Przedstawione wyniki są niewiarygodne i źle udokumentowane, a interpretacja materiału zdjęciowego jest często niemożliwa ze względu na brak czytelnych zdjęć.

Praca napisana jest w sposób mało przejrzysty, często wręcz niejasny, trudny do czytania i stylistycznie niepoprawny. W opisach dominuje „przerost formy językowej” nad skromną treścią.

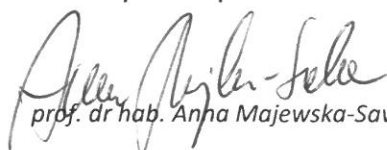
**Przykład opisu do Rys. 14, cyt.” Odróżnicowanie pierwotnie syntetyzujących  $RF_{2-PE-V}$  trichoblastów eksplantatu korzeniowego do stanu macierzystości poprzedzające pierwszy podział  $TR(K)_{RF-iT^T}KM$  (pod działaniem pożywki inicjalnej wzbogaconej o sekretom uwalniany przez proliferujące komórki w warunkach współkultury  $TR(PK)_{RF-iT^T}KM$  oraz formowanie *de novo* kolejnych generacji  $TR(K)_{RF-iT^T}KM$  z podejmujących syntezę  $RF_{2-PE-V}$  komórek protodermy/egzodermy nowopowstających ZS (pod działaniem pożywki proliferacyjnej wzbogaconej o sekretom uwalniany przez proliferujące  $TR(K)_{RF-iT^T}KM$ )”, który jest kompletnie niezrozumiały.**

Użycie aż 55 skrótów (części z nich nie ujęto w spisie), w większości bardzo skomplikowanych sprawia, iż lektura pracy jest niełatwa. Tym bardziej nieuzasadniona wydaje się propozycja Autora dotycząca upowszechnienia i unifikacji zastosowanego nazewnictwa/skrótów.

W tekście znalazłam liczne błędy ortograficzne (np. nieporządkany zamiast **niepożądany**, jasno żółty zamiast **jasnożółty**, etc.), niepoprawne i nieistniejące w j. polskim sformułowania (**sekretom**, **odspojona ryzoderma**, **defektywne zarodki**) i rusycyzmy (**u ogórka**, **u badanych linii**, etc.). Interpunkcja również pozostawia wiele do życzenia.

Nie otrzymałam pracy w wersji elektronicznej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe uwagi, w przewadze krytyczne, stwierdzam, że rozprawa doktorska spec. Petra Berko nie spełnia wymogów, które uzasadniałyby przeprowadzenie kolejnych etapów przewodu. Zalecam odrzucenie pracy na obecnym etapie.

  
prof. dr hab. Anna Majewska-Sawka