

Prof. dr hab. Bożena Pawłowska
Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 24.01.2022

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej spec. Petra Berko
pt. Kultura komórek macierzystych włóśników korzeniowych ogórka jako alternatywa
dla korzeni włóśnikowych**

wykonanej w Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
pod kierunkiem naukowym dr hab. Wojciecha Burzy, prof. SGGW
w ramach projektu MNiSW (N N302 655040) realizowanego w latach 2011-2014
oraz programu Erasmus Mundus IAMONET-RU

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną do wykonania recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Nauk Ogrodniczych dr hab. Dariusza Wrony, prof. SGGW z dnia 2 grudnia 2021 roku (znak INO w 84/21), z prośbą o jej wykonanie.

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona rozprawa jest oryginalnym opracowaniem liczącym 144 strony, posiada układ typowy dla tego rodzaju prac. Zasadnicza jej część jest poprzedzona streszczeniami w języku polskim i angielskim, które zwięźle podsumowują pracę, oraz wykazem 55 skrótów używanych w pracy, które miały ułatwić czytanie manuskryptu. Na końcu pracy, w 5-stronicowym załączniku, przedstawiono 7 tabel dokumentujących szczegółowe wyniki. Proporcje ilościowe pomiędzy rozdziałami dedykowanymi wstępowi z celem pracy (2 strony), przeglądowi literatury (26 stron), metodyce (17 stron), wynikom (35 stron) i dyskusji (20 stron) są właściwe i utrzymane z przewagą części poświęconej wynikom. W tekst wkomponowano 7 tabel oraz 6 tablic zdjęciowych zawierających 55 fotografii

mikroskopowych. W pracy zamieszczono 14 rysunków (schematów i wykresów), z których 8 pokazuje wyniki pracy, pozostałe są cytowane za innymi autorami (publikacje umieszczono w spisie literatury). Pracę podsumowuje 8 wniosków. Na zestawienie cytowanej literatury składa się 177 pozycji, z czego 86% to publikacje w języku angielskim, ponad 80% cytowanych prac wydano w ostatnich dwóch dekadach, ale tylko nieliczne z nich pochodzą z ostatnich lat.

Do pracy dołączono płytę CD zawierającą wersję elektroniczną manuskryptu oraz streszczenia.

Tematyka i znaczenie naukowe badań

Przedstawiona praca dotyczy indukcji i utrzymania stabilnej kultury roślinnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro*, jest to temat ciekawy i nowatorski w świecie roślin.

Głównym obiektem badań były kultury *in vitro* ogórka (*Cucumis sativus* L.), który jest obiektem wieloletnich eksperymentów, skutkujących osiągnięciami, dokonanymi w Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii SGGW w Warszawie. Najważniejszym zagadnieniem badanym w pracy była indukcja i udoskonalanie metod indukcji komórek macierzystych z komórek włóśników ogórka, a w dalszej części wykazanie przydatności opracowanej procedury do inicjowania tego procesu u innych gatunków użytkowych. Podjęto też próbę utrzymania ustabilizowanej kultury komórek macierzystych ogórka w bioreaktorach. Ponadto analizowano jej przydatność do zabezpieczenia w bankach genów oraz zaproponowano procedurę efektywnej krioprezerwacji. Uważam wybór tematu pracy za interesujący, a zadania postawione do wykonania za poznawczo ważne oraz posiadające aspekt aplikacyjny.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pierwszym rozdziale (Wstęp i cel pracy) Doktorant w skrócie przybliżył temat pracy, sformułował i wyjaśnił hipotezę badawczą, oraz przedstawił cel badań z dokładnym wypunktowaniem sześciu zadań szczegółowych, które realizowano w ramach kolejnych eksperymentów.

Przegląd literatury przygotowany na podstawie zebranych publikacji, został przedstawiony w kilku podrozdziałach tematycznych. Odnosi się kolejno do charakterystyki korzenia jako obiektu badawczego, rodzajów kultur korzeniowych, kultur komórek macierzystych, dalej produkcji biomasy roślinnej i metabolitów produkowanych w bioreaktorach, w ostatniej części opisane są podstawy krioprezerwacji materiału roślinnego. W mojej ocenie, zaprezentowana wiedza jest związana z podjętymi badaniami, dotyka podjętych w pracy tematów i wystarcza do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów.

W rozdziale materiały i metody przedstawiono szczegółowo materiał roślinny do badań, tj. różniące się pod względem płci linie ogórka zwyczajnego oraz 7 gatunków/odmian roślin uprawnych. Dalej, w miarę poprawnie opisana jest metodyka badań. Ogólny schemat badań z całą pewnością ułatwiłby lepsze zrozumienie przeprowadzonych eksperymentów

i wykonanych analiz. Takiego graficznego zestawienia w moim odczuciu bardzo brakuje. Zachęcam Doktoranta do przygotowania schematu wyjaśniającego układ pierwszej, kluczowej, części badań, z uwzględnieniem metodycznych szczegółów, podobnie jak zostało to przygotowane dla procedury krioprzechowywania.

Podczas prezentacji zastosowanych pożywek, daje się zauważyć upodobanie Autora do rozmaitych skrótów i symboli, które nie zawsze spełniają zamierzone zadanie. Chociaż tabela pokazująca pożywki jest dość przejrzysta, to rozwikłanie zastosowanej symboliki możliwe jest dopiero po wnikliwym jej przestudiowaniu.

W tej części pracy najbardziej starannie opisana jest metodyka krioprezerwacji, szkoda jednak, że nie zawiera opisu wizualnej przeżyciowej metody oceny, którą Autor zachwala jako technicznie prostą i mało czasochłonną, ale nie podaje szczegółów.

Największym mankamentem tego rozdziału jest praktycznie całkowity brak danych dotyczących układów doświadczalnych: liczby powtórzeń w eksperymentach, liczby „eksplantatów” w powtórzeniu, (wyjątkiem jest wspomniany rozdział nt. krioprezerwacji i kultur w bioreaktorach), czy też liczby prób ocenianych technikami mikroskopowymi. Nie znajdujemy tu także informacji na temat przeprowadzonych analiz statystycznych.

Opis rezultatów badań zamieszczony w Wynikach utrzymany jest w porządku uwzględniającym obserwacje i analizy opisane w poprzednim rozdziale pracy. Pierwsza część dotyczy osiągnięć w zakresie inicjacji, stabilizacji i proliferacji kultur komórek macierzystych (iTKM) i jest przedstawiona dość czytelnie. W tej części Autor odwołuje się do zdjęć zamieszczonych w postaci solidnie przygotowanych tablic, które dokumentują zaobserwowane zjawiska. Mankamentem są bardzo małe fotografie, np. tablica 1 zawiera 12 zdjęć, które zajmują pół strony (podczas gdy podpis pod tablicą to 2 strony tekstu). Pomimo obszernych podpisów pod tablicami nie zawsze jest możliwość zweryfikowania poprawności interpretacji, ze względu na wielkość fotografii, także w wersji elektronicznej. Najwięcej wątpliwości budzą te z fluorescencji, gdzie prawdopodobnie podczas fotografowania niewłaściwie dobrano kontrasty. Pozostaje z pełnym zaufaniem odnieść się do interpretacji Autora, który pracował w zespole znawców tematu, pod kierunkiem Promotora.

Wyniki dotyczące krioprezerwacji pokazano na siedmiu zdjęciach tablicy nr 6 (zastrzeżenia jak powyżej) oraz na rysunku ilustrującym dynamikę przyrostu świeżej masy tkanki kultury odtworzonej po rozmrożeniu 3 linii ogórka. Analizowano też dynamikę zmian zawartości ryboflawiny, a na wykresach pokazano wyniki pomiarów wykonywanych co 3 dni, niestety nie zamieszczono danych z analiz statystycznych. Mam też zastrzeżenia do pierwszego akapitu rozdziału 4.2 i przeczytanego tam zdania o „ustaleniu kryteriów selekcji tkanki do zamrażania, optymalnego momentu jej pobrania z kultury iTKM ...”. O tym nie pisano w metodyce, również w rozdziale wyniki Autor nie pokazuje dowodów, że przeprowadził badania, które pozwoliłyby wspomniane kryteria ustalić. Skąd zatem taki zapis? Ostatnia część przedstawionych rezultatów koncentruje się na kulturach bioreaktorowych. Szkoda, że otrzymane wyniki nie zostały poddane analizie statystycznej, zwłaszcza, że jak wynika z tabel w załącznikach były zebrane dane do ich przeprowadzenia. Interpretacja wyników, bez dokumentacji statystycznej jest wielce subiektywna i nie może być uznana za wiarygodną.

Rozdział Dyskusja został napisany z odpowiednią narracją, dotyka podejmowanych wątków badawczych i konfrontuje je z literaturą. Według mnie ta część pracy jest poprowadzona właściwie, co świadczy o znajomości zagadnień poruszanych przez Doktoranta.

Podczas czytania pracy, oprócz uchybień merytorycznych, zauważyłam wiele mankamentów, najważniejsze wskazuję poniżej.

- Praca jest napisana trudnym językiem, wiele bardzo zawiłych, złożonych zdań oraz nadużywane ozdobniki nie ułatwiają czytania.
- Ogromna liczba skrótów sprawia, że tekst czyta się trudno.
- Skróty zaproponowane na początku pracy (plus dodatkowe, bo nie wszystkie ujęto w tej części) nie spełniają zamierzonego zadania i powodują, że w niektórych miejscach tekst jest niezrozumiały, bardzo skomplikowany. Zaproponowane przez Autora upowszechnienie skrótów i ich unifikacja, w takiej formie nie jest możliwe. Myślę, że kwestia ta wymaga jeszcze wielu przemyśleń.
- Wprowadzając wiele podrozdziałów do głównych części pracy Doktorant próbował kolejno przedstawić podnoszone kwestie, ale nie ustrzegł się w tym porządkowaniu prostych pomyłek numerycznych.
- W tekście dostrzegłam też kłopotliwe błędy, w tym ortograficzne, oraz określenia niepoprawne w języku polskim, zaczerpnięte bezpośrednio z angielskiego.
- Muszę też wytknąć małą dbałość o szczegóły, np. niekonsekwentne przedstawienie materiału roślinnego (brak nazwy polskiej lucerny), odmiana botaniczna powinna być pisana kursywą, w innym miejscu Autor myli chlorek sodu z chlorkiem wapnia, na stronie 72 przywołuje rys. 11, a ma być 12.

Poniżej przedstawiam zadania dla Doktoranta, proszę, aby koniecznie odniósł się do tych kwestii podczas publicznej obrony:

1. Proszę opisać roślinne komórki macierzyste, a także porównać je z komórkami macierzystymi u zwierząt. Proszę wyjaśnić zasadność i poprawność zaproponowanego terminu: „indukowane totipotencjalne komórki macierzyste”. Czym jest totipotencja, czym są komórki macierzyste? A totipotencjalne komórki macierzyste?
2. Proszę przedstawić poprawny schemat pierwszego etapu badań, tego, który dotyczy doświadczeń nad komórkami macierzystymi (w pracy rozdziały metodyczne 3.1-3.9)
3. Proszę, aby Doktorant wykazał się umiejętnością przeprowadzenia analizy statystycznej (prostej jednoczynnikowej chociażby), najlepiej na przykładzie swoich wyników dotyczących krioprezerwacji i kultur bioreaktorowych. Proszę zaprezentować wyniki takich analiz wraz z właściwą interpretacją.
4. Dlaczego Doktorant zdecydował się na zastosowanie metody kapsułkowania dehydratacji podejmując krioprezerwację, jakie są zalety i wady tej metody. Proszę wyjaśnić na czym polega ocena przeżywalności metodą TTC i dlaczego nie mogła być przydatna w Pana eksperymentach oraz opisać metodę, którą się posłużono.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Mimo wskazanych w recenzji uchybień, rozprawa doktorska Pana Petra Berko jest ciekawym opracowaniem naukowym. Doktorant podjął ważny problem badawczy, zaplanował i wykonał pracochłonne eksperymenty, wykazując się znajomością szerokiego warsztatu badawczego, opanował liczne techniki eksperymentalne (kultury in vitro, kultury bioreaktorowe, krioprezerwacja, umiejętność korzystania z mikroskopów świetlnego, odwróconego i konfokalnego). Udowodnił umiejętność prawidłowego realizowania zadań badawczych, wykazał się sprawnością dyskusowania otrzymanych wyników w oparciu o aktualną wiedzę literaturową.

Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej Pana Petra Berko stwierdzam, że spełnia ona wymagane kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami. Wobec powyższego stawiam wniosek o dopuszczenie Pana Petra Berko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

