

Warszawa 07.06.2023

Dr hab. Inż. Katarzyna Chwedorzewska prof. SGGW  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Katedra Botaniki  
Nowoursynowska 166, Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Anny Pachoty pt.:**  
**„Zmienność roślin z rodziny *Poaceae* jako efekt modyfikacji warunków regeneracji w kulturach**  
***in vitro*”**  
**przygotowanej pod kierunkiem promotora – prof. dr. hab. Piotra Bednarka**  
**i promotora pomocniczego dr hab. Renaty Orłowskiej**  
**w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie,**  
**Zakładzie Biochemii i Biotechnologii**

#### **Podstawa prawna sporządzenia recenzji**

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Wysoką Radę Wydziału Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu wszczętym 25 kwietnia 2019 roku o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych Pani mgr inż. Katarzynie Pachocie zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zmianami), w związku z art. 179 ust.3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r. poz. 1669).

Stwierdzam, że przedstawione mi dokumenty są kompletne i zostały przygotowane w sposób umożliwiający ocenę dorobku naukowego Doktorantki i wydania jednoznacznej opinii

w sprawie nadania stopnie doktora nauk biologicznych, zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie.

**Otrzymałam:** rozprawę doktorską w formie monotematycznego cyklu publikacji naukowych opatrzonego polskojęzycznym wstępem (autoreferatem) składającym się ze „Streszczenia”, „Streszczenia anglojęzycznego”, „Przeglądu Literatury”, „Hipotezy badawczej i celu pracy”, „Materiałów i metod badawczych”, „Prezentacji wybranych wyników oraz ich dyskusji”, „Podsumowania i wniosków” i „Bibliografii”. Praca zawiera również oświadczenia o procentowym udziale współautorów w opracowaniu publikacji wchodzących w skład dzieła oraz kopie tychże publikacji.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Pachoty jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pachoty przygotowana została jako cykl czterech prac doświadczalnych, jednej opublikowanej w 2020 i trzech 2022 roku. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports o średnim i wysokim współczynniku wpływu (Impact Factor - IF), sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład dzieła wynosi 9,445 (zgodnie z rokiem publikacji). Czasopisma te znajdują się również w „Wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych” Ministerstwa Edukacji i Nauki i według tego wykazu ich sumaryczna liczba punktów wynosi 330.

W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką (w jednej z nich jest jedyną) i jej wkład w ich powstanie jest wysoki i wynosi odpowiednio 80, 90 i 100%, jedynie w jednej wynosi 10% i ogranicza się do zebrania materiału badawczego i wykonania części analiz laboratoryjnych.

Według Web of Science (core collection) Doktorantka jest autorką w sumie 11 publikacji cytowanych 47 razy, więc jest osobą już rozpoznawalną w świecie naukowym.

Obiektem badań Doktorantki jest pszenżyto (*xTriticosecale*), będące mieszańcem między gatunkowym. Jest to cenna roślina paszowa, coraz częściej również wykorzystywana w przemyśle spożywczym, czy do produkcji biopaliw. Podstawową zaletą pszenżyta są niewielkie wymagania glebowe, plonuje ono dobrze na glebach lekkich i mało żyznych dając wyższy plon od żyta. Pszenżyto charakteryzuje się stosunkowo niską zmiennością genetyczną będącą konsekwencją wąskiej puli genetycznej rodziców wykorzystywanej na etapie hodowli odmian,

co powoduje, że staje się ono coraz bardziej wrażliwe na patogeny, zwłaszcza choroby grzybowe. Niska zmienność genetyczna utrudnia również uzyskanie efektu heterozji. Skrócenie procesu hodowli nowych odmian wiąże się zatem ze skutecznym i szybkim uzyskiwaniem na drodze *in vitro* podwójnych haploidów, a w konsekwencji linii homozygotycznych w liczbie przydatnej dla praktycznej hodowli. Dlatego też optymalizacja procesu uzyskiwania na drodze *in vitro* podwójnych haploidów ma kluczowe znaczenie nie tylko praktyczne, ale również ekonomiczne.

W pierwszej pracy Doktorantka wraz z współautorami rozpoczęła badania mające na celu zwiększenie wydajności androgenezy u pszenżyta, pszenicy i jęczmienia (wyrażonej zwiększeniem liczby uzyskiwanych zielonych regenerantów w stosunku do regenerantów albinotycznych) poprzez modyfikacje składu pożywki indukującej (gdzie testowane były różne stężenia jonów miedzi i srebra) i czasu inkubacji eksplantatów. Na wzmiankę zasługuje wykorzystana w pracy metoda Taguchiego umożliwiająca redukcję liczby doświadczeń niezbędnych do optymalizacji warunków regeneracji roślin. Metoda ta jest szczególnie użyteczna w przypadku optymalizacji wieloczynnikowych, złożonych procedur doświadczalnych. Zaproponowana metoda pozwoliła na zmniejszenie liczby kombinacji eksperymentalnych z 27 do zaledwie 9, co znacząco skróciło czas badań i zmniejszyło ich koszty. W pracy tej między innymi wykazano, że poprzez dobór odpowiedniego czasu regeneracji i modyfikacje składu pożywki indukującej można wpłynąć na wydajność regeneracji zielonych roślin pszenżyta. Zwłaszcza wysokie stężenie jonów miedzi sprzyjało procesowi regeneracji.

Druga publikacja dedykowana była badaniom nad wpływem warunków hodowli (różny skład pożywki indukującej: różne stężenia jonów miedzi i srebra, oraz różny czas inkubacji eksplantatów) na „zmienność wywołaną kulturą *in vitro*” u regenerantów pszenżyta, uzyskanych na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantce udało się uzyskać jednolity morfologicznie i genetycznie materiał donorowy, który był źródłem eksplantatów. Rośliny donorowe wykorzystane w procesie pozyskiwania regenerantów na drodze androgenezy, jak wykazały badania z wykorzystaniem techniki metAFLP, ujawniły niewielką heterozygotyczność na poziomie genetycznym i nieco większą w na poziomie epigenetycznym. Wyniki te dowodzą, że skład pożywki inkubującej i czas inkubacji mogą w pewnym stopniu wpływać na zmienność genetyczną/epigenetyczną u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy. Wyższe stężenia jonów miedzi w pożywkach powodowały ponadto najniższą „zmienność wywołaną kulturą *in vitro*”, pozwalając uzyskać bardziej

jednorodny materiał pod względem genetycznym i sprzyjały najwyższej wydajności procesu regeneracji.

W publikacji trzeciej Doktorantka przedstawia wyniki swoich badań na roślinach donorowych wykorzystywanych w procesie uzyskiwania regenerantów na drodze somatycznej embriogenezy z niedojrzałych zarodków zygotycznych (przy różnych wariantach składu pożywki indukującej i czasu inkubacji) z wykorzystaniem techniki metAFLP. Wykazała ona, że skład pożywki inkubującej i czas inkubacji, mogą wpływać na poziom zmienności genetycznej/epigenetycznej regenerantów, a wraz z obniżeniem stężenia jonów miedzi zwiększa się poziom „zmienność wywołanej kulturą *in vitro*”. Natomiast nie zaobserwowała ona wpływu stężenia jonów srebra i czasu inkubacji na ten proces. Ponadto udało się je zidentyfikować niewielkie zmiany w metylacji DNA dotyczące symetrycznych i asymetrycznych kontekstów sekwencji DNA przy różnych warunkach regeneracji. Różnice te odnosiły się do zmienności sekwencyjnej w kontekstach symetrycznych CHG i CG, oraz do zmian w demetylacynych DNA w kontekście CG. Wynik ten może sugerować, wpływ składu pożywki inkubacyjnej na szlaki metaboliczne indukując „zmienność wywołaną kulturą *in vitro*”.

W publikacji czwartej publikacji Doktorantka porównała regeneranty uzyskane na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy w różnych warunkach kultur *in vitro* (przy różnych wariantach składu pożywki indukującej i czasu inkubacji) z wykorzystaniem techniki metAFLP, biorąc pod uwagę poziom zmienności genetycznej i epigenetycznej obserwowanej w różnych kontekstach sekwencji DNA dla zmetylowanej cytozyny (CG, CHG, CHH). Analizie poddano zmiany sekwencji DNA oraz zmiany wzorców metylacji DNA, tj. demetylacja DNA i wprowadzenie metylacji do cytozyny (metylacja DNA *de novo*). Doktorantka wykazała, że regeneranty otrzymane na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy w różnych warunkach kultur *in vitro*, wykazują różny poziom zarówno demetylacji jak i metylacji DNA *de novo*. Różnice te były szczególnie widoczne w przypadku demetylacji w kontekście symetrycznej sekwencji CG i metylacji *de novo* w kontekście asymetrycznym CHH. Zmiany te mogły być związane z przeprogramowaniem rozwoju mikrospor z gametofitu na sporofit i brakiem takiego procesu w zarodkach zygotycznych w trakcie procesu regeneracji.

Prace badawcze wchodzące w skład dzieła opatrzone są obszernym 82 stronicowym wstępem (autoreferatem), gdzie Doktorantka odwołując się do współczesnej literatury naukowej przedstawia całość zagadnienia, naświetla cele badawcze, stawia hipotezy, relacjonuje przebieg badań oraz podkreśla wagę uzyskanych przez siebie wyników. Ta część

działa jest bardzo ważna, gdyż spina w spójną całość uzyskane na kolejnych etapach pracy wyniki, które były publikowane w czasopismach o różnym profilu i wymaganiach. Publikacje wchodzące w skład dzieła zapewne zostały zmodyfikowane, żeby sprostać wymaganiom różnych redaktorów i recenzentów, więc jednolite ich podsumowanie jest jak najbardziej zasadne. Moje krytyczne uwagi dotyczą przede wszystkim tej części, jest ona niestety najsłabszą stroną dzieła. Doktorantka powołuje się w Autoreferacie na bardzo obszerną literaturę (aż 316 pozycji), co z jednej strony świadczy o dogłębnym przygotowaniu się do przeprowadzonych badań, z drugiej strony niestety powoduje pewien zamęt w tekście. Moim zdaniem Doktorantka powinna krytycznie spojrzeć na niektóre pozycje, szczególnie te starsze. Przykładem mogą być prace, zwłaszcza te z lat 90-tych opisujące wyniki uzyskane przy użyciu techniki RAPD. Technika ta, jak czas pokazał okazała się w wielu przypadkach zawodna, a wyniki uzyskane przy jej pomocy są niemożliwe do weryfikacji. W wielu miejscach można również znaleźć skróty myślowe, które mogą zostać niewłaściwie zinterpretowane przez czytelnika np.: „Przegląd literatury” strona 15, ostatni akapit, „...Mimo ciągłego postępu w hodowli heterozyznej nadal pozostają ograniczenia, które dotyczą, niskiej zmienności genetycznej materiałów do krzyżowań. Rozwiązaniem wydaje się ponowne odtworzenie gatunku i tym samym zwiększenie wyjściowej puli genetycznej. Można również wykorzystać np., metody mutagenyzy czy też potencjał jaki niosą ze sobą kultury tkankowe z regeneracją roślin na drodze androgenezy...”. Czytając powyższy fragment można by odnieść wrażenie, że skuteczną metodą na „zwiększenie zmienności genetycznej” jest regeneracja roślin na drodze androgenezy. W części „Materiały i Metody”: Doktoranta wykorzystwała w pierwszej pracy metodę Taugchiego do zredukowania liczby doświadczeń, jednak nie znalazłam chociażby pobieżnego opisu tej metody, ani odwołania do literatury źródłowej. Brakuje mi również rozwinięcia punktu 7 w rozdziale „Podsumowania i Wnioski”. Moim zdaniem Autoreferat powinien zawierać również informacje czy i w jaki sposób prezentowane badania będą kontynuowane.

Powyższe uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają wartości rozprawy, którą oceniam wysoko.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że publikacje stanowiące rozprawę zostały dobrze dobrane i stanowią logiczną całość. Doktorantka doskonale opanowała techniki *in vitro*, techniki molekularne i metody statystyczne wykorzystując je umiejętnie do zweryfikowania hipotez, prawidłowego zinterpretowania wyników i osiągnięcia postawionych celów, wykazując dużą wiedzę teoretyczną, którą z powodzeniem zastosowała w praktyce. Na uwagę zasługuje

również aspekt aplikacyjny prezentowanych badań. Uzyskane wyniki będą mogły zostać wykorzystane w pracach hodowlanych nie tylko pszenżyta, ale również innych roślin zbożowych.

#### Wniosek końcowy

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Pachoty jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Pachoty zatytułowana „Zmienność roślin z rodziny *Poaceae* jako efekt modyfikacji warunków regeneracji w kulturach *in vitro*”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy.

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Pachoty, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Katarzyna Chwedorzewska prof. SGGW

