



Prof. dr hab. Iwona Szarejko
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice 12 czerwca 2023

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Anny Pachoty
„Zmienność roślin z rodziny Poaceae jako efekt modyfikacji warunków regeneracji
w kulturach *in vitro*”

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pachoty została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Piotra Bednarka w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR-PIB) w Radzikowie. Promotorem pomocniczym rozprawy była Pani dr hab. Renata Orłowska. Rozprawę stanowią cztery, spójne tematycznie artykuły, z których jeden opublikowany został w roku 2020, a trzy w 2022. Wszystkie prace ukazały się w międzynarodowych czasopismach naukowych z listy JCR: *Electronic Journal of Biotechnology* (publikacja P1), *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (publikacja P2), *Journal of Applied Genetics* (publikacja P3) i *Cereal Research Communication* (praca P4). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych wyżej czasopism z roku publikacji artykułu wynosi 9,445, co odpowiada 330 punktom MEiN wg punktacji obowiązującej w roku wydania pracy. Pani Katarzyna Pachota jest jedynym autorem jednej publikacji (P4), pozostałe trzy prace są wieloautorskie, przy czym w dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem (P2 i P3). Do dokumentacji włączono oświadczenia współautorów artykułów, które jednoznacznie wskazują na dominującą rolę Doktorantki (80-90%) w przeprowadzeniu opisanych w dwóch publikacjach badań i Jej znaczący udział w przygotowaniu publikacji do druku. Jedynie w jednej publikacji (P1) Kandydatka oceniła swój wkład na 10%. Zestawienie prezentowanych publikacji tak, aby tworzyły jedną rozprawę doktorską nie budzi moich żadnych wątpliwości, gdyż dotyczą one analizy zmienności wygenerowanej w kulturach *in vitro* wybranych gatunków zbóż w odniesieniu do warunków kultury *in vitro* i jej typu (androgeneza i somatyczna embriogeneza). Ich wybór w pełni odpowiada tytułowi dysertacji, w skład której wchodzi, poza publikacjami, następujące rozdziały: streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, przedstawienie hipotez badawczych i celu badań, omówienie wyboru materiału i metod badawczych, omówienie wybranych wyników badań wraz z ich dyskusją, podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski oraz bibliografia.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Pachoty jest kompleksowa analiza wpływu warunków kultury *in vitro* (składu pożywek i czasu trwania kultury) na wydajność regeneracji roślin i poziom zmian genetycznych i epigenetycznych indukowanych w procesie androgenozy i somatycznej embriogenezy u regenerantów pszenżyta (*xTriticosecale* ssp. Wittmack ex. A. Camus). Zmienność indukowana w kulturze





in vitro (ang. *tissue culture induced variation*), zwana też, w zależności od rodzaju eksplantatu, zmiennością somaklonalną lub gametoklonalną, już od kilkudziesięciu lat jest przedmiotem wielu badań genetycznych i molekularnych. Zmiany generowane w kulturze *in vitro* mogą być użytecznym źródłem zmienności genetycznej, szczególnie dla roślin uprawnych rozmnażanych wegetatywnie, lecz mogą także być niepożądane dla hodowców, jeśli ich podłożem są zmiany cytologiczne, często prowadzące do zmniejszenia plonowania roślin. Dodatkowym problemem jest fakt, że część zmian ma charakter epigenetyczny, prowadząc do zmian poziomu metylacji DNA i ekspresji genów. Stąd konieczność precyzyjnego określenia typów i poziomu zmian indukowanych w różnych typach kultur *in vitro* dla różnych gatunków roślin uprawnych, a także poszukiwania czynników dotyczących samej kultury *in vitro*, które mogą wpływać na poziom i rodzaj zmian u regenerantów. Zespół Pana prof. dr hab. Piotra Bednarka w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie jest jednym z najważniejszych ośrodków zajmujących się tematyką genetycznej i epigenetycznej zmienności indukowanej w kulturze *in vitro*, a wykonana pod kierunkiem profesora Bednarka rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pachoty stanowi nowy rozdział tych ważnych merytorycznie badań.

Cele pracy, szczegółowe hipotezy badawcze, obiekt badań i zastosowane metody badawcze

Głównym celem badań prowadzonych przez Doktorantkę było ustalenie, jak warunki kultury *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem zróżnicowanego stężenia jonów miedzi i srebra oraz czasu inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących, wpływają na poziom i rodzaj zmienności indukowanej *in vitro* u regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej. Dla osiągnięcia tego celu Autorka w pierwszym etapie pracy przeprowadziła eksperymenty mające na celu optymalizację warunków kultury pylnikowej zarówno dla pszenżyta jak i dwóch innych gatunków zbóż tj. jęczmienia i pszenicy.

Doktorantka sformułowała szereg szczegółowych hipotez badawczych, które weryfikowała w starannie zaplanowanych doświadczeniach. Hipotezy te zakładały, że:

- Stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz czas trwania kultur *in vitro* mogą wpływać na wydajność regeneracji zielonych roślin w kulturze pylnikowej pszenżyta, jęczmienia i pszenicy;
- Warunki kultur *in vitro*, w tym stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz czas trwania kultury *in vitro*, mogą wpływać na poziom zmienności genetycznej i epigenetycznej u regenerantów pszenżyta wyprowadzanych na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy, w tym na poziom zmian w obrębie poszczególnych kontekstów sekwencyjnych (CG, CHG, CHH);
- Poziom i rodzaj zmienności u roślin pszenżyta zregenerowanych z kultur pylnikowych (androgeneza) i z kultur niedojrzałych zarodków (somatyczna embriogeneza) różni się w zależności od zastosowanego eksplantatu.

Podstawowym obiektem badań Doktorantki było przede wszystkim pszenżyto (*xTriticosecale* ssp. Wittmack ex. A. Camus), które ze względu na liczne korzystne cechy, jak silnie rozwinięty system korzeniowy, niskie wymagania glebowe, odporność na suszę, zimotrwałość czy odporność na większość chorób grzybowych, jest ważnym gatunkiem zboża, które może zastąpić pszenicę na glebach słabej jakości. Zarówno areał jak i produkcja pszenżyta w Europie wzrosły w ciągu ostatnich trzydziestu lat odpowiednio, 3- i 4-krotnie, a Polska jest jednym z głównych producentów tego zboża





w Europie. Mimo licznych zastosowań pszenżyta, hodowla tego gatunku napotyka na trudności związane przede wszystkim z wąską pulą genową pszenicy i żyta wykorzystanych do krzyżowania przy jego tworzeniu. W swych eksperymentach mgr K. Pachota wykorzystwała heksaploidalną odmianę pszenżyta ozimego 'T28/2' pochodząca z odmian 'Mungis' × 'Presto'. Oprócz pszenżyta, w badaniach nad optymalizacją warunków kultury pylnikowej Doktorantka wykorzystwała także jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) odmiany jarej 'NAD2' i pszenicę (*Triticum aestivum* L.) ozimej odmiany 'Svilena'.

Należy podkreślić, że do wszystkich eksperymentów jako rośliny donorowe do kultur *in vitro* Autorka wykorzystwała generatywne potomstwo podwojonych haploidów uzyskanych na drodze androgenezy wszystkich wymienionych powyżej genotypów. Zapewniło to pełną homozygotyczność materiału wyjściowego i umożliwiło wyeliminowanie ewentualnej zmienności w eksplantatach, jako źródła zmian obserwowanych u regenerantów. Za ważne założenie tej pracy uważam wykorzystanie tego samego genotypu i tej samej procedury do uzyskania roślin donorowych dla kultury pylnikowej i kultury niedojrzałych zarodków pszenżyta, co ma duże znaczenie przy porównaniu poziomu zmian indukowanych w obu systemach. Dla oszacowania rodzaju i poziomu zmian indukowanych w kulturach zastosowano opracowaną w zespole Pana dr hab. Piotra Bednarka metodę metAFIP (*methylation sensitive amplified fragment length polymorphism*), która pozwala na jednoczesną analizę zmian w sekwencjach DNA oraz zmian o charakterze epigenetycznym, związanych z metylacją/demetylacją DNA. W badaniach Doktorantki zastosowano dodatkową modyfikację tej metody, pozwalającą na wykrycie zmian w zależności od kontekstu sekwencyjnego DNA, w jakiej może wystąpić cytozyna: CG, CHG i CHH gdzie H to A, T lub C.

Zarówno dobór materiału badań, jak i zastosowanych metod badawczych, oceniam jako bardzo odpowiedni, co pozwoliło Doktorantce zrealizować założone cele.

Najważniejsze uzyskane wyniki

W rozprawie przedstawiono wyniki starannie zaplanowanych analiz, dotyczących optymalizacji warunków kultury pylnikowej dla pszenżyta, jęczmienia i pszenicy, a następnie określenia wpływu stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz czasu inkubacji eksplantatów na poziom zmienności indukowanej *in vitro* u regenerantów pszenżyta. Doktorantka uzyskała szereg interesujących wyników, a za najważniejsze z nich uważam:

1. Wykazanie, że suplementacja pożywki indukującej określonymi stężeniami jonów Cu^{2+} i Ag^+ oraz dobór odpowiedniego czasu inkubacji pylników na pożywce indukującej skutkuje podniesieniem częstotliwości zielonych regenerantów w kulturach pylnikowych jęczmienia i pszenicy i pszenżyta.
2. Ustalenie, że zoptymalizowane warunki kultury pylnikowej powodują u jęczmienia i pszenicy zwiększenie stosunku zielonych do albinotycznych regenerantów, natomiast optymalizacja stężenia jonów Cu^{2+} i Ag^+ oraz czasu trwania kultury nie ma wpływu na ten stosunek u pszenżyta.
3. Wykazanie, że regeneranty pszenżyta uzyskane zarówno na drodze androgenezy, jak i somatycznej embriogenezy charakteryzują się wysokim poziomem zmian wywołanych w kulturze *in vitro* (średnio 51% i 45% dla regenerantów z kultur pylnikowych i kultur niedojrzałych zarodków, odpowiednio).
4. Ustalenie, że niezależnie od zastosowanego systemu kultury *in vitro*, podstawową przyczyną zmienności obserwowanej u regenerantów pszenżyta są zmiany o charakterze genetycznym, czyli



- zmiany sekwencji DNA (ok. 84%), natomiast zmiany we wzorach metylacji DNA, zachodzą ze znacznie niższą częstotliwością.
5. Wykazanie, że wśród zmian epigenetycznych, w obu systemach regeneracji częstotliwość procesu demetylacji jest wyższa niż metylacji *de novo*, przy czym u regenerantów z kultur niedojrzałych zarodków różnica między tymi w procesami jest kilkukrotnie wyższa niż u roślin uzyskanych z kultur pylnikowych.
 6. Stwierdzenie, że poziom zmian indukowanych w warunkach kultury *in vitro* pszenżyta zależy od kontekstu sekwencyjnego, w jakim występuje cytozyna: CG, CHG i CHH oraz od rodzaju kultury. U regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy najwyższy poziom zmienności obserwowano w obszarach symetrycznych kontekstów CG i CHG i była to zmienność sekwencyjna, natomiast kontekst asymetryczny CHH charakteryzował się niższym poziomem zmienności. W procesie somatycznej embriogenezy najniższy poziom zmienności odnotowano dla sekwencji CG.
 7. Wykazanie, że demetylacja cytozyny zachodzi najczęściej w kontekście CHG zarówno w warunkach kultury pylnikowej, jak i w kulturach niedojrzałych zarodków, przy czym jej poziom w procesie somatycznej embriogenezy jest wyższy. Natomiast metylacja *de novo* różni oba systemy regeneracji - w androgenyzie proces ten dotyczy najczęściej sekwencji CHG, podczas gdy w somatycznej embriogenezie jest to asymetryczna sekwencja CHH, a w kontekście CG metylacja *de novo* w ogóle nie ma miejsca.
 8. Ustalenie, że warunki kultury *in vitro* wpływają na poziom zmian genetycznych i poszczególnych typów zmian epigenetycznych u regenerantów pszenżyta otrzymanych na drodze androgenyzy i somatycznej embriogenezy. Jedynie częstotliwość demetylacji w procesie androgenyzy i metylacji *de novo* w procesie somatycznej embriogenezy była niezależna od badanych w pracy czynników (stężenia jonów miedzi i srebra oraz długości inkubacji eksplantatów na pożywce indukującej).
 9. Wykazanie istotnej zależności między stężeniem jonów miedzi w pożywce indukującej a poziomem zmian genetycznych i epigenetycznych indukowanych *in vitro* w obu rodzajach kultur pszenżyta badanych w pracy. Najwyższy poziom zmian obserwowano przy niskim stężeniu jonów miedzi w pożywce indukującej dla obu badanych systemów regeneracji pszenżyta.

Komentarze, pytania i uwagi

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam wysoko. Wywód poprowadzony jest logicznie, doświadczenia dobrze zaplanowane i wykonane. Nie mam żadnych większych zastrzeżeń do rozprawy, a postawione poniżej pytania wynikają jedynie z mojej ciekawości i chęci przedyskutowania niektórych zagadnień z Doktorantką. Publikacje wchodzące w skład rozprawy, przed opublikowaniem w czasopiśmie naukowym podlegały już analizie recenzentów i uzyskały ich pozytywne opinie, stąd moje pytania dotyczą głównie pozostałych części rozprawy.

- Za jeden z najciekawszych aspektów badań Doktorantki uważam analizę poziomu zmian genetycznych i wzorów metylacji DNA u regenerantów pszenżyta w zależności od kontekstu sekwencji w jakiej występuje cytozyna i typu regeneracji (androgenyza vs. somatyczna embriogeneza). Niestety, w pracy nie przedstawiono bezpośredniego porównania tych dwóch procesów regeneracji pod względem zmian indukowanych w określonych kontekstach sekwencyjnych cytozyny. Wykresy zamieszczone zarówno w rozprawie, jak i w publikacji P4, ze względu na jednoczesne uwzględnianie czynników dotyczących zmian w stężeniach jonów metali i długości indukcji eksplantatów, są mało czytelne. Analizę statystyczną





składowych zmienności indukowanej *in vitro* (zmienność sekwencyjna i zmiany wzorów metylacji) w zależności od kontekstu występowania cytozyny, przedstawiono osobno dla androgenyzy w Tabeli 3 w publikacji P2 i somatycznej embriogenyzy w Tabeli 5 publikacji P3. Szkoda, że Doktorantka nie zestawiła tych wyników razem w swojej dysertacji. Z porównania tych tabel, a także z analizy poziomu zmienności w poszczególnych kombinacjach analizowanych w pracy czynników (stężenie jonów miedzi i srebra oraz czas indukcji eksplantatów - warianty T1-T9) można wyciągnąć wniosek, że rodzaj kultury i kontekst sekwencyjny miały znacznie większy wpływ na poziom i typ indukowanych *in vitro* zmian niż podkreślane przez Doktorantkę stężenie jonów Cu^{+2} . Różnice między poszczególnymi wariantami T1-T9 pod względem poziomu zmienności indukowanej *in vitro* były najczęściej nieistotne lub bardzo niewielkie (poniżej 1% zmian). Natomiast różnice między procesami androgenyzy i embriogenyzy somatycznej dotyczące zmian wzoru metylacji w określonych kontekstach cytozyny były nawet kilkukrotne. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o interpretację wniosku przedstawionego w Rozprawie na stronie 58: „Analiza poziomu zmienności sekwencyjnej w zależności od poziomu Cu^{2+} w różnych kontekstach pokazała, że w CG i CHH różnica między regenerantami uzyskanymi w A i SE była tylko ilościowa, natomiast SV związana z CHG przyjmowała niższe wartości w SE niż w A, co może dotyczyć innego sposobu ustanawiania metylacji w różnych kontekstach sekwencji”.

- Nie znalazłam informacji, co stanowiło jedno powtórzenie biologiczne w poszczególnych doświadczeniach?
- Doktoranta ustaliła, które stężenia jonów Cu^{+2} i Ag^{+} oraz jaka długość indukcji pylników na pożywce indukującej jest optymalny dla uzyskania najwyższej liczby zielonych regenerantów i najlepszego stosunku roślin zielonych do albinotycznych u jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Należy tu nadmienić, że optymalizacja tych parametrów dotyczyła tylko badanych w pracy genotypów (po jednej odmianie dla każdego gatunku) i konkretnych pożywek indukujących (także po jednej dla każdego gatunku). W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę czym kierowała się przy wyborze pożywek indukujących oraz stężeń Cu^{+2} i Ag^{+} wykorzystanych w doświadczeniach (publikacja P1 eksperyment 1)?
- Czy można powiedzieć, że optymalizacja warunków kultury *in vitro* metodą Tauchiego się powiodła? Porównanie wyników uzyskanych w pracy P1 w eksperymencie 1 (optymalizującym) i eksperymencie 2 (weryfikującym) pokazuje, że jedynie dla pszenżyta wykazano statystycznie istotne różnice między częstotliwością zielonych regenerantów uzyskanych w zoptymalizowanych warunkach kultury *in vitro* a kontrolą. U jęczmienia i pszenicy w eksperymencie weryfikującym różnice te nie były istotne statystycznie, choć w eksperymencie optymalizującym wykazano istotność różnic. Jak można zinterpretować te wyniki? W jaki sposób wybrano warunki optymalne do doświadczenia weryfikującego, które dla jęczmienia były inne niż stosowane w eksperymencie optymalizującym?
- Czy wszystkie regeneranty pszenżyta pochodzące z kultur niedojrzałych zarodków powstały na drodze embriogenyzy somatycznej, a nie organogenyzy, jeśli obserwowano także tworzenie się kalusa, a roślinki przenoszono na pożywkę ukorzeniającą?
- W publikacji P1 stwierdzenie, że zaproponowana optymalizacja warunków kultury pylnikowej nie ma wpływu na poziom spontanicznej diploidyzacji u żadnego z badanych gatunków. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie są najważniejsze mechanizmy spontanicznej diploidyzacji w procesie androgenyzy u zbóż?
- Jakie stężenia jonów srebra w pożywce indukującej badano w procesie somatycznej embriogenyzy pszenżyta? W publikacji P3 przedstawiono 0, 10 i 60 μM , natomiast w Rozprawie (Tabela 2) to 0, 2 i 10 μM .
- W skład rozprawy wchodzi przegląd literatury, w którym Doktorantka zawarła, między innymi opis biochemicznych i molekularnych aspektów zmienności indukowanej w warunkach kultury *in vitro*, oraz metod badania poziomu i rodzajów tej zmienności. Rozdział ten oparty jest o analizę bogatej literatury przedmiotu, lecz brakuje mi w nim wyraźnego odróżnienia badań o charakterze już raczej historycznym (prace z ubiegłego wieku) od najnowszych osiągnięć dotyczących genetycznych i molekularnych podstaw zjawiska somaklonalnej zmienności. Generalnie, w spisie literatury zawierający aż 316 pozycji zaledwie





1/3 pochodzi z ostatnich 10 lat. Myślę, że jeżeli Doktorantka chciałaby przygotować ten rozdział jako pracę przeglądową na temat zmienności indukowanej w kulturze *in vitro*, powinna wyraźnie rozróżnić dane dotyczące historii badań nad zmiennością somaklonalną od ostatnich osiągnięć w wyjaśnianiu mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska.

Powyższe komentarze i pytania do Doktorantki nie wpływają na moją wysoką opinię o merytorycznej wartości rozprawy mgr Katarzyny Pachoty.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa Pani mgr Katarzyny Pachoty spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zmianami w związku z art. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 – przepisy wprowadzające Ustawę prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669). Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej dotyczącej problematyki jej badań, umiejętnością stawiania hipotez naukowych, planowania eksperymentów i stosowania właściwych metod badawczych. Przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat mechanizmów zmienności genetycznej i epigenetycznej indukowanej w kulturach *in vitro* roślin. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Anny Pachoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Iwona Szarejko