

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Makowskiej pt. „Badanie wydajności androgenyzy jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”

wykonanej w Zakładzie Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –  
Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie.

#### 1. Informacje wstępne i omówienie rozprawy

Praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Janusza Zimnego i przy udziale promotora pomocniczego dr inż. Sylwii Oleszczuk. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych o zasięgu międzynarodowym, ogłoszonych przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (lista A). Wszystkie publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Makowskiej są wieloautorskie, rozprawa stanowi więc wyodrębnioną część pracy zbiorowej, a załączone do publikacji dokumenty pozwalają określić indywidualny wkład Kandydatki do stopnia doktora w prezentowane badania. Dokumenty te obejmują: oświadczenia Kandydatki i wszystkich współautorów oraz streszczenie (w języku polskim i angielskim), a także ze zwięzły opis problemu badawczego, założeń pracy, hipotezy i celów badań wraz ze zwięzłym omówieniem wyników czterech publikacji i wnioskami. Autorka przygotowała też obszerny przegląd literatury dotyczący androgenyzy i spis cytowanej literatury naukowej.

Wynikające z postawionych hipotez cele badań zostały zrealizowane, a wyniki zaprezentowano w kolejnych publikacjach.

Cel 1: Określenie korelacji pomiędzy typem rozwoju roślin (jary lub ozimy) a wydajnością regeneracji podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych jęczmienia.

Publikacja: Makowska Katarzyna, Oleszczuk Sylwia, Zimny Aleksandra, Czaplicki Andrzej, Zimny Janusz. 2015. Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley. *Plant Breeding* 134 (6): 668-674, DOI: 10.1111/pbr.12312

Zakładano, że rośliny jęczmienia ozimego, jako przystosowane do trudnych warunków środowiskowych, przejawiają lepszą odpowiedź androgeniczną w kulturach pylnikowych niż rośliny jare. Pozwoliłoby to zwiększyć efektywność regeneracji dihaploidów jęczmienia. Badania prowadzono na 20 genotypach jęczmienia jarego i 20 genotypach jęczmienia ozimego (materiały różnych polskich spółek hodowlanych), były tym samym po raz pierwszy – w porównaniu do wcześniejszych doniesień literaturowych – prowadzone na tak dużej kolekcji genotypów o wysokim poziomie zróżnicowania genetycznego. Nie stwierdzono istotnej różnicy między średnimi częstościami indukcji struktur androgenicznych w pylnikach z roślin jarych i ozimych, jakkolwiek w obu grupach genotypów zanotowano znaczną zmienność odpowiedzi androgenicznej i genotypy dające wysokie liczby struktur na 100 pylników występowały wśród roślin ozimych jak i jarych. Statystycznie istotne różnice pojawiły się w efektywności regeneracji roślin i poziomie albinizmu regenerantów. W kulturach pylnikowych z

roślin ozimych regenerowano więcej roślin (w przeliczeniu na 100 pylników) niż z roślin jarych, przy czym odsetek regenerantów albinotycznych był znacząco niższy dla genotypów ozimych niż dla jarych. Między porównywanymi grupami genotypów nie wystąpiła różnica w częstości spontanicznego podwojenia liczby chromosomów. W konsekwencji średnia efektywność regeneracji zielonych dihaploidów była pięciokrotnie wyższa dla ozimych genotypów jęczmienia w porównaniu z jarymi.

Cel 2: Przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmów powstawania albinizmu w czasie androgenезy oraz sposobów prowadzących do ograniczenia roślin bezchlorofilowych w kulturach pylnikowych i kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia.

Publikacja: Makowska Katarzyna, Oleszczuk Sylwia. 2014. Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Reports* 33: 385-392, DOI: 10.007/s00299-013-1543-x

Cel drugi zrealizowano poprzez opublikowanie artykułu przeglądowego na temat zjawiska albinizmu w androgenезie jęczmienia. Wyczerpująco zostały przedstawione odpowiednie badania cytologiczne oraz genetyczne dotyczące zarówno genomu plastydowego jak i genomu jądrowego. Omówiono różnice w rozwoju plastydów na poszczególnych etapach androgenезy skutkujących formowaniem się roślin zielonych i albinotycznych oraz przedstawiono dwie koncepcje dotyczące determinowania losu plastydów – na początkowych etapach androgenезy lub później, podczas regeneracji roślin. Zwrócono uwagę na różne rearanżacje w plastydomie roślin bezchlorofilowych oraz rolę genów jądrowych w zjawisku albinizmu regenerantów jęczmienia. Wskazano na perspektywę wykorzystania QTL powiązanych z albinizmem i odpowiednich markerów do wczesnej identyfikacji genotypów przydatnych w tworzeniu zielonych dihaploidów jęczmienia dla potrzeb programów hodowlanych. W pracy omówiono też działanie wybranych związków chemicznych dodawanych do pożywek i zmniejszających regenerację roślin bezchlorofilowych. Obecny stan wiedzy nie pozwala na pełne wyjaśnienie albinizmu w androgenезie jęczmienia i innych zbóż – autorki pracy stawiając pytania wskazują główne kierunki przyszłych badań.

Jeden z wątków omówionych w artykule przeglądowym Kandydatka podejmuje w kolejnym artykule wchodzącym w skład rozprawy.

Cel 3: Oszacowanie wpływu zwiększonej zawartości jonów miedzi na efektywność uzyskiwania zielonych roślin androgenicznych w kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia.

Publikacja: Makowska Katarzyna, Oleszczuk Sylwia, Zimny Janusz. 2017. The effect of copper on plant regeneration in barley microspore culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 53 (1): 17-22, DOI: 10.17221/82/2016-CJGPB

Autorzy sprawdzali możliwość modyfikacji pożywki polegającej na podwyższeniu stężenia jonów miedzi w kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia. Jest to jedna z metod stosowanych w androgenезie jęczmienia. Drugą metodą są kultury pylnikowe. Obie metody mają zalety, ale i ograniczenia, m. in. niską efektywność regeneracji roślin dla wielu genotypów. W kulturach pylnikowych *H. vulgare* udowodniono korzystny wpływ znacznego zwiększenia stężenia  $\text{Cu}^{2+}$  na wydajność regeneracji roślin i obniżenie poziomu albinizmu. Podobne badania dla kultur izolowanych mikrospor dotąd nie były prowadzone. Omawiana część rozprawy doktorskiej poświęcona jest więc

ocenie wpływu zwiększonego stężenia jonów miedzi w kulturach mikrospor na efektywność regeneracji roślin, w szczególności roślin zielonych. Uzyskane wyniki potwierdziły korzystny wpływ wyższego stężenia jonów miedzi na regenerację zarówno roślin zielonych jak i roślin bezchlorofilowych, przy czym proporcje regenerantów zielonych do albinotycznych nie uległy zmianie pod wpływem miedzi w obu testowanych genotypach. Wymieniona tu modyfikacja pożywki w kulturach mikrospor pozwoliła zwiększyć całkowitą regenerację roślin, ale nie ograniczyła zjawiska albinizmu. Wyniki wskazują również, że oba aspekty androgenезы jęczmienia – niska efektywność regeneracji roślin i wysoki poziom albinizmu regenerantów – są niezależne chociaż mogą współwystępować.

Cel 4: Zbadanie oddziaływania gumy arabskiej na wydajność androgenезы i regeneracji roślin w kulturach pylnikowych jęczmienia.

Publikacja: Makowska Katarzyna, Kałużniak Marta, Oleszczuk Sylwia, Zimny Janusz, Czaplicki Andrzej, Konieczny Robert. 2017. Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 131 (2): 247-257, DOI: 10.1007/s11240-017-1280-x

Założono, że guma arabska zawierająca białka arabinogalaktanowe (AGP) polepszy tworzenie struktur androgenicznych co pozytywnie wpłynie na efektywność regeneracji roślin zielonych w kulturach pylnikowych jęczmienia. Dla dwóch genotypów jęczmienia jarego sprawdzano wpływ suplementacji pożywki gumą arabską na poszczególne aspekty androgenезы. Obecność gumy arabskiej w płynie preinkubacyjnym i/lub w pożywce indukującej hamowała spadek żywotności mikrospor, przyspieszała ich pierwsze podziały i pojawianie się struktur wielokomórkowych. Kilkakrotnie zwiększała się też liczba androgenicznych struktur wielokomórkowych oraz dobrze uformowanych zarodków z tarczką, koleoptylem i merystemami wierzchołkowymi pędu i korzenia. Pod wpływem gumy arabskiej zwiększyła się efektywność regeneracji, głównie na skutek poprawy budowy zarodków androgenicznych – obecność merystemów zarodkowych i zawiązków liści ułatwiła prawidłową konwersję zarodków w rośliny. Stwierdzono jednak, że guma arabska w różnych wariantach kultury pylników nie ograniczała zjawiska albinizmu. Zatem również wyniki tej części rozprawy pokazują niezależność procesów związanych z regeneracją i zazielenianiem się roślin uzyskiwanych w androgenезы jęczmienia. Odczynnik Yariw'a (inhibitor aktywności AGP) w odpowiednim stężeniu znosił pozytywny wpływ gumy arabskiej na wydajność regeneracji, co wskazuje na działanie białek arabinogalaktanowych w procesach związanych z poprawą efektywności produkcji roślin androgenicznych.

Rozprawa doktorska Pani Katarzyny Makowskiej przedstawiona w formie zbioru czterech publikacji w spójny sposób przedstawia dwa zasadnicze problemy napotymane w androgenезы różnych genotypów jęczmienia: stosunkowo niską wydajność regeneracji roślin i duży odsetek uzyskiwanych roślin bezchlorofilowych, co bardzo ogranicza uzyskiwanie zielonych dihaploidów jęczmienia dla potrzeb hodowli. Kandydatka, wraz ze współautorami publikacji, podjęła próbę pokonania tych trudności poprzez porównanie zdolności do androgenезы wielu genotypów jęczmienia jarego i ozimego oraz wprowadzanie do pożywek dodatkowych składników ( $\text{Cu}^{2+}$ , białka

arabinogalaktanowe w gumie arabskiej), których pozytywny wpływ stwierdzono w innych systemach kultur in vitro. W ocenianej rozprawie ustalono kilka czynników poprawiających efektywność regeneracji androgenicznych roślin jęczmienia i stwierdzono niższy średni poziom albinizmu w grupie badanych genotypów ozimych w porównaniu z grupą genotypów jęczmienia jarego.

### **3. Ocena rozprawy doktorskiej**

Prawidłowo określony problem badawczy w zakresie podjętej tematyki rozprawy doktorskiej poprowadził Kandydatkę do jasnego postawienia hipotez i sprecyzowania celów swoich badań. Realizacja poszczególnych celów pracy przedstawiona została w czterech kolejnych publikacjach składających się na rozprawę. Trzy z nich prezentują wyniki badań własnych, a jedna to artykuł przeglądowy bezpośrednio związany z tematem rozprawy. Publikacje nie są prezentowane w porządku chronologicznym, ale zgodnie z postawionymi celami badań. Taki wybór uzasadniony jest charakterem poruszanych zagadnień. Obszerne zagadnienia dotyczące androgenetycznego potencjału ozimych i jarych genotypów jęczmienia oraz albinizmu zregenerowanych roślin ujęte w publikacjach nr 1 i nr 2 poprzedzają zagadnienia węższe (publikacje nr 3 i nr 4) związane z usprawnieniami kultur izolowanych mikrospor i kultur pylnikowych mogących poprawić efektywność regeneracji i obniżenie albinizmu androgenicznych roślin jęczmienia. Kandydatka, w mojej ocenie, uzyskała oryginalne wyniki o sporym znaczeniu naukowym w swoim obszarze badań. Potwierdzeniem tego jest fakt ich opublikowania w indeksowanych czasopismach, a łączne wskaźniki publikacji, na których opiera się rozprawa to współczynnik oddziaływania IF 7,188 oraz 105 pkt. MNiSW. Daleki jestem od opierania oceny jakiegokolwiek pracy naukowej tylko o wskaźniki naukometryczne. Dla mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Makowskiej ważne są przede wszystkim: poprawność metodyczna prowadzonych badań, wysoka wartość merytoryczna uzyskanych wyników i jasny sposób ich przedstawienia w publikacjach również na tle wyników znanych z innych doniesień naukowych.

Recenzowana rozprawa doktorska jest przykładem podejmowania ważnej i trudnej problematyki z zakresu eksperymentalnej embriologii roślin. W swojej rozprawie mgr Katarzyna Makowska przedstawia rzetelne i bardzo dobrze udokumentowane prace badawcze mające również znaczenie aplikacyjne dla hodowli jęczmienia. Rozprawa przedstawia zagadnienia znane już z innych prac nad jęczmieniem i innymi gatunkami zbóż, ale wyniki uzyskane przez Kandydatkę stanowią, moim zdaniem, wartościowe uzupełnienie o nowe dane przyczyniające się przezwyciężenia głównych trudności w androgenezie jęczmienia.

Publikacje stanowiące rozprawę zostały sprawdzone w odpowiednich redakcjach czasopism pod względem edytorskim i poprawności języka angielskiego, podlegały też recenzjom wydawniczym – w tym zakresie nie mam więc zastrzeżeń. Dodatkowy tekst w języku polskim oraz streszczenie w języku angielskim napisane zostały poprawnie i zauważyłem tylko kilka błędów literowych. Nieco kłopotliwe dla czytelnika jest ciągle stosowanie skrótów literowych w tekście. Skróty wymienione są w wykazie (brak jedynie objaśnienia skrótów KP i KIM ze str. 25), ale moim zdaniem dobrze byłoby

używać częściej pełnych określeń wymiennie ze skrótami. Dwie inne drobne uwagi dotyczą określeń ze str. 27 – „ultra cienkie preparaty” to raczej półcienkie skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$ , jak wynika z tekstu oryginalnej publikacji – oraz ze str. 32 gdzie wkradł się błąd automatycznego uzupełniania wyrazów w MS Word i z mikromacierzy powstały „mikromierze”.

Więszym problemem dla recenzenta jest jak potraktować obszerny przegląd literatury ze stron 8-22. Jako formę rozprawy przyjęto – jak określa ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym – formę „spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych [...]”. W takim przypadku rozprawa obejmuje też streszczenie i oświadczenia kandydata do stopnia doktora i współautorów publikacji wieloautorskich. Tekst na stronach 23-39 (V. *Problem badawczy i założenia pracy*, VI. *Wybór materiału badawczego*, VII. *Stosowana metodyka*, VIII. *Omówienie otrzymanych wyników dla każdej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej*, IX. *Podsumowanie wyników*, X. *Wnioski*) można potraktować jako uzupełnienie do streszczenia ponieważ treści tam zawarte odnoszą się bezpośrednio do treści czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy. Natomiast tekst IV. *Przegląd literatury* znacząco wykracza poza problematykę zawartą w publikacjach wchodzących w skład rozprawy i poza sam temat rozprawy – jest szerokim omówieniem zjawiska androgeny in vitro. Tylko w kilku akapitach na stronach 8, 15 i 19 można odnaleźć treści odpowiadające fragmentom tekstu poszczególnych publikacji zawartych w rozprawie. Zatem trudno uznać ten maszynopis (str. 8-22) za opublikowany, brak też informacji czy został przyjęty do druku, co umożliwiłoby włączenie go do zbioru publikacji. W związku z powyższym postanowiłem wyłączyć powyżej wskazany tekst spod oceny całości rozprawy. Oczywiście zapoznałem się z tym tekstem i nie stwierdziłem błędów merytorycznych.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości naukowej ocenianej rozprawy.

Jednym z wymogów, który powinna spełniać rozprawa doktorska jest wykazywanie ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata w danej dyscyplinie naukowej. Uważam, że treść artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy (wprowadzenia i dyskusje w publikacjach nr 1, 3 i 4 oraz cała publikacja przeglądowa nr 2) oraz oświadczenia kandydatki i współautorów publikacji znakomicie dowodzą, że Pani mgr Katarzyna Makowska dysponuje odpowiednim zakresem ogólnej wiedzy teoretycznej w zakresie biologii. Wiedza ta jest też sprawdzana podczas egzaminu doktorskiego i obrony rozprawy doktorskiej. Mimo wyłączenia *Przeglądu literatury* spod oceny, mogę stwierdzić na etapie oceny rozprawy, że Kandydatka ma odpowiednią teoretyczną wiedzę biologiczną.

Przesłana do oceny rozprawa doktorska obejmuje publikacje wieloautorskie, stanowi więc w świetle ustawy wyodrębnioną część pracy zbiorowej. W tym przypadku recenzent powinien mieć możliwość określenia indywidualnego wkładu kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy. Załączone w rozprawie oświadczenia o udziale Kandydatki i wszystkich współautorów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że Pani mgr Katarzyna Markowska – pierwsza i korespondencyjna autorka każdej z czterech załączonych publikacji – miała bezpośredni indywidualny udział w formułowaniu koncepcji badań, realizacji prac eksperymentalnych, opracowywaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu każdej z ww. publikacji. W mojej ocenie spełnienie wymogu ustawowego w tym względzie nie budzi wątpliwości.

Przedstawiona do oceny rozprawa pokazuje, że Kandydatka do stopnia doktora posiada dobrą znajomość podjętej problematyki oraz wykazała się umiejętnością organizowania i prowadzenia badań. Kilka poniższych kwestii warto byłoby jednak uzupełnić lub wyjaśnić podczas obrony rozprawy doktorskiej.

1. W pracy nr 1 poświęconej porównaniu form ozimych i jarych jęczmienia oraz w jej omówieniu (str.28) stwierdza się za cytowanymi autorami, że zboża ozime wykształciły w toku ewolucji cechy umożliwiające przystosowanie do warunków okresu zimowego. Czy wiadomo na ile ten proces następował w wyniku ewolucji przed udomowieniem gatunków dzikich, a na ile jest wynikiem selekcji przez człowieka w pierwotnym okresie udomowienia lub w późniejszych pracach hodowlanych? Jakie jest zdanie kandydatki w tej kwestii?
2. Dlaczego w publikacjach nr 3 i nr 4 dotyczących wpływu  $\text{Cu}^{2+}$  na regenerację w kulturach mikrospor oraz wpływu gumy arabskiej na regenerację w kulturach pylnikowych użyto dwóch genotypów jęczmienia jarego? W pracy nr 1 wykazano lepsze odpowiedzi androgeniczne dla grupy genotypów ozimych (średnie), ale linie NAD2 i NAD19 nie były w grupie badanych genotypów jarych. Czy linie te wykazują szczególne właściwości stwarzające szansę na zwiększenie efektywności androgenezy w hodowli jarych form jęczmienia?
3. Jaka jest optymalna metoda badania żywotności mikrospor lub pyłku dla jęczmienia? W pracy dotyczącej wpływu gumy arabskiej (nr 4) stosowano barwienie błękitem Evansa, a w pracy dotyczącej wpływu jonów miedzi (nr 3) żywotność oceniano bez barwienia na podstawie dwóch cech widocznych mikroskopowo – plazmolizy i objętości komórki (czy mierzono rzeczywiście objętość mikrospor?). Czy ta druga metoda daje wiarygodne wyniki? Na ile zależy to od nabytego doświadczenia obserwatora? Czy autofluorescencja sporodermi uniemożliwia u jęczmienia stosowanie reakcji fluorochromatycznej (FCR, FDA test)?
4. Korzystny wpływ arabinogalaktanów z gumy arabskiej (publikacja nr 4) zablokowano najwyższym ze stosowanych stężeń odczynnika Yari'va. Czy niższe stężenia tego odczynnika nie wysycyły wiązań z białkami arabinogalaktanowymi, czy też możliwe jest aby inne (niezidentyfikowane?) składniki gumy arabskiej oddziaływały na mikrospory i struktury wielokomórkowe podczas kultury *in vitro*?

Powyższe uwagi i pytania nie umniejszają wartości naukowej ocenianej rozprawy doktorskiej i powinny być traktowane jako przedmiot dyskusji naukowej.

#### **4. Podsumowanie i wniosek końcowy**

Mgr Katarzyna Makowska spełniła wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora w zakresie przygotowania rozprawy doktorskiej. Przedstawiła do oceny pracę naukową zawierającą oryginalne wyniki przyczyniające się do rozwiązania ważnego problemu naukowego oraz posiadające walor aplikacyjny. Wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań

naukowych w oparciu o posiadaną wiedzę teoretyczną i opanowanie odpowiedniego warsztatu metodycznego, a ponadto zdolnością pracy w zespole naukowym. Jej rozprawa doktorska przyczynia się do powiększenia stanu wiedzy dotyczącej procesu androgenezy w kulturach in vitro.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Makowskiej, pt. „Badanie wydajności androgenezy jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)” spełnia wymogi określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Kieruję do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Makowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

---

Poznań, dn. 15.02.2018 r.



prof. UAM dr hab. Rafał Mól