



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 06.01.2025

Dr hab. Marzena Popielarska-Konieczna, prof. UJ
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Instytut Botaniki, Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
+48 12 664 60 27
m.popielarska-konieczna@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Alicji Tomasiak
z tytułu:

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

**„Kompleksowa analiza epigenetyczna procesów reprogramowania
komórkowego w tkankach hodowanych *in vitro* oraz *in vivo* –
badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*”**

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem Pana Promotora dr hab. Alexandra Betekhtina, prof. uczelni oraz Pani Promotor pomocniczej dr Agnieszki Braszewskiej.

OCENA PRACY

Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze zbioru czterech artykułów naukowych wraz ze wspólnym opisem w języku polskim, który obejmuje (wg Spisu treści) następujące rozdziały: *Wstęp*, *Cel*, *hipotezy i zadania badawcze*, *Materiały i metody*, *Omówienie wyników przeprowadzonych badań* (zamieszczonych w poszczególnych artykułach), *Podsumowanie i wnioski*. Rozprawa jest uzupełniona o wykaz używanych skrótów, streszczenie w języku angielskim i polskim, spis cytowanej literatury, a także oświadczenia współautorów artykułów naukowych o ich wkładzie w powstanie poszczególnych publikacji. Wszystkie artykuły będące podstawą rozprawy są opublikowane w języku angielskim w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym (indeksowanych w najważniejszych bazach bibliometrycznych): *International Journal of Molecular Sciences* w roku 2022 (IF=5,6), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* w roku 2023 (IF=2.3), *Frontiers in Plant Science* w roku 2024 (IF=4,1) oraz *BMC Plant Biology* w roku 2024 (IF=4,3).

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Pierwsza publikacja to artykuł przeglądowy, który przedstawia dotychczasowe osiągnięcia w badaniach nad gatunkami *Fagopyrum* w kulturach *in vitro*. Kolejne trzy artykuły naukowe prezentują wyniki badań nad procesami epigenetycznymi, które zachodzą w zależności od typu rozwojowego w wybranych tkankach *Fagopyrum*. Wszystkie artykuły są wieloautorskie, dlatego istotne było określenie własnego wkładu Autorki rozprawy w powstanie danej pracy. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem lub (jak w przypadku czwartej publikacji) równorzędnym pierwszym Autorem, a jej indywidualny wkład polegał m.in. na przeglądzie literatury, optymalizacji i przeprowadzeniu eksperymentów, przeprowadzeniu analiz statystycznych, przygotowaniu początkowej i udziału w powstaniu końcowej wersji manuskryptów. Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania formalne.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Wartość naukowa rozprawy

Poznanie mechanizmów regulujących potencjał rozwojowy komórek roślinnych ma istotne znaczenie dla badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Jeden z czynników wpływających na reprogramowanie komórek to modyfikacje epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i histonów, czy też acetylacja histonów. Praca doktorska przedstawia badania nad korelacją modyfikacji epigenetycznych w zależności od potencjału rozwojowego wybranych tkanek gatunków z rodzaju *Fagopyrum*. Dostarcza nowych istotnych danych na temat roli modyfikacji epigenetycznych w przemianach rozwojowych roślin. W pracy analizowano zarówno zmiany molekularne na poziomie epigenetycznym zachodzące w tkankach poddanych kulturze *in vitro*, jak i te w warunkach *in planta*.

Część merytoryczna rozprawy obejmuje cztery publikacje naukowe (oznaczone jako P1, P2, P3 oraz P4) wymienione w rozdziale 1 zatytułowanym *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*. *Streszczenie* w języku angielskim i polskim przybliży najważniejsze osiągnięcia w publikacjach P2, P3 oraz P4, natomiast brakuje tu nawiązania do publikacji P1. Kolejny rozdział, *Wstęp* wprowadza w tematykę rozprawy. Następnie Doktorantka formułuje *Cele i hipotezy badawcze*. W kolejnym rozdziale *Materiały i metody* są zebrane informacje o materiale roślinnym i technikach zastosowanych w publikacjach P2, P3 oraz P4. Najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w rozdziale *Omówienie wyników przeprowadzonych badań*, stanowiącym właściwą część rozprawy. Rozdział ten został podzielony na dwa podrozdziały, z których pierwszy zatytułowany *Omówienie badań przeprowadzonych in vitro* przybliży publikacje P1,

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

P2 oraz P3, natomiast drugi *Omówienie badań przeprowadzonych in vivo* – publikację P4. Kolejny rozdział to *Podsumowanie i wnioski*. Część merytoryczną kończy spis *Literatury* (obejmujący ponad 90 pozycji) i *Uzupełnienie*, które pominięto w *Spisie treści*.

We *Wstępie* Autorka przybliży zagadnienie zmian losu komórek roślinnych, szczególnie w kulturach *in vitro*, wymienia i charakteryzuje typy modyfikacji epigenetycznych. Doktorantka opisuje i uzasadnia wybór materiału badawczego, czyli kalusa i kwiatów gryki zwyczajnej, *Fagopyrum esculentum* oraz gryki tatarskiej, *Fagopyrum tataricum*. Kalus wyprowadzony z zarodków zygotycznych gryki zwyczajnej wykazuje potencjał embriogenny. Natomiast w przypadku gryki tatarskiej, w tych samych warunkach kultury z izolowanych zarodków zygotycznych powstaje kalus morfogeny, a na jego powierzchni sporadycznie kalus niemorfogeny. Ponadto gryka zwyczajna jest gatunkiem obcopolnym wytwarzającym dwa typy kwiatów (Pin z długim słupkiem i krótszymi pręcikami, oraz Thrum z krótszym słupkiem i dłuższymi pręcikami). Natomiast gryka tatarska to gatunek samopolny o jednym typie morfologicznym kwiatów.

Wydawać się może, i taka też była moja pierwsza refleksja, że rozprawa doktorska złożona z badań nad tak zupełnie odrębnymi tkankami i strukturami, jakimi są kalus (indukowany i utrzymywany przez wiele lat w warunkach *in vitro*) oraz kwiaty (rozwijające się *in planta*) to duże wyzwanie. Jednak klamrą spinającą jest nieprzypadkowy wybór gatunków oraz zagadnienie wpływu modyfikacji epigenetycznych na procesy rozwojowe, dotyczące zarówno tkanek w warunkach *in vitro*, jak i *in planta*.

W Rozdziale 6 (nieprawidłowo zatytułowanym w *Spisie treści* jako *Cel, hipotezy i zadania badawcze*) Doktorantka wyznacza cztery cele badawcze (które staną się potem tytułami wprowadzeń do poprzedzających je publikacji) oraz formułuje trzy hipotezy badawcze.

W publikacji P1 Autorka przedstawia szczegółowo dotychczasowe osiągnięcia nad gatunkami z rodzaju *Fagopyrum* z wykorzystaniem roślinnych kultur tkankowych. W publikacji P1 dużo uwagi poświęcono indukcji i charakterystyce kalusa, a zebrane tu informacje były szczególnie cenne dla kolejnych etapów pracy Doktorantki. Wśród wielu prac Doktorantka cytuje także publikacje Zespołu, z którym współpracuje. Warto nadmienić, że badania Zespołu, w tym Promotora dr hab. Alexandra Betekhtina, prof. uczelni, od wielu lat skupiają się na procesach indukcji

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

i różnicowania kalusa w rodzaju *Fagopyrum*, a artykuły są rozpoznawalne i doceniane na arenie międzynarodowej.

Analiza zmian w metylacji DNA oraz modyfikacji histonów w kalusie *F. esculentum* i *F. tataricum* o różnym stopniu morfogenezy to przedmiot publikacji P2. W pierwszej części publikacji Doktorantka szczegółowo charakteryzuje morfologię i histologię typów kalusa o różnym potencjale rozwojowym (kalus embriogeny u *F. esculentum*, oraz morfogeny i niemorfogeny u *F. tataricum*). Kolejny etap to analiza globalnych zmian w poziomach modyfikacji epigenetycznych w wymienionych typach kalusa, w odniesieniu do wybranych dni po pasażu na świeżą pożywkę. Doktorantka wykazała charakterystyczne wzorce cyklicznych wzrostów i spadków metylacji DNA oraz metylacji i acetylacji histonów w zależności od typu kalusa i jego odróżnicowania i ponownego różnicowania.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Badania zaprezentowane w publikacji P3 są logiczną kontynuacją poprzedniego artykułu. Opierając się na wynikach uzyskanych w publikacji P2, Doktorantka wybrała jako obiekt kalus morfo- i niemorfogeny *F. tataricum*, w którym przeprowadziła analizę poziomu konkretnej modyfikacji epigenetycznej, a mianowicie trimetylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me3), pomiędzy 2 a 6 dniem pasażu. W pracy Doktorantka wykorzystwała (po raz pierwszy dla tkanek gatunku *Fagopyrum*) zaawansowaną metodę sekwencjonowania ChIP (*chromatin immunoprecipitation-sequencing*), która umożliwiła porównanie genomowej zawartości ww. modyfikacji w kalusie morfo- i niemorfogenym. Analizy bioinformatyczne pozwoliły wyłonić geny, których rejony promotorowe i startu transkrypcji wskazywały na zależność ekspresji tych genów od wspomnianej modyfikacji H3K4me3. Wśród licznych wyselekcjonowanych genów skupiono się na genach związanych z biosyntezą i modyfikacjami składu ściany komórkowej. Ponadto badania zostały uzupełnione o analizy immunocytochemiczne ściany komórkowej z użyciem wybranych przeciwciał przeciwko epitopom pektyn i ekstensyn.

Publikacja 4 dotyczy zmian w poziomie modyfikacji epigenetycznych, a dokładnie metylacji DNA w zamkniętych i otwartych kwiatach dwóch gatunków *Fagopyrum*. Jak już wspomniano wcześniej, gryka zwyczajna jest gatunkiem obcopolnym z dwoma typami kwiatów (Pin oraz Thrum). Natomiast gryka tatarska to gatunek samopolny o jednym typie morfologicznym kwiatów. W obrębie poszczególnych typów kwiatów badano: płatki, znamię, załącznię z załączkami oraz nektarniki. Oprócz

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



poziomu metylacji DNA analizowano poziom ekspresji genów związanych z metylacją i demetylacją. Wyraźnie wyższy poziom metylacji DNA i ekspresji badanych genów odnotowano w kwiatach zamkniętych.

W rozprawie brakuje typowej dyskusji uzyskanych wyników na tle dostępnej literatury. Oczywiście wnikliwa dyskusja jest przeprowadzona w samych publikacjach P2, P3 i P4, jednak jej brak w rozprawie budzi niedosyt. W rozdziale *Podsumowanie i wnioski* Doktorantka odnosi się do postawionych hipotez i formułuje najważniejsze wnioski. W mojej opinii rozdział ten byłby bardziej czytelny, gdyby Doktorantka zamiast dzielić wnioski „na podstawie warunków hodowli”, wypunktowała najważniejsze wyniki oraz wnioski i skonfrontowała je z hipotezami i celami pracy. Ponadto warto uzupełnić ten rozdział o sekcję dotyczącą perspektyw dalszych badań.

Lektura rozprawy skłoniła mnie do sformułowania następujących pytań pod adresem Doktorantki:

1) Przedstawione badania są bardzo obszerne, tym bardziej, że obejmują nie tylko analizy molekularne, ale i morfologiczne oraz histologiczne. Szczególnie intrygujące są cykliczne zmiany jakim podlega kalus morfogeny i niemorfogeny gryki tataraki, a czego dotyczą publikacje P2 oraz P3. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować model (w postaci grafiki), który by obrazował zakładane korelacje między typem i stopniem rozwojowym kalusa (morfologia, histologia, obecność epitopów ściany komórkowej), a poziomem modyfikacji epigenetycznych, z uwzględnieniem najważniejszych ram czasowych pasażu?

2) Badania nad mechanizmami epigenetycznymi u roślin wskazują na ich istotną rolę w reprogramowaniu komórki, jako wyraz adaptacji do warunków środowiska, a modyfikacje epigenetyczne mogą być utrwalone i przekazywane kolejnym pokoleniom na drodze rozmnażania płciowego. Czy Doktorantka może podać przykład opublikowanych badań eksperymentalnych, które potwierdzają to założenie?

Uwagi krytyczne

Zastanawia mnie wybór tytułu rozprawy, a dokładnie jej fragment dotyczący „tkanek hodowanych *in vivo*”. Proponowałabym raczej tytuł: „Kompleksowa analiza epigenetyczna procesów reprogramowania komórkowego w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* – badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*”, lub: „Kompleksowa analiza



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

epigenetyczna procesów reprogramowania komórkowego *in planta* oraz w tkankach hodowanych *in vitro* – badania porównawcze gatunków *Fagopyrum*”.

Mam uwagę do *Schematu 1*, prezentowanego we *Wstępie*, który (wg zamieszczonej w legendzie informacji) jest zgodny z publikacją Fehér (2019) i zmodyfikowany. Niestety, Doktorantka nie uwzględniła fragmentu schematu, który w oryginale znajduje się w jego górnej części, a wskazuje na wzrost lub spadek potencjału rozwojowego różnych linii rozwojowych komórek roślinnych. W mojej opinii ten brakujący element schematu pozwala czytelnikowi lepiej zapoznać się z problemem obniżania lub wzrostu potencjału rozwojowego.

Wydział Biologii

Uważam także, że umieszczenie publikacji P1 w rozdziale *Omówienie wyników badań przeprowadzonych in vitro*, nie jest zasadne. Publikacja P1 to praca przeglądowa i jako taka powinna zajmować raczej osobną sekcję. Można sobie również zadać pytanie, czy w ogóle jest konieczne wyodrębnienie podrozdziałów *Omówienie badań przeprowadzonych in vitro* oraz *Omówienie badań przeprowadzonych in vivo*? W mojej opinii w Rozdziale 8 zatytułowanym *Omówienie wyników przeprowadzonych badań* zaproponowane przez Doktorantkę cele badawcze jako tytuły wprowadzeń do poprzedzających je poszczególnych publikacji są w zupełności wystarczające.

Instytut Botaniki

Powyższe uwagi, bardziej dotyczące kwestii redakcyjnych, nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Ocena końcowa:

W mojej opinii rozprawa Pani mgr Alicji Tomasiak stanowi ważny wkład naukowy w badania nad modyfikacjami epigenetycznymi, które towarzyszą zmianom rozwojowym w komórkach roślinnych. Przedstawione badania są obszerne, a zastosowane liczne zaawansowane techniki i uzyskane wyniki są wysokiej jakości i na międzynarodowym poziomie, czego dowodem jest ich opublikowanie w czasopiśmie naukowym z listy JCR. Niewątpliwym atutem prezentowanej rozprawy jest fakt, że jej wyniki zachęcają do dalszych doświadczeń nad poznaniem mechanizmów modyfikacji epigenetycznych i ich korelacji ze zmianami rozwojowymi, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, a także wykorzystania ich w praktyce. Ponadto, za najważniejsze osiągnięcia rozprawy uważam:

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

- 1) Wykazanie, że odróżnicowanie zarówno komórek kalusa morfogenego *F. esculentum*, jak i kalusa embriogenego *F. tataricum* jest związane z obniżeniem di- i trimetylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me2, H3K4me3).
- 2) Wykazanie, że różnicowanie komórek w kalusie *F. tataricum* i nabywanie przez nie kompetencji morfogennych jest skorelowane z obniżonym poziomem metylacji DNA.
- 3) Wykazanie roli modyfikacji H3K4me3 w aktywacji badanych genów związanych z biosyntezą i modyfikacją ścian komórkowych podczas procesów morfogenezy w kalusie *F. tataricum*.
- 4) Wykazanie, że globalny poziom trimetylacji histonu H3 na lizynie 4 (H3K4me3) wzrasta w kalusie *F. tataricum* wraz ze wzrostem potencjału do odróżnicowania komórek.
- 5) Wykazanie, że metylacja DNA jest zaangażowana w rozwój kwiatów u gryki tatarskiej oraz kwiatów typu Pin i Trhum u gryki zwyczajnej.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Tomasiak *spełnia warunki* określone w art. 187 ustawy 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Alicji Tomasiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, z uwagi na wysoką jakość pracy oraz jej potencjał badawczy, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Tomasiak.

Marzena Popielarska-Konieczna

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl