

dr hab. Ewa Dubas

Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* PAN w Krakowie

ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

Recenzja osiągnięć naukowych, organizacyjnych i dydaktycznych

dr Teresy Hazubskiej-Przybył w ramach prowadzonego postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie nauki leśne

I. Dane ogólne. Przedstawienie podstawowych danych o kandydacie.

Dr Teresa Hazubska-Przybył jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu *im. A. Mickiewicza* w Poznaniu. Studia ukończyła w 1998 r., otrzymując stopień magistra na podstawie pracy pt. „Stan roślinności fragmentu lewobrzeżnej doliny Warty przy północnym przedmieściu Puszczykowa”. Pracę magisterską wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Janiny Borysiak.

Pracę doktorską pt. „Mikrorozmnażanie wybranych gatunków świerka (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* ‘Glauca’, *P. breweriana*) metodą somatycznej embriogenezy” wykonała pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Krystyny Bojarczuk i obroniła w 2005 roku w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku.

Aktualnie jest zatrudniona na etacie adiunkta w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku. Wcześniej była zatrudniona na etacie biologa (2006-2018) i młodszego technika dokumentalisty (1998-2001) w tym samym Instytucie. Nie występowała wcześniej o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

II. Główne osiągnięcia naukowe pt. „Somatyczna embriogeneza i kriokonserwacja kultur embriogennych *P. omorika* (Pančič) Purk. i *Picea abies* (L.) H. Karst. przy zastosowaniu metody stopniowej dehydratacji”.

Na osiągnięcie naukowe składa się pięć publikacji, które dotyczą: 1) optymalizacji metod inicjacji somatycznej embriogenezy i kriokonserwacji zarodków somatycznych, 2) identyfikacji podłoża fizjologicznego procesu somatycznej embriogenezy oraz 3) wrażliwości na stresy środowiskowe przy zmieniającym się klimacie z wykorzystaniem modelu *in vitro* dwóch ważnych gatunków drzew iglastych o walorach użytkowych i dekoracyjnych. Osiągnięcie ma dwa wymiary obejmujące badania podstawowe (kierunek: fizjologiczne podstawy biologii drzew) i aplikacyjne (kierunek: biotechnologia, leśnictwo, ekologia).

Publikacje pochodzą z dekady 2010-2020. Habilitantka jest pierwszym autorem we wszystkich wieloautorskich pracach wchodzących w skład osiągnięcia.

We wszystkich pracach dr Teresa Hazubska-Przybył pełniła istotną rolę. Habilitantka była autorką lub współautorką koncepcji badań, koordynowała pracami zespołów na wszystkich etapach (planowania/współplanowania metodologii, realizacji części eksperymentalnej na namnożonym w warunkach *in vitro* materiale, analizy i opracowywania wyników, przeglądu literatury w tematyce badawczej, przygotowywania/współprzygotowywania manuskryptów i redakcji tworzonych artykułów naukowych poprzedzonej krytyczną rewizją współautorów). Potwierdzeniem ww. wkładu merytorycznego oraz wykonawczego są oświadczenia współautorów. W czterech, z pięciu, wybranych do osiągnięcia pracach współautorem jest Pani prof. dr hab. Krystyna Bojarczuk promotorka pracy doktorskiej Habilitantki, której każdorazowy udział obejmował krytyczną ocenę tekstów manuskryptów przed złożeniem do redakcji danego czasopisma.

Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego to oryginalne, recenzowane prace twórcze, opublikowane w czasopismach anglojęzycznych (*Dendrobiology, International Journal of Molecular Sciences, Acta Physiologiae Plantarum, Plant Cell, Tissue and Organ Culture*), punktowanych przez MEiN₂₀₂₁ (70 - 100 pkt), z IF_{5-letni} w zakresie 1,305 - 6,132. Łączna liczba punktów za prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wynosi 510 (MEiN₂₀₂₁) a sumaryczny IF_{5-letni} = 15,608.

Z formalnego punktu widzenia osiągnięcie naukowe pt. „Somatyczna embriogeneza i kriokonserwacja kultur embriogennych *P. omorika* (Pančić) Purk. i *Picea abies* (L.) H.Karst. przy zastosowaniu metody stopniowej dehydratacji” nie budzi zastrzeżeń. Badania są spójne i kontynuowane od obrony rozprawy doktorskiej.

Z merytorycznego punktu widzenia zaprezentowane do recenzji osiągnięcie naukowe jest wartościowym potwierdzeniem możliwości praktycznego wykorzystania metody somatycznej embriogenezy jako alternatywnego sposobu wegetatywnego rozmnażania dwóch, ważnych gospodarczo gatunków drzew iglastych.

Zarówno hipotezy, cele jak i obiekt badań zostały wybrane nieprzypadkowo i znajdują się w nurcie światowych badań nad tworzeniem m.in. banków klonów elitarnych linii drzew, które znajdują zastosowanie w gospodarce leśnej i w przemyśle, w tym budowlanym.

Rośliny modelowe wybrane do badań należą do rodziny sosnowatych (Pinaceae). Somatyczną embriogenezę (SE) gatunków w tej rodzinie iglastych opisali w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku badacze ze Szwecji (Hakman i von Arnold, 1985) i dawnej Czechosłowacji (Chalupa, 1985). Embriogenny kalus został wyprodukowany z niedojrzałych zarodków zygocycznych *Picea abies* otoczonych megagametofitem (przyszłym prabielmem), których

kulturę prowadzono na zdefiniowanym eksperymentalnie podłożu *in vitro*. SE u świerka serbskiego opisano na przełomie lat dziewięćdziesiątych XX wieku (Budimir i Vujičić, 1992; Kolevska-Pletikapić i in., 1995; Salopek i in., 1997; Tramišak-Milaković i in., 1999) i na początku XXI wieku (Leljak-Levanić i in., 2009).

Wadą wykorzystania niedojrzałych zarodków zygotycznych jest to, że są one dostępne tylko w krótkim okresie w roku, dlatego pożądane jest opracowanie metod dla starszych stadiów rozwoju zarodków. W miarę rozwoju metod badawczych uzyskiwano nowe dane dotyczące indukcji SE i kultury zarodków różnych gatunków tej rodziny. Dzięki optymalizacji warunków *in vitro* dedykowanych do danego stadium rozwojowego zarodka zygotycznego (eksplantatu) danego gatunku, uzyskiwano coraz lepszą wydajność uzyskiwania zarodków somatycznych z potencjałem do regeneracji. Do dalszego postępu przyczyniło się zastosowanie kriokonserwacji, jako metody pozwalającej na długotrwałe przechowywanie pozyskanych z kultur *in vitro* młodych kalusów embriogennych i zarodków somatycznych, które po rozmrożeniu cechuje wigor oraz potencjał do rozwoju i regeneracji stabilnych genetycznie siewek.

Habilitantka włączyła się w nurt badań nad SE u gatunków Pinaceae od roku 1998, kiedy to rozpoczęła pracę w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku.

Habilitantka podjęła się prowadzenia badań nad dalszą optymalizacją protokołów efektywnej SE, które można zastosować zarówno do ratowania gatunków endemicznych i reliktowych, jak i do wegetatywnego rozmnażania genotypów ważnych ekonomicznie i ekologicznie gatunków drzew.

Habilitantka przyjęła następujące główne założenia (hipotezy) badawcze:

- „- kombinacje regulatorów wzrostu (auksyny:cytokinina) determinują poziom indukcji somatycznej embriogenezy, późniejszy rozwój i jakość somatycznych zarodków oraz siewek obu gatunków świerka,
- peroksydaza gwajakolowa będzie wykazywała niską aktywność podczas indukcji i namnażania tkanek embriogennych obu gatunków świerka, w obecności określonych regulatorów wzrostu,
- warunki hodowli, zastosowane podczas dojrzewania somatycznych zarodków, będą miały podobny wpływ na ich rozwój oraz zdolność do kiełkowania u obu gatunków świerka,
- stopniowe odwodnienie tkanki embriogennej *Picea* spp. pozwoli na efektywne przechowanie tkanek w ciekłym azocie,

- tkanka embriogenna świerka pospolitego będzie wykazywała stabilność genetyczną po jej kriokonserwacji, opartej na stopniowym odwadnianiu tkanki.”

W badaniach, przedstawionych jako główne osiągnięcie badawcze, Habilitantka wykorzystwała dwa gatunki *Picea*: *P. omorika* (Pančić) Purk. i *P. abies* (L.). *P. abies* jest wykorzystywany jako gatunek modelowy w badaniach nad mechanizmem indukcji SE u drzew iglastych.

Praca badawcza była nakierowana na optymalizację protokołów SE i kriokonserwacji metodą witrifikacji oraz poznanie fizjologicznych mechanizmów regulujących indukcję SE, późniejszy rozwój i jakość somatycznych zarodków. W pracy przedstawiono szczegółowe uwarunkowania SE, rozważając przede wszystkim rolę hormonów i aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych.

W **pierwszej pracy** pt. „Growth regulators and guaiacol peroxidase activity during the induction phase of somatic embryogenesis in *Picea* species” (*Dendrobiology* 69: 77-86; 2013) zbadano wpływ rodzaju eksplantatu (zarodki zygocytne vs kalus embriogenny vs kalus nieembriogenny), warunków (różne kombinacje hormonów w różnych stężeniach) i długości (1-21 dni) trwania kultury *in vitro* na aktywność peroksydazy gwajakolowej (EC 1.11.1.7). W podsumowaniu pracy zaproponowano oznaczanie peroksydazy gwajakolowej jako biochemicznego markera indukcji SE. Wniosek ten oparto o wysoką aktywność peroksydazy gwajakolowej w będących w fazie inicjalnej 8-tygodniowych kalusach (kalus nie-/embriogenny). Badania sfinansowane z grantu NCN (N N309 130837) oraz z subwencji MEiN dla Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku na badania statutowe. Część wyników z tej pracy włączono w autoreferatu, w którym w części poświęconej opisowi uzyskanych wyników Habilitantka niepoprawnie wnioskuje o uwarunkowanym genotypowo wpływie hormonów na przyrost masy kalusa. Zwracam uwagę, że z opracowanych statystycznie danych w publikacji (Fig. 8) wynika, że z badanych auksyn, to Picloram (9 μ M) stymulował przyrost kalusa u *P. omorika* w trakcie 21 dniach kultury *in vitro*. Stężenie cytokininy (6-benzyloadeniny, BA) nie miało istotnego wpływu na ten efekt. Błąd dotyczy także wnioskowania w innej części autoreferatu: „Wykazanie zmiennej aktywności peroksydazy gwajakolowej podczas indukcji i namnażania tkanek embriogennych obu gatunków świerka w obecności określonych regulatorów wzrostu”. Przyczyna błędnej interpretacji może tkwić między innymi w istocie wnioskowania. Do uzasadnienia konkluzji potrzebne są liczne przesłanki.

Uwagi: Wytwarzane reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają istotną rolę w mechanizmie indukcji procesu somatycznej embriogenezy. Nadmierne nagromadzenie się RFT (w tym

nadtlenku wodoru (H_2O_2)) jest niekorzystne i może inicjować stres tlenowy, prowadzący w konsekwencji nawet do obumierania komórek. W odpowiedzi na stres uruchomiona zostaje obrona antyoksydacyjna, w tym enzymatyczna. W zachowaniu tzw. homeostazy redoks istotną rolę odgrywają liczne enzymy antyoksydacyjne, w tym m. in. katalaza, dysmutazy ponadtlenkowe i peroksydazy. Peroksydazy, działając na szeroki zakres substratów, współdziałają z katalazami w usuwaniu H_2O_2 z komórek, przy jednoczesnym utlenianiu różnych substancji organicznych i nieorganicznych. Znajdująca się w ścianie komórkowej, cytozolu, wakuoli oraz w przestrzeni międzykomórkowej peroksydaza gwajakolowa (EC 1.11.1.7) bierze udział w procesach wzrostu i rozwoju oraz w obronie przed patogenami, lignifikacji oraz biosyntezie etylenu. Wybranie do badań, przez Habilitantkę, tylko jednego enzymu (peroksydazy gwajakolowej) jest ryzykowne ze względu na brak szerszego spojrzenia na procesy antyoksydacyjne.

Jedna przesłanka nie wystarcza, by wyraźnie wskazać wniosek. W konsekwencji działania czynników stresowych, począwszy od izolacji zarodków zygotycznych, sterylizacji materiału w H_2O_2 po suplementy pożywki hodowlanej, w tym $CaCl_2$ (indukującym utlenianie gwajakolu) czy auksyny (regulują stężenie H_2O_2), długością prowadzenia kultury *in vitro* i wiekiem eksplantatu, dochodzi do zaburzenia równowagi oksydo-redukcyjnej. Nadmierna produkcja RFT oraz niewydolność antyoksydacyjna jest stresem oksydacyjnym, który prowadzi do utleniania białek, co powoduje modyfikację ich struktury i zaburzenie funkcji. W literaturze opisywana jest zależność stężenia H_2O_2 od aktywności peroksydazy gwajakolowej. Wysoka aktywność peroksydazy zależnej od gwajakolu w 8-tygodniowych kalusach może korelować z obniżonym stężeniem H_2O_2 . Jednocześnie wzrost aktywności peroksydazy gwajakolowej następuje, gdy pojawiają się czynniki stresowe i dochodzi do nadprodukcji RFT. Rodzaj zastosowanych w pożywce auksyn (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D); kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy (picloram); kwas naftylo-1-octowy (NAA)) oraz cytokinin (N^6 -benzyloadenina BA) wpływa na natężenie stresu, ilość generowanych RFT i w konsekwencji na zmianę aktywności peroksydazy gwajakolowej w embriogennych komórkach kalusa. Manipulacja egzogennymi regulatorami wzrostu (auksyny:cytokininy) w warunkach *in vitro* wpływa na wewnątrz- i międzykomórkowe przestrzenne i czasowe rozmieszczenie RFT (w tym H_2O_2) i endogennych fitohormonów w proliferujących embriogennych komórkach kalusa.

W **drugiej pracy** pt. „Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species” (*Int J Mol Sci* 21(9): 3394; 2020) scharakteryzowano fizjologiczną reakcję zarodków somatycznych (zarodków SE) w indukowanych regulatorami wzrostu (PGR) kulturach *in vitro* dwóch gatunków *Picea*. Badania sfinansowane z subwencji MEiN dla Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku na badania statutowe.

Do oceny hormonalnej regulacji rozwoju zarodka wykorzystano analogiczny do zastosowanego w pierwszej pracy, układ eksperymentalny zawężony do czterech egzogennie stosowanych syntetycznych regulatorów wzrostu (auksyn i cytokinin w stosunku stężeń odpowiednio 9 μM i 4,5 μM ; auksyny::cytokininy 2::1). Zastosowane w eksperymencie auksyny inicjowały rozwój kalusa, proliferację komórek w embriogennym kalusie. Przewaga auksyn nad cytokininami w kulturach *in vitro* u *Picea* indukowała powstawanie zarodków SE. Różnice w efektywności indukcji SE zależały od uwarunkowań genetycznych (gatunek, genotyp) i fizjologicznych (faza rozwojowa eksplantatu, długość trwania kultury). Zaobserwowano wpływ proporcji auksyn w stosunku do cytokinin na późniejsze etapy, w tym na jakość zarodków SE z potencjałem do kiełkowania i prawidłowej konwersji w rośliny. Postawiono tezę, że aktywność fizjologiczna eksplantatu w procesie somatycznej embriogenezy jest stymulowana przez auksyny, przy czym reakcja jest zależna od rodzaju zastosowanych w pożywce auksyn, od rodzaju eksplantatu i rośliny donorowej. W podsumowaniu zaproponowano udział H_2O_2 jako cząsteczki sygnałnej w inicjacji proliferacji kalusa embriogennego u obu badanych gatunków świerków.

Część wyników z tej pracy włączono do autoreferatu, w którym w części poświęconej opisowi uzyskanych wyników Habilitantka napisała: „Z przeprowadzonych badań wynika, że eksplantaty *P. abies* mogą być bardziej podatne na działanie Pikloramu, który znacznie rzadziej stosuje się do zaindukowania somatycznej embriogenezy u gatunków drzew iglastych w porównaniu z powszechnie stosowanym 2,4-D, co uzasadniałoby zastosowanie tej auksyny do indukcji embriogenezy somatycznej u tego gatunku świerka”.

Uwagi: Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych zespołów i potwierdzają tezę, że hormony, zwłaszcza auksyny, inicjują przeprogramowanie, wpływając na końcową efektywność inicjacji SE poprzez modyfikacje chromatyny i aktywację określonych czynników będącymi aktywatorami lub represorami transkrypcji. Spośród zastosowanych przez Habilitantkę w pożywce auksyn (2,4-D, NAA, Picloram) jedynie Picloram istotnie regulował stężenie H_2O_2 i aktywność peroksydazy gwajakolowej w embriogennych komórkach kalusa. W przypadku Picloramu oraz 2,4-D zaobserwowano poprawę efektywności

uzyskiwania struktur proembriogennych (PET) u *P. abies*. Dla porównania u *P. omorica* najlepszą efektywność uzyskano na pożywkach suplementowanych NAA.

Trudno zgodzić się z przyjętą przez Habilitantkę w publikacji interpretacją opracowanych statystycznie wyników dotyczących „roli NAA w obniżaniu natężenia stresu oksydacyjnego u linii embriogennych”. Brak jest bowiem istotnych różnic statystycznych w stężeniu H₂O₂ w embriogennym kalusie *P. abies* na pożywkach z dodatkiem NAA a traktowaniami z 2,4-D lub picloramem. Błędna interpretacja wyników pokutuje w dyskusji i wnioskach. Habilitantka pisze w publikacji: „produkcja H₂O₂ była najwyższa w przypadku zastosowania w pożywce 2,4-D, chociaż uzyskane różnice były istotne statystycznie tylko dla ET u *P. abies*. Oznacza to, że ET *P. abies* są bardziej wrażliwe od ET *P. omorika* na dodawane do pożywki auksyny. Może to sugerować, że stres oksydacyjny ograniczał wzrost kultur *P. abies*. Podobną tendencję zaobserwowano w ET *P. omorika* na pożywkach z 2,4-D.”

Na podstawie przedstawionych w pracy wyników, zgodzić się można z twierdzeniem, że dodatek NAA w pożywce stymulował prawidłową konwersję zarodków somatycznych u *P. abies*. W efekcie powstałe zarodki charakteryzowały się prawidłowo wykształconą osią pędowo-korzeniową. Zgodzić się można z Habilitantką, że NAA korzystnie wpływa na zdolność namnażania kalusa *P. omorica* w kulturze *in vitro* przez okres dłuższy niż rok (40 pasaży).

Jest to jedna z trzech publikacji Habilitantki (2008; 2013; 2020), w której badany jest wpływ trzech syntetycznych auksyn (2,4-D, NAA i pikloramu) na indukcję SE u *P. abies* i *P. omorica*. Uzyskane wyniki są zgodne w każdej z prac.

Ponieważ część wyników, np. dotyczących zastosowania BA, jest opisana w osiągnięciu, to można dodać, że u obu gatunków świerka badania nad wpływem BA w kulturach SE prowadzone były przez Habilitantkę wcześniej w zespole Szczygieł i wsp. (2007). Różnica obejmuje zastosowanie przez Habilitantkę wyższego o 0,1 μM stężenia BA w konfiguracji z 2,4-D o stężeniu 9 μM.

Od dawna wiadomo, że zarówno auksyny, jak i cytokininy działając synergistycznie lub antagonistycznie, kontrolują kilka istotnych procesów rozwojowych, w tym tworzenie merystemów. Skoro wiedza ta jest powszechna, czy uzasadnionym jest podkreślenie w autoreferacie: „ (...) wykazano po raz pierwszy [2], że zastosowane egzogenne auksyny znacząco wpływały na rozwój hipokotyli i korzonka zarodkowego u obu gatunków świerka podczas kiełkowania somatycznych zarodków”?

W trzeciej pracy pt. „Effects of abscisic acid and osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos” (APP 38: 59; 2016) opisano wpływ kwasu abscyzynowego (ABA), sacharozy oraz Phytagelu na wzrost, rozwój i zawartość skrobi w zarodkach SE *P. abies* i *P. omorika* na etapie konwersji w rośliny. Badania sfinansowane z grantu NCN (N N309 130837).

W pożywce zastosowano rozbudowany układ eksperymentalny: ABA w czterech stężeniach (10, 20, 40 i 80 μM), sacharozę w trzech stężeniach i Phytagel (4, 6 i 8 g/L). Zastosowane substancje regulowały w kalusach embriogennych i zarodkach somatycznych wykorzystanie z pożywki wody (sacharoza, Phytagel) oraz odkładanie skrobi (ABA). Zarodki w czasie konwersji wykorzystywały sacharozę jako źródło węgla organicznego. Wysokie stężenie sacharozy (68 g/L) oraz Phytagelu (6 g/L) były wykorzystane, poprzez podwyższenie potencjału osmotycznego, do stymulacji wzrostu korzenia zarodkowego (radikuli). ABA dodatkowo przyspieszał dojrzewanie prawidłowo wykształconych zarodków SE *P. abies* i *P. omorika*. W zarodkach *P. abies* było więcej skrobi niż w zarodkach *P. omorika*.

Część wyników z tej pracy włączono w autoreferatu, w którym w części poświęconej opisowi uzyskanych wyników Habilitantka pisze: „Po raz pierwszy wykazano wpływ ABA i dostępu wody w pożywce na schemat akumulacji jednego z materiałów zapasowych – skrobi, podczas rozwoju somatycznych zarodków świerka pospolitego i serbskiego” oraz stwierdza: „(...) Przykładowo 5-tygodniowe zarodki *P. omorika*, dojrzewające w obecności wyższych stężeń ABA (40 lub 80 μM), zawierały trzykrotnie wyższą zawartość skrobi aniżeli zarodki potraktowane niższymi stężeniami tego składnika pożywek”, „(...) Przeprowadzone badania dowodzą, że w przypadku *P. omorika* gromadzenie skrobi jest intensywniejsze przy zastosowaniu mniejszych stężeń Phytagelu (4 lub 6 g/l), natomiast większa dawka (8 g/l) skutkuje zahamowaniem tego procesu”.

Uwagi: Pionierskie badania nad poznaniem roli sacharozy oraz ABA w regulacji rozwoju zarodka somatycznego u *P. abies* rozpoczęły von Arnold i Hakman (1998). W tym samym roku opublikowana została praca nad rolą ABA przez zespół Dunstan i wsp. (*In Vitro Cell Dev Biol-Plant*), w której stwierdzono, że egzogennie dostarczany do kultury *in vitro* ABA jest niezbędny do dojrzewania zarodków somatycznych u drzew iglastych. Z nowszych prac, gdzie wykorzystuje się ABA w stężeniu 30 μM , wymienić należy opracowanie Filonova i wsp. (*J Exp Bot*; 2000). Z dostępnej literatury wynika, że ABA jest powszechnie wykorzystywany w kulturach kalusa *in vitro* do stymulacji dojrzewania zarodków somatycznych (konwersję do stadium liścieni), które do dalszego rozwoju i następnie

regeneracji potrzebują skrobi. Dla porównania, zapłodnienie i rozwój zarodka zygotycznego u *P. abies* wyzwala w megagametoficie proces syntezy skrobi, który kończy się po osiągnięciu przez zarodek pełnej strukturalnej dojrzałości. W czasie kiełkowania nasienia, tłuszcze zapasowe ulegają konwersji w skrobię. W przypadku SE, zbyt wczesne odkładanie się skrobi może być niekorzystne, gdyż im więcej komórek embriogenego kalusa zawiera skrobię, tym mniej komórek uczestniczy w formowaniu zarodka somatycznego.

Empirycznie dobrany rodzaj i optymalne stężenie: cukru, środków żelujących mają istotne znaczenie w regulacji potencjału osmotycznego pożywki. Sacharoza (68 g/L; $\approx 0,18$ M) oraz Phytigel (6 g/L) indukowały SE przez zmianę potencjału osmotycznego pożywki. Sacharoza w stężeniu 6,8% ($\approx 0,18$ M) wpływała ponadto, w akumulujących skrobię zarodkach somatycznych, na wzrost korzenia zarodkowego (radikuli) w dojrzewających zarodkach somatycznych. Do stwierdzenia przez Habilitantkę: „Przedstawione wyniki dostarczają nowych informacji o wpływie ABA i stresu osmotycznego na akumulację skrobi w zarodkach somatycznych *Picea abies* i *P. omorika*” potrzebne jest zaplanowanie i wykonanie dodatkowych eksperymentów.

Ponownej analizie należy poddać wyniki dotyczące wpływu ABA (40 lub 80 μ M; Fig. 1 w publikacji) na zawartość skrobi w 5-tygodniowych zarodkach *P. omorika* oraz wyniki zależności intensywności gromadzenia skrobi od stężenia sacharozy i Phytagelu w pożywkach. Prawdziwą jest teza Habilitantki, że sacharoza w stężeniu 68 g/L wpływa u *P. abies* na wykształcenie prawidłowej długości osi zarodkowej hipokotyl-korzeń.

W **czwartej pracy** pt. „Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce)” (*PCTOC* 102(1): 35-44; 2010) opisano oryginalny protokół laboratoryjny do kriokonserwacji tkanek embriogenych *P. omorika* z możliwością praktycznego wykorzystania metody w namnażaniu *ex-situ* tego relikтового gatunku. Badania sfinansowane z grantu NCN (N N309 130837).

Opracowany protokół, z pominięciem krioprotektantów (dimetylosulfotlenku; DMSO), był dwuetapowy: mrożenie i rozmrożenie. I. Zamrożenie materiału w ciekłym azocie poprzedza: pre-kultura na pożywce z sacharozą oraz suszenie na powietrzu przez 2 godziny. Pre-kultura jest etapem proliferacji kalusa z namnażaniem materiału w licznych pasażach na świeżej pożywce Litvay zawierającą wzrastające stężenia sacharozy: 1) 1 dzień w roztworze 0,25 M, 2) 1 dzień w roztworze 0,5 M, 3) 2 dni w roztworze 0,75 M, 4) 3 dni w roztworze 1,0 M. Przed utrwaleniem w ciekłym azocie (przez 1 dzień), materiał dosuszano silikażelem do 20 % pojemności wody w świeżej masie i przenoszono do kriofiolek.

II. Materiał rozmrażano w temperaturze 42°C i stopniowo poddawano rehydratacji w zestalonej Phytigel'em pożywce LM zawierającej malejące stężenia sacharozy.

Wigor tkanki embriogennej po rozmnożeniu oceniono na 99%.

Uwagi: Somatyczna embriogeneza w powiązaniu z techniką kriokonserwacji, metodą stopniowego odwadniania a następnie witrifikacji, stanowi ważne narzędzie wykorzystywane w hodowli roślin, w tym drzew. Praca ma aspekty nowości i jest oryginalnym rozwiązaniem dla jednego gatunku *P. omorica*. Praca jest zacytowana 36 razy (Web of Science, Claryvate; styczeń 2023r.).

Wyniki otrzymane w tej pracy zostały włączone do podsumowania głównego osiągnięcia naukowego:

- „5. Istnieje możliwość kriopzechowywania kultur embriogennych obu gatunków świerka po zastosowaniu stopniowego odwodnienia tkanek, bez potrzeby stosowania toksycznego dimetylosulfotlenku”.

- „6. Dodanie kwasu absycynowego do pożywek, stosowanych podczas prekultury tkanki embriogennej świerka pospolitego, skutkowało poprawą wzrostu tkanki po kriokonserwacji oraz zwiększeniem jej zdolności do regeneracji zarodków w stadium dojrzałym”.

W **piątej pracy** pt. „ Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method” (*PCTOC* 113(2): 303-313; 2013) analizowano wigor rozmrożonej tkanki embriogennej oraz stabilność genetyczną kalusa embriogenego oraz zarodków somatycznych po kriokonserwacji metodą witrifikacji. Badania, które są uzupełnieniem badań opisanych w pracy czwartej, zostały sfinansowane z grantu NCN (N N309 130837).

Do zbadania poziomu zmienności genetycznej wykorzystano markery molekularne DNA jądrowego (SSR; pięć loci mikrosatelitarnych SpAGC1, SpAGC2, SpAGG3, SpAC1H8 i SpAC1F7). Na podstawie analizy struktury genetycznej (DNA jądrowe) stwierdzono brak wpływu traktowania sacharozą i ABA, poprzedzającego mrożenie w ciekłym azocie, na polimorfizm we wszystkich analizowanych loci. Najmniejszą liczbę alleli (86 bp) odnotowano w locus SpAGC2. Na podstawie tych wyników, można wnioskować, że przedstawiony protokół kriokonserwacji umożliwi długoterminowe przechowywanie cennych klonów świerka pospolitego w ciekłym azocie. Spełniony jest bowiem jeden z najważniejszych warunków zastosowania protokołu rozmnażania klonalnego w programach hodowlanych, kiedy to po rozmrożeniu, materiał charakteryzuje się wysoką przeżywalnością (na poziomie

50%; kalus embriogeny *P. abies* 54,4% po 63 dniach kultury *in vitro*) i jest genetycznie stabilny (nie wykazuje cech zmienności somaklonalnej).

Uwagi: Praca ma aspekty nowości i jest oryginalnym rozwiązaniem dla jednego gatunku *P. abies*. Zastosowanie, po rozmrożeniu, pożywki zawierającej sacharozę oraz 10 μ M ABA poprawiło przeżywalność tkanki embriogennej o ponad 30%. Do oceny stabilności genetycznej, konieczne jest wykorzystanie większej liczby markerów SSR. Praca jest zacytowana 23 razy (Web of Science, Claryvate; styczeń 2023r.). Wyniki otrzymane w tej pracy zostały włączone do podsumowania osiągnięcia naukowego:

- „7. Materiał roślinny uzyskany po rozmrożeniu tkanki embriogennej świerka pospolitego z ciekłego azotu zachował niezmienny charakter genetyczny w badanych pięciu wybranych jądrowych loci mikrosatelitarnych”.
- „9. Opracowana procedura kriokonserwacji tkanek embriogennych umożliwi długoterminowe zachowanie cennych zasobów genowych badanych gatunków drzew leśnych *ex situ*”.

Ocena podsumowująca główne osiągnięcie naukowe:

Dobór tematu osiągnięcia nie budzi żadnych wątpliwości ze względu na jego jednorodność tematyczną, aktualność i znaczenie problematyki somatycznej embriogenezy (SE) u drzew iglastych. Osiągnięcie jest wartościowym potwierdzeniem z dużym potencjałem wykorzystania oryginalnej metodyki do alternatywnego sposobu wegetatywnego rozmnażania dwóch pożądaných i ważnych gospodarczo gatunków świerka.

Wyniki badań przedstawione w pięciu publikacjach naukowych stanowią logiczną całość i mają znaczenie poznawcze, wnosząc wkład w rozwój szeroko rozumianej dyscypliny naukowej nauki leśne. Ze względu na poziom naukowy i istotny wkład Habilitantki osiągnięcie naukowe spełnia kryteria art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020r. poz. 85 z późn.zm.) oraz zgodnie z Rozporządzeniami Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Dz. U z 2018r) — dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego nauk rolniczych, dyscyplina nauki leśne.

III. Aktywność naukowa Habilitantki i inne osiągnięcia naukowo-badawcze

Od momentu ukończenia studiów Habilitantka pogłębia wiedzę teoretyczną i zwiększa umiejętności praktyczne z zakresu SE, mikrorozmnażania drzew i kriokonserwacji. Docenić należy szkolenia w kilku placówkach naukowych w Polsce, które udoskonalały warsztat badawczy i stanowiły ważne doświadczenie, wykorzystane w dalszej karierze naukowej.

Habilitantka prezentuje swoje pozostałe dokonania naukowo-badawcze i aktywność naukową w chronologii: 1) przed doktoratem, 2) po doktoracie. Z podziałem tym wiążą się określone dokonania publikacyjne.

1) Przed doktoratem.

Jedna praca wieloautorska (IF_{5-letni 2021} 1,305, 100 pkt. MEiN₂₀₂₁), w której Habilitantka jest pierwszym autorem. Publikacja dotyczy SE u czterech gatunków *Picea* (*Picea omorika*, *P. pungens* 'Glauca', *P. breweriana* and *P. abies*), spośród których dwa gatunki (*Picea omorika*, *P. abies*) wybrane są do dalszych, bardziej szczegółowych badań opublikowanych i przedstawionych jako główne osiągnięcie habilitacyjne.

2) Po doktoracie.

Habilitantka, po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, kontynuuje tematykę badawczą podjętą w doktoracie, realizując w ramach projektu badawczego z Narodowego Centrum Nauki (2009-2014) nowe kwestie, które uzupełniają dotychczasową wiedzę. Zdobyte w ramach grantu środki są wykorzystane m.in. na sfinansowanie merytorycznych konsultacji w temacie z doświadczonymi naukowcami z Niemiec, Francji czy Słowacji. Prace badawcze nad zagadnieniami są prowadzone w ramach koordynowanych przez Habilitantkę grantu promotorskiego oraz projektu własnego. W efekcie, powstają oryginalne zwykłe i przeglądowe artykuły naukowe opublikowane w czasopismach posiadających (13 prac) i nieposiadających współczynnika wpływu Impact Factor (IF) w bazie JCR (1 praca) i poza tą bazą (1 praca).

Z bazy JCR jest to 13 prac głównie wieloautorskich (IF_{5-letni 2021} 31,257, 1190 pkt. MEiN₂₀₂₁), w których Habilitantka jest dziewięciokrotnie pierwszym autorem. Habilitantka zdobyła środki finansowe na realizację badań w ośmiu publikacjach. Średni udział procentowy Habilitantki w powstanie wszystkich publikacji wynosi ponad 50% (52,31%), a w powstanie prac z pierwszym autorstwem - 68,33%. Publikacje dotyczą aktywnej ochrony roślin z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Wiodącym zagadnieniem jest SE w rodzinie sosnowatych (rodzaje: *Picea*, *Abies*, *Larix*) oraz mikropropagacja u różnych gatunków drzew z trzech rodzin (rodzina bukowatych (*Fagus sylvatica*), wierzbowatych (Topola szara (*Populus×canescens*),

cyprysowatych (rodzaj *Juniperus*). W jednej z wymienionych powyżej prac, kultury *in vitro* oraz grzyby mykoryzowe są wykorzystane do selekcji linii drzew odpornych na metale ciężkie. We wszystkich pracach Habilitantka mogła wykorzystać swoje doświadczenie z prac nad gatunkami *Picea* sp. Wyniki badań na przykład na buku czy topoli wnoszą wiele nowej metodologii do badań nad optymalizacją wegetatywnego rozmnażania *in vitro* wyselekcjonowanych linii drzew.

Aktywność publikacyjna Habilitantki przejawia się także w pisaniu tekstów popularnonaukowych prezentowanych lokalnie (4 artykuły w czasopiśmie „Kórniczanie”) i w obrębie kraju (1 artykuł w „Wiedza i Życie”, 1 artykuł w „Wszechświat”, 2 artykuły w „Biologia w Szkole”).

Należy podkreślić, że współpraca Habilitantki z wieloma zespołami badawczymi w Polsce i za granicą, przyczyniła się do powstania licznych wartościowych publikacji, jak również do poszerzenia zakresu jej zainteresowań badawczych.

Pełen dorobek publikacyjny stanowią 21 oryginalne prace twórcze (w tym 1 praca przed doktoratem), 20 prac zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR.

W ostatnich dwóch latach (2021-2022) Habilitantka publikowała prace w czasopiśmie z listy JCR o wysokim $IF_{5-letni}$ (6, 132; 6,612). Wskaźniki naukometryczne odzwierciedlają wartość badań oraz wskazują, że są to prace rozpoznawalne w środowisku naukowym. Habilitantka publikuje w renomowanych czasopiśmie międzynarodowych (m.in.: *Dendrobiology PCTOC*, *APP*, *New Forests*, *Forests*, *Front Plant Sci*, *Int J Mol Sci*).

Habilitantce powierzono 25 recenzji w 14 różnych czasopiśmie zagranicznych.

Habilitantka była aktywna na konferencjach naukowych w kraju i za granicą, na których wygłosiła 15 referatów i zaprezentowała 26 plakaty naukowe, z których jeden z 2009 r. został wyróżniony na konferencji w Poznaniu.

Autorka wykazała 10 projektów, w których brała udział (3 razy jako kierownik projektu, 8 razy jako wykonawca, w tym 1 raz jako wykonawca w granie promotorskim). 10 projektów zostało zakończonych, a jeden jest w trakcie realizacji (do 2023 r.) w czasie składania dokumentacji do wniosku. Niedosyt budzi brak szczegółowych informacji o konkretnych zdaniach powierzonych/zrealizowanych w danym projekcie.

Przed doktoratem Habilitantka była kierownikiem w 1 projekcie a wykonawcą w 3 projektach KBN (w tym 1 raz jako wykonawca w grantie promotorskim). Jedynie tematyka grantu promotorskiego była związana z tematem rozprawy doktorskiej. Tematyką pozostałych projektów była charakterystyka wpływu stresu, spowodowanego skażeniem podłoża związkami chemicznymi, na rozwój klonów brzozy brodawkowatej i topoli szarej.

Habilitantka podaje, że po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, realizowała 6 projektów, w różnych latach z okresu 2008-2017. Dwukrotnie była kierownikiem i czterokrotnie wykonawcą projektu. Tematy projektów („Wpływ grzybów mikoryzowych na proces aklimatyzacji sadzonek topoli i brzozy z kultur *in vitro*, w podłożach o różnym stopniu skażenia metalami ciężkimi” w latach 2008-2011, „Stabilność epigenetyczna nasion oraz tkanek roślin drzewiastych poddanych kriogenicznemu przechowaniu” w latach 2009-2012, „Somatyczna embriogeneza i kriokonserwacja kultur embriogennych *Picea abies* (L.) Karst. i *P. omorika* (Pancić) Purk. metodą witrifikacji” w latach 2009-2014 (**efektem realizacji tego projektu są cztery publikacje składające się na osiągnięcie Habilitantki**), „Wykorzystanie metody somatycznej embriogenezy do wegetatywnego rozmnażania i długoterminowego przechowywania buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)” w latach 2011-2015, „Analiza wpływu ektomikoryz na tolerancję topoli *Populus x canescens* na ołów wykonana metodami proteomicznymi i metabolomicznymi” w latach 2012-2017, „Zachowanie zasobów genowych zagrożonych i ginących gatunków metodami kriogenicznymi w leśnym banku genów (II etap) oraz ochrona zasobów genowych najstarszych drzew w Polsce, poprzez sklonowanie *in vitro* i kriokonserwację” w latach 2013-2017.

Od roku 2018 Habilitantka realizuje projekt „Długoterminowe przechowywanie nasion dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.)”, którego zakończenie jest zaplanowane w roku bieżącym 2023.

Uwagi: Autorka realizując, spośród wszystkich wymienianych powyżej, dwa projekty (EO-2717-4/13, EO.271.3.7.2018) finansowane przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych, tak naprawdę wykonuje usługę obcą w zakresie badań naukowych. Bardziej poprawnym podejściem byłoby zatem ujęcie realizacji niniejszych usług jedynie w punkcie dotyczącym współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym. W efekcie Autorka wykazałaby 9 zakończonych projektów, w których brała udział (3 razy jako kierownik projektu, 7 razy jako wykonawca, w tym 1 raz jako wykonawca w grantie promotorskim).

Habilitantka w ostatniej dekadzie była wykonawcą w 3 wspólnych projektach polsko-słowackich. Projekty bilateralne, w tematyce rozszerzonej o nowe zagadnienia i inne gatunki drzew, mają ścisły związek z badaniami, które Habilitantka prowadziła i uzyskanymi wynikami, które zostały opublikowane i włączone m.in. do osiągnięcia habilitacyjnego.

Dr Teresa Hazubska-Przybył była uczestniczką 5 szkoleń w kraju i 7 za granicą (w tym 5 w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Roślin Słowackiej Akademii Nauk, Nitra, Słowacja). Wyjazdy za granicę były krótkoterminowe (w sumie 10 tyg. na Słowacji, 1 tydzień w Niemczech, 1 tydzień we Francji).

Oceniając pozostały dorobek Habilitantki stwierdzam, że spełniła formalny wymóg prowadzenia badań w innych jednostkach naukowych i uczestniczenia w zagranicznych stażach naukowych. Niedosyt budzi brak informacji o wymiernych efektach współpracy.

Biorąc pod uwagę aktywność publikacyjną i grantową Habilitantki, należy oczekiwać dalszego rozwoju naukowego.

W konkluzji stwierdzam, że wskazane przez Habilitantkę Dr Teresę Hazubską-Przybył osiągnięcia, niewchodzące w skład głównego osiągnięcia naukowego, w całości spełniają kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego. Dorobek ten jest znacznie powiększony po uzyskaniu stopnia doktora (Ustawa z dnia 3 lipca 2018r. określająca przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018, poz. 1669).

IV. Dorobek organizacyjny oraz popularyzatorski

Habilitantka była członkiem komitetu naukowego i organizacyjnego dwóch seminariów międzynarodowych pt. „Cold Hardiness Seminar” organizowanych w roku 2013 i 2015.

V. Współpraca z otoczeniem społecznym i gospodarczym

Dr Teresa Hazubska-Przybył wykazała udział w realizacji dwóch zadań badawczych (EO-2717-4/13, EO.271.3.7.2018), finansowanych przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych, w których brała udział jako wykonawca. 1 projekt został zakończony, a jeden jest w trakcie realizacji (do 2023 r.; EO.271.3.7.2018) w czasie składania dokumentacji do wniosku. Tematyką współpracy jest optymalizacja metod klonowania ; *in vitro* i kriokonserwacji

wykorzystywanych do ochrony zasobów genowych najstarszych, zagrożonych i ginących gatunków drzew.

VI. Informacje naukometryczne

Całkowity dorobek Habilitantki wynosi 1800 pkt. MEiN (zgodnie z rokiem 2021), w tym dla głównego osiągnięcia naukowo-badawczego 510 pkt. MEiN. Sumaryczny IF wynosi 44,23, wg wykonanych przez mnie wyliczeń uwzględniających IF prac z osiągnięcia i innych. Wyliczenia dokonane przez Habilitantkę wskazują wartość IF 32,278.

Indeks Hirscha wynosi 7, a całkowity indeks cytowań (wg Web of Science; Clarivate) 168 (bez autocytowań 132).

Uwagi końcowe

Główne osiągnięcie naukowo-badawcze dr Teresy Hazubskiej-Przybył pt. „Somatyczna embriogeneza i kriokonserwacja kultur embriogennych *P. omorika* (Pančić) Purk. i *Picea abies* (L.) H.Karst. przy zastosowaniu metody stopniowej dehydratacji” będące cyklem pięciu publikacji z IF_{5-letni} wraz z opisem jest wartościowym potwierdzeniem z dużym potencjałem wykorzystania oryginalnej metodyki do alternatywnego sposobu wegetatywnego rozmnażania dwóch pożądanych i ważnych gospodarczo gatunków świerka. Osiągnięcie to jest potwierdzone innymi publikacjami i udziałem Habilitantki w krajowych i zagranicznych projektach badawczych. Konsekwentnie prowadzone przez Habilitantkę badania są rozszerzane o nowe gatunki i modyfikacje metodyczne protokołów laboratoryjnych. Autorka osiągnięcia aktualnie współpracuje z otoczeniem społecznym i gospodarczym w ramach, finansowanej przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych usługi w zakresie badań naukowych.

Rozwój naukowy autorki osiągnięcia jest harmonijny. Osiągnięcie stanowi logiczną całość i ma znaczenie poznawcze, wnosząc wkład w rozwój szeroko rozumianej dyscypliny naukowej nauki leśne.

Należy podkreślić nie tylko wymienione wyżej osiągnięcia, ale wiele innych, których wyrazem jest punktacja uzyskana przez Habilitantkę. Dorobek Habilitantki wynosi 1800 pkt. MEiN (zgodnie z rokiem 2021), w tym dla głównego osiągnięcia naukowo-badawczego 510 pkt. MEiN. Sumaryczny IF wynosi 44,23. Indeks Hirscha wynosi 7, a całkowity indeks cytowań (wg Web of Science; Clarivate) 168 (bez autocytowań 132).

Biorąc pod uwagę wszystkie sfery działalności zawodowej: a więc aktywność i osiągnięcia naukowe, w tym współpracę, działalność popularyzatorską i organizacyjną dr Teresy Hazubskiej-Przybył, stwierdzam, że spełniają one warunki formalne (określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018r. określająca przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018, poz. 1669) oraz uzasadniają wniosek o nadanie jej przez Radę Naukową Instytutu Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie nauki leśne.

Jako Recenzent wyrażam zatem pozytywną opinię w sprawie nadania dr Teresie Hazubskiej-Przybył stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie nauki leśne.

Ewa Dubas

Kraków, 12.01.2023 r.

dr hab. Ewa Dubas



12

13

14