

Ocena dorobku naukowego, organizacyjnego i dydaktycznego oraz rozprawy habilitacyjnej dr inż. Agaty Ptak

I. Dane formalne

Dr inż. Agata Ptak jest absolwentką Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Studia na kierunku Ogrodnictwo, specjalizacja Rośliny Ozdobne, ukończyła w roku 1995, uzyskując tytuł magistra inżyniera ogrodnictwa na podstawie pracy pt. „Wpływ jakości światła na regenerację *Hippeastrum hybridum* w warunkach *in vitro*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Bach. Od 1996 roku była słuchaczką Studiów Doktoranckich na Wydziale Ogrodniczym Akademii Rolniczej w Krakowie. W lutym 2001 r. uzyskała stopień doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, obroniwszy pracę doktorską pt. „Somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* pędów i załazni tulipana”, którą wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Bach.

Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka przebywała na półrocznym stypendium naukowym w instytucie badawczym w Lisse w Holandii (Applied Plant Research, Wageningen UR). Od 18.04.2002 do 30.09.2005 była zatrudniona na etacie adiunkta w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. W 2003 r. otrzymała czteromiesięczne stypendium Rządu Francuskiego i pracowała w Laboratoire de Pharmacognosie et Phytotechnologie, na Uniwersytecie w Amiens. Od 1.10.2005 jest zatrudniona jako adiunkt w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Zainteresowania badawcze dr Agaty Ptak koncentrowały się dotychczas wokół roślinnych kultur *in vitro*, szczególnie roślin cebulowych. Po uzyskaniu stopnia doktora wiodącym tematem badań stała się somatyczna embriogeneza oraz biosynteza alkaloidów w kulturach *in vitro* śnieżycy leniej.

Jej dorobek naukowy obejmuje łącznie 16 publikacji (bez 4 stanowiących habilitację), z czego 14 to prace opublikowane po doktoracie, a także 22 doniesienia konferencyjne (14 międzynarodowe i 8 krajowych).

II. Ocena osiągnięć i dorobku naukowego zawartego w rozprawie habilitacyjnej i w wykazanych publikacjach

1. Rozprawa habilitacyjna

Rozprawę habilitacyjną dr Agaty Ptak stanowi cykl czterech jednotematycznych publikacji pod wspólnym tytułem „**Studia nad somatyczną embriogenezą oraz biosyntezą galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum*”**. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z IF (0,818 – 3,159), a ich sumaryczny IF wynosi 6,853. Habilitantka ocenia swój wkład w w/w publikacje od 55% do 70%.

Badania opisane w cyklu publikacji miały następujące cele:

1. określenie wpływu warunków prowadzenia kultury *in vitro* na somatyczną embriogenezę *Leucojum aestivum*,
2. ustalenie działania wybranych czynników na biosyntezę galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *L. aestivum*,
3. zbadanie potencjału kultur kalusowych *L. aestivum* w zakresie biosyntezy Amaryllidaceae

1. Ptak A., El Tahchy A., Skrzypek E., Wojtowicz T., Laurain-Mattar D., 2013. **Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus.** Cent.Eur.J.Biol. 2013:591-599

Obiektem badań była kultura *in vitro* *Leucojum aestivum*, traktowana jako alternatywna metoda uzyskiwania cennych dla przemysłu farmaceutycznego alkaloidów. Po raz pierwszy wykazano, że obecność w pożywce auksyn indukowała powstanie embriogenicznego kalusa śnieżycy letniej i wywoływała jego zdolność do somatycznej embriogenezy, co wiązało się ze zwiększoną biosyntezą alkaloidów. Pożywka z 2,4-D okazała się do tego celu najlepsza, gdyż jednocześnie ograniczała akumulację związków fenolowych, wpływających negatywnie na regenerację tkanek roślinnych. Rodzaj auksyny w pożywce wpływał na rodzaj syntetyzowanych przez kalus alkaloidów i w obecności pikloramu pojawiały się związki nie wykrywane na pożywce z 2,4-D. Choć nie wszystkie wykryte *in vivo* alkaloidy (7 w cebulach matecznych) zidentyfikowano w kulturach *in vitro*, to uzyskane wyniki świadczą, że kultury kalusa śnieżycy letniej mogą stać się alternatywnym źródłem cennych leczniczo alkaloidów, szczególnie, gdy zastosuje się do tego celu bioreaktory.

2. Ptak A., El Tahchy A., Dupir F., Boisbrun M., Henry M., Chapleur Y., Moś M., Laurain-Mattar D., 2009. **LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and *in vitro* extracts of *Leucojum aestivum*.** J.Nat.Prod. 72:142-147.

Do badań alkaloidów w ekstraktach z cebul śnieżycy letniej oraz z kultur *in vitro* zastosowano metody chromatograficzne sprzężone ze spektrometrią masową. Zidentyfikowano siedem związków występujących *in vivo*, natomiast na liczbę i ilość alkaloidów w kulturach *in vitro* wpływał rodzaj pożywki. Najwięcej otrzymano ich przy obecności w pożywce pochłaniacza etylenu, nadmanganianu potasu, co wiązało się z faktem, że etylen ogranicza wzrost i zdolności regeneracyjne kalusa w kulturach *in vitro*. Zostało to potwierdzone dzięki kulturze kalusa na pożywkach z inhibitorami etylenu bądź jego bezpośrednim prekursorem ACC. Na tej ostatniej pożywce nie wykryto obecności alkaloidów, podczas gdy w obecności wyższych stężeń inhibitorów STS i AgNO₃, pochłaniacza etylenu KMnO₄ oraz kontroli stwierdzono obecność najważniejszych alkaloidów, tj. galantaminy i likoryny.

3. 3. Ptak A., El Tahchy A., Wyżgolik G., Henry M., Laurain-Mattar D., 2010. **Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures.** Plant Cell Tiss Organ Cult. 102:61-67

W kolejnej pracy kontynuowano badania nad rolą etylenu w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej i biosyntezy galantaminy. Nie było dotąd badań nad wpływem C₂H₄ na syntezę metabolitów wtórnych w kulturach zarodków somatycznych. Badania nad śnieżycą wykazały, że etylen działa w różny sposób na różnych etapach morfogenezy. Jest produkowany w kalusie i zarodkach somatycznych w zależności od składu pożywki. Włączenie do niej prekursora etylenu, ACC, ogranicza wzrost kalusa, który z kolei stymulowany jest w obecności inhibitora etylenu AgNO₃. Prekursor etylenu stymuluje indukcję i rozwój zarodków, choć w obecności pochłaniacza gazu, KMnO₄, rośliny lepiej się rozwijają. Różny jest też wpływ etylenu na syntezę alkaloidu: podczas gdy inhibitor etylenu STS stymuluje produkcję galantaminy w

kulturach kalusa, prekursor etylenu ACC wywołuje podobne zjawisko w kulturach zarodków i to na poziomie 6-krotnie wyższym, niż w kontroli.

4. Ptak A., Simlat M., Kwiecień M., Laurain-Mattar D. 2013. ***Leucojum aestivum* plants propagated in *in vitro* bioreactor culture and on solid media containing cytokinins.** Eng.Life Sci. 13(3):261-270.

W tej pracy opracowano kilka zagadnień: porównanie jakości roślin zregenerowanych z somatycznych zarodków uzyskanych w kulturze na pożywce stałej i płynnej (bioreaktor o czasowym zanurzeniu kultury), określenie ich zdolności do biosyntezy alkaloidu galantaminy, określenie wpływu cytokinin na jakość zregenerowanych roślin i syntezę alkaloidu oraz analiza podobieństwa genetycznego uzyskanych regenerantów przy użyciu metody RAPD. Wykazano, że dzięki użyciu bioreaktora typu RITA i w obecności tidiazuronu uzyskać można dobrej jakości rośliny śnieżycy wiosennej, które są genetycznie wyrównane i posiadają zdolność biosyntezy galantaminy. Wyniki te mogą stanowić podstawę do badań nad komercyjną produkcją galantaminy

Sposób realizacji powyższych zadań i znaczenie uzyskanych wyników Autorka przedstawia w świetnie napisanym komentarzu do powyższych publikacji. Mimo iż nie podlega on formalnej ocenie, podkreślam jego zalety: jest klarowny, kompletny, syntetyczny. Generalnie, założone cele realizowane były równocześnie w trakcie badań, więc prezentowane w poszczególnych publikacjach wyniki dotyczą kilku zagadnień, jednak komentarz Autorki jest doskonałym przewodnikiem po Jej osiągnięciach i pozwala docenić oryginalność badań, ich rozwój i znaczenie oraz stopień realizacji założonych celów na poszczególnych etapach badań. Badania te są ukierunkowane, spójne, przeprowadzone z użyciem nowoczesnych metod, a znaczenie wyników tak dla nauki, jak i praktyki (możliwość produkcji komponentów leków w bioreaktorach) trudne do przecenienia, o czym świadczy zainteresowanie publikacjami ze strony międzynarodowego gremium.

Na koniec tej części mojej opinii pozwolę sobie przedstawić uwagę natury technicznej, choć nie jest to formalny zarzut. Mimo iż cykl ten został utworzony tylko w celu wykazania największych osiągnięć Habilitantki i nie będzie publikowany jako taki, pozwolę sobie wyrazić osobiste zastrzeżenia do jego tytułu. Podręczniki pisania naukowych prac przyrodniczych zalecają już studentom unikania w tytułach prac naukowych/dyplomowych słów takich jak „badania”, „studia”, „rozważania: itp., sugerujące czynność nie zakończoną. Co prawda, ten zestaw publikacji ma taki charakter, a nie istnieją żadne sprecyzowane zalecenia dotyczące ani liczby, ani doboru publikacji do cyklu stanowiącego rozprawę, tym bardziej do tytułu takiego cyklu, uważam jednak, że brak w tytule słowa „studia” nie umniejszyłby znaczenia przedstawionego zestawu. Co więcej, osobiście chętnie widziałabym na początku cyklu publikację „wstępną” (B5 i B6), ukazującą wkład Habilitantki w problematykę badawczą i „przygotowanie terenu” do wyżej opisanych badań zespołowych, choć te publikacje wydają się mniej doceniane przez samą Autorkę, bo nawet nie załączyła ich kopii w zestawie dla Recenzentów.

2. Ocena osiągnięć i dorobku naukowego zawartego w wykazanych publikacjach

Wykazany przez Habilitantkę dorobek publikacyjny to 14 publikacji oryginalnych (bez 4 zebranych w w/w cykl) oraz 2 rozdziały w monografiach naukowych. Prace napisane po doktoracie (12) ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych (w tym 8 w czasopismach z bazy JCR), głównie zagranicznych, a ich łączny IF wyniósł 16,487, liczba

cytowań wg WoS 50, a indeks Hirscha 5. Jak podaje Habilitantka, łączna liczba punktów MNiSW (za rok 2013) wyniosła 331, co jest trudne do sprawdzenia, gdyż nie ma danych punktowych przy wykazanych publikacjach, ani punktacji konferencji wg WoS. To niedopatrzenie kosztowało Recenzenta trochę czasu, a i tak nie udało się określić punktacji niektórych czasopism (Phytochemistry Reviews czy Acta Horticulturae) i zweryfikować do końca podanej sumy punktów, która przekraczałaby znacznie tę wymaganą do habilitacji. Osobiście żałuję też, iż Recenzenci nie otrzymali do wglądu publikacji spoza bazy JCR (6 pozycji).

Przed doktoratem ukazały się 2 publikacje, 1 w jęz. polskim prezentująca wyniki prac nad zwartnicą (praca magisterska) i 1 w jęz. angielskim przedstawiająca wyniki badań Zespołu nad wpływem światła na mikrorozmnażanie, zaprezentowana na konferencji w Irlandii. Prawie cały dorobek publikacyjny Habilitantki powstał w okresie po doktoracie, a więc od roku 2001 do chwili obecnej (fakt przyjęcia do druku ostatniej wymienionej publikacji został potwierdzony przez Wydawcę). Dr Agata Ptak publikowała głównie wspólnie ze współpracownikami z zespołów badawczych – francuskimi i polskimi; w 5 pracach jest pierwszym bądź jedynym autorem.

Pierwsza opublikowana praca przedstawia wyniki nad wpływem światła na regenerację zwartnicy w warunkach *in vitro*, uzyskane w ramach pracy magisterskiej. Praca doktorska wykonywana była na tulipanach i dotyczyła jego somatycznej embriogenezy i gynogenezy. Autorka udoskonaliła metodę uzyskiwania zarodków somatycznych, wykorzystując w kulturach *in vitro* komórki somatyczne zalążni. Uzyskała prawidłowo uformowane rośliny, bez zmian genetycznych w porównaniu do kontroli i doprowadziła do pomyślnej ich aklimatyzacji. Powyższe wyniki zaprezentowała w kilku publikacjach (A6, B3, B4) oraz przedstawiła na międzynarodowej konferencji.

Wyniki wstępnych badań nad mikrorozmnażaniem śnieżycy letniej zawarte są w publikacji B5. Z kolei wyniki prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej CM UJ badań nad biosyntezą związków kumarynowych *in vitro* przedstawiane były na kilku konferencjach. Wykazano m.in., że barwa światła ma wpływ na produkcję kumaryn. Dzięki możliwości pracy na Uniwersytecie w Nancy Habilitantka mogła uczestniczyć w badaniach nad transformacją genetyczną za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* śnieżycy letniej, co było zrobione po raz pierwszy na świecie. Udało się uzyskać korzenie przybyszowe na poddanych transformacji fragmentach liści, ale korzenie te nie miały zdolności syntezy galantaminy. Wyniki zawiera publikacja A7. Kolejnym etapem było badanie procesu biosyntezy alkaloidów amarylkowatych przy wykorzystaniu kultur pędowych śnieżycy, w którym wykorzystano znakowaną deuterem 4'-O-metylonorbelladynę, prekursora alkaloidów. Wykryto 6 znakowanych alkaloidów wywodzących się od w/w prekursora. Uzyskano bardzo wysoką zawartość likoryny i wysoką galantaminy, co świadczyło, że wzrost syntezy metabolitów w kulturze *in vitro* można uzyskać, dodając do pożywki prekursora. Te wyniki przedstawiono w publikacjach A8 i A10 oraz przedstawiono na 3 konferencjach. Publikacja A9 zawiera wyniki dotyczące zawartości alkaloidów w ekstraktach pędowych trzech roślin z rodziny *Amaryllidaceae* oraz ich właściwości inhibicyjnych wobec acetylocholinoesterazy. Inhibitory tego enzymu odgrywają ważną rolę w leczeniu choroby Alzheimera, więc powyższe wyniki mają znaczenie ogólnoświatowe, gdyż mogą być przydatne przy poszukiwaniu nowych inhibitorów AChE. Badania nad somatyczną embriogenezą śnieżycy wiosennej wykonano - po raz pierwszy dla tego gatunku - w ramach stypendium Rektorskiego Funduszu Stypendialnego. Znaczenie otrzymanych wyników jest istotne dla ochrony gatunkowej tej rośliny, jak i dla przemysłu farmaceutycznego. Procedura została opisana w rozdziale książki poświęconej mikrorozmnażaniu roślin ozdobnych (C2).

Publikacja A11 zawiera wyniki badań nad oceną podatności nie oplewionych odmian owsa na uszkodzenia mechaniczne .

Wybór profilu badań przez Habilitantkę jest konsekwencją określonej drogi kariery naukowej i zawodowej. Dr Agata Ptak, pracując już od czasu studiów pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Bach, uznanej nie tylko w Polsce specjalistki z dziedziny kultur *in vitro*, dobrze wykorzystwała sposobność zdobycia solidnego warsztatu badawczego właśnie w obszarze kultur *in vitro*, rozwijając go w trakcie stażu w instytucie badawczym w Lisse. Praca na Wydz. Farmacji UJ oraz współpraca z ośrodkami naukowymi we Francji zajmującymi się chemią substancji naturalnych, pozwoliła na poszerzenie warsztatu o metody analityki przy użyciu nowoczesnych narzędzi chromatograficznych, metody transformacji genetycznej czy biotransformacji dzięki czemu Habilitantka stała się cennym partnerem w badaniach nad produkcją *in vitro* i właściwościami alkaloidów o właściwościach leczniczych, szczególnie produkowanych przez śnieżycę letnią galantyny i likoryny. Alkaloidy te stanowią podstawę do produkcji cennych leków m.in. antynowotworowych i przeciw chorobie Alzheimera, a pozyskiwanie ich z roślin występujących w naturze jest drogie i wyniszczające gatunek. Należy podkreślić fakt, że to dr Agata Ptak zainicjowała badania nad wykorzystaniem somatycznej embriogenezy śnieżycy do biosyntezy alkaloidów. Problematyka ta była mało badana tak w Polsce, jak i na świecie. Kolejne etapy badań dr A. Ptak nad oboma zjawiskami zaowocowały m.in. omawianym tu cyklem publikacji, a zainteresowanie tematem na świecie wyraża się liczbą 50 cytowań stosunkowo „świeżych” artykułów z lat 2009-2013.

Habilitantka brała udział w 2 projektach badawczych finansowanych ze środków budżetowych – z MNiSW (2000-2001) oraz FNiTP (2011-2012). Uczestniczyła też – na podstawie umowy o współpracy międzyuczelnianej- w badaniach prowadzonych na uniwersytecie w Nancy, czego owocem są ważne publikacje w uznanych czasopismach, a także Inra, Plant Advanced Technologies SA i CNRS, Centre de Recherche de Gif, Instytut de Chimie des Substances Naturelles. Kolejne publikacje powstały dzięki współpracy z Zakładem Botaniki i Fizjologii Roślin UR im. Hugona Kołłątaja w Krakowie oraz Zakładem Biotechnologii Instytutu Fizjologii PAN w Krakowie. Wyniki badań Habilitantki prezentowane były na 12 konferencjach międzynarodowych i 8 krajowych – 8 jako doniesienia ustne i 14 w formie posterów. Dr A. Ptak otrzymała stypendium z Funduszu Rektorskiego, dwie indywidualne nagrody rektorskie za wybitne osiągnięcia w dziedzinie naukowej oraz jedną, zespołową III stopnia za osiągnięcia dydaktyczne.

III. Ocena dorobku dydaktycznego

W 1995 r. Habilitantka uzyskała dyplom Studium Pedagogicznego Politechniki Krakowskiej. Od 2002 r. prowadzi/ła zajęcia dla studentów z różnych wydziałów i kierunków studiów: Wydz. Farmaceutycznego, Rolniczo-Ekonomicznego, Hodowli i Biologii Zwierząt, Biotechnologii. Lista przedmiotów obejmuje różnego typu zajęcia głównie z obszaru kultur *in vitro*, jak wykłady i ćwiczenia, a także seminaria i zajęcia terenowe. Ponadto dochodzi tu przedmiot „Kultury *in vitro*” na studiach podyplomowych. Była dwukrotnie zapraszana do prowadzenia wykładów na uniwersytecie w Nancy w ramach programu Erasmus. Była promotorem 15 prac magisterskich i 5 inżynierskich. Jest współ promotorem pracy doktorskiej mgr Sahar Saliba z Uniwersytetu Henri Poincare Nancy 1 we Francji (obrona przewidziana na 2015 r.). Czynn timer uczestniczy w „obsłudze” procesu dydaktycznego w macierzystej Jednostce. Jest współautorką skryptu „Przewodnik do ćwiczeń z roślinnych kultur *in vitro*”.

Powyższy przegląd działalności dr Agaty Ptak pozwala stwierdzić, że jest Ona doświadczonym pracownikiem dydaktycznym, potrafiącym przekazać wiedzę w ramach prowadzonych zajęć na różnych kierunkach i dla słuchaczy o różnych poziomach percepcji.

IV. Ocena dorobku organizacyjnego i w sferze popularyzacji wiedzy ogrodniczej

W ramach działalności popularyzatorskiej dr Agata Ptak pomagała w organizacji Festiwalu Nauki (2006-2013). Prowadziła zajęcia dla uczniów liceum ogólnokształcącego, a także Technikum Agrobiznesu.

W ramach projektu FNiTP doposażyła laboratorium kultur *in vitro* na Wydziale. Była koordynatorem naukowym w umowie międzynarodowej dotyczącej współpracy pomiędzy Uniwersytetem Rolniczym im. Hugona Kołłątaja a francuskim Universite Henri Poincare – Nancy 1. Prowadzi współpracę z trzema instytucjami badawczymi we Francji i dwiema w Polsce. Jest członkiem komitetu redakcyjnego czasopisma Engineering in Life Science. Wykonała recenzje artykułów do trzech renomowanych czasopism naukowych (w sumie 9): Engineering in Life Science, Plant Cell Tissue and Organ Culture, Acta Physiologiae Plantarum. Jest członkiem International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology.

V. Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że dr Agata Ptak jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym doskonale przygotowanym do samodzielnej pracy badawczej i kierowania projektami badawczymi. Jej warsztat badawczy pozwala na stosowanie najnowszych metod i kompleksowe podejście do osiągania zakładanych celów. Podkreślam też znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, tak dla ogrodnictwa, jak i ochrony środowiska oraz chemii związków naturalnych, a w konsekwencji dla przemysłu farmaceutycznego. Dorobek naukowy wyrażony sumą ponad 300 punktów, uzyskany dzięki publikacjom głównie w wysoko punktowanych czasopismach zagranicznych, uważam za bardzo wartościowy i oczywiście wystarczający, by Kandydatkę promować na samodzielnego pracownika naukowego. Potwierdzam wysokie walory poznawcze i praktyczne osiągnięć opisanych w cyklu publikacji wyodrębnionych jako rozprawa habilitacyjna.

Pozytywnie oceniam również dorobek dydaktyczny i organizacyjny oraz osiągnięcia w obszarze popularyzacji wiedzy z zakresu kultur *in vitro*.

Mając na uwadze, że nadanie stopnia doktora habilitowanego wiąże się ze znaczącym wkładem w rozwój danej dyscypliny, uważam, że dr Agata Ptak spełnia warunki określone w USTAWIE z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 ze zm. w Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011 r., nr 84, poz. 455), wnioskuję więc o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

