



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia ...15. 11. 2022r.

dr hab. Alina Trejgell, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 6112509
e-mail: trejgell@umk.pl

Toruń 4.11.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dawida Kocota
pt. „Biologia i rozmnażanie rzadkich i zagrożonych gatunków roślin z rodziny
Ranunculaceae” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Barbary Nowak
i promotora pomocniczego: dr inż. Ewy Sitek
w Katedrze Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Wydziału Biotechnologii i
Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie**

Formalną podstawą wykonania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa prof. dr hab. Marcina Rapacza, z dnia 22.09.2022 informujące o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej na podstawie uchwały Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Rolnicze Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Globalne zmiany klimatyczne, a także presja antropogeniczna mają ogromny wpływ na bioróżnorodność i szacuje się, że około 30% gatunków roślin jest zagrożonych wyginięciem. W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są prace badawcze związane z opracowaniem skutecznych strategii ochrony populacji zagrożonych gatunków zarówno w warunkach *in situ*, jaki i *ex situ*. Ochrona *in situ* w wielu przypadkach wydaje się jednak nie wystarczająca. Stąd w ostatnich dekadach odnotowuje się rozwój metod ochrony *ex situ* tj. powstawanie kolekcji zachowawczych w Ogrodach Botanicznych czy metod biotechnologicznych. Wśród tych ostatnich na szczególną uwagę zasługują krioprezerwacja i opracowywanie efektywnych systemów regeneracji z wykorzystaniem



technik *in vitro*. Mikropropagacja to technika, która przy minimalnej ingerencji w środowisko daje możliwość uzyskania dużej liczby osobników potomnych. Przedłożona do recenzji praca doktorska bardzo dobrze wpisuje się w ogólnoswiatowy nurt badań i w sposób istotny wzbogaca wiedzę o gatunkach chronionych.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z 3 oryginalnych i tematycznie powiązanych artykułów naukowych, opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych publikacji wynosi 12,869, a całkowita wartość według kryteriów MEIN stanowi 300 pkt. Prace wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej są pracami wieloautorowymi:

Artykuł I (5 współautorów) Kocot i wsp., 2022. The Effectiveness of the Sexual Reproduction in Selected Clonal and Nonclonal Species of the Genus *Ranunculus*. *Biology*. 11, 85

Artykuł II (5 współautorów) Kocot i wsp., 2022. Reproductive Biology of Dry Grassland Specialist *Ranunculus illyricus* L. and Its Implications for Conservation. *Biology*. 11, 873.

Artykuł III (5 współautorów) Kocot i wsp., 2022. *In vitro* shoot regeneration from organogenic callus culture and rooting of Carpathian endemic *Aconitum bucovinense* Zapal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, opublikowany on-line.

Mgr Dawid Kocot jest pierwszym autorem każdej z prac, a ostatniej także autorem korespondencyjnym. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów udział doktoranta oszacowano na 35% zarówno w I, jak i II artykule oraz 55% w III. Istotność udziału nie budzi wątpliwości, ponieważ mgr Dawid Kocot współtworzył koncepcje badań, przeprowadził eksperymenty, opracował wyniki oraz brał udział w przygotowaniu manuskryptów do publikacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została opatrzona komentarzem w języku polskim, na który składają się: wykaz skrótów, wstęp teoretyczny, omówienie szczegółowych celów i wyników poszczególnych publikacji wchodzących w skład



rozprawy doktorskiej, podsumowanie oraz bibliografia (67 pozycji literaturowych). Spis literatury obejmuje pozycje z ostatnich lat, jak i starsze, co świadczy o rzetelnym przygotowaniu teoretycznym doktoranta. Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji i doniesień konferencyjnych niewchodzących w zakres pracy doktorskiej, kopie publikacji stanowiących pracę doktorską oraz oświadczenia współautorów dotyczące procentowego udziału doktoranta w danej publikacji.

Ocena merytoryczna

We wprowadzeniu doktorant szczegółowo opisuje obiekty badawcze tj. *Ranunculus illyricum* i *Aconitum bucovinense*, podając pozycję systematyczną i zasięg występowania obu gatunków oraz opisując ich morfologię i biologię kwitnienia. Ponadto określa stopień zagrożenia wyginięciem, co dobrze uzasadnia wybór gatunków do zrealizowanych badań. Doktorant szczegółowo sprecyzował zadania badawcze, które umożliwiły realizację celu, jakim było poznanie biologii rozmnażania jaskra iliryjskiego. Doprowadziło to do określenia potencjału rozmnożeniowego na drodze generatywnej oraz do poznania wydajności rozmnażania wegetatywnego w obrębie stworzonej populacji *ex situ*. Natomiast w przypadku tojadu bukowińskiego celem było opracowanie efektywnego systemu mikrorozmnażania w warunkach *in vitro*, co pozwoliłoby na stworzenie kolekcji roślin do badań nad biologią tego gatunku.

Wyniki badań zawarte w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej weryfikują hipotezę, że gatunki jaskrów, które mogą rozmnażać się wegetatywnie, wykazują mniejszą efektywność podczas rozmnażania generatywnego. Proces rozmnażania to proces niezwykle energochłonny, ponieważ na wytworzenie nasion, a następnie owoców roślina przeznaczają duże ilości składników odżywczych. W przypadku gatunków, które wykorzystują do rozmnażania obie strategie (wegetatywną i generatywną), część związków organicznych przeznaczają na tworzenie specjalnych organów służących do rozmnażania klonalnego. Doktorant przebadał 5 gatunków należących do rodzaju *Ranunculus* oraz *Ficaria verna*, gatunek także należący do rodziny



Ramunculaceae. Porównano gatunki rozmnażające się wyłącznie generatywnie z gatunkami wykazującymi zdolności zarówno do rozmnażania generatywnego, jak i do tworzenia bulwek i rozłogów na podstawie wielu parametrów: analizy żywotności pyłku, budowy słupkowiec, oceny skuteczności zapylenia, rozwoju łagiewki pyłkowej na znamieniu słupka, a także efektywności zawiązywania owoców, żywotności nasion i ich siły kiełkowania oraz wrażliwości na czynniki przerywające spoczynek. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że żywotność pyłku dla badanych gatunków była różna. Ponadto wykazano różnice między gatunkami w kiełkowaniu pyłku na znamieniu słupka, mimo skutecznego zapylenia. Najmniej kiełkujących ziaren pyłku, mimo 100% żywotności, stwierdzono u *R. illyricum*, co pozwoliło doktorantowi sformułować stwierdzenie, że ten efekt wynika z mechanizmów samoniezgodności. Może być to faktycznie przyczyną, **jednakże czy zbadano kiełkowanie pyłku i wzrost łagiewek w warunkach *in vitro*, aby wykluczyć inne przyczyny tego zjawiska. Jakie inne czynniki mogą mieć na to wpływ?** Zbadano także efektywność zawiązywania owoców w odniesieniu do liczby wykształconych w kwiecie słupków. W przypadku tego parametru stwierdzono także, że jaskier iliryjski wykazał się najniższą efektywnością zawiązanymi owoców. Ponadto niezwykle intrygujące wyniki uzyskano dla tego gatunku przy ocenie żywotności nasion i ich zdolności do kiełkowania. Przy 100% żywotności, uzyskano bardzo niską (16%) zdolność do kiełkowania, a zastosowanie stratyfikacji oraz traktowanie GA₃ nie wpływało w istotny sposób na ten proces. W prowadzonych badaniach zastosowano tylko 1 stężenie GA₃, które wynosiło 1 μM. Być może to stężenie było zbyt niskie.. **Na podstawie jakich przesłanek wybrano to konkretne stężenie? Czy można przypuszczać, że przyczyna tak niskiej siły kiełkowania leży raczej po stronie struktury łupiny nasiennej niż wysokiego stężenia ABA w zarodku?**

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Dawid Kocot pozytywnie zweryfikował postawioną hipotezę, że gatunki znacznie efektywniej rozmnażają się generatywnie, jeżeli to jest ich jedyny sposób rozmnażania. Za cenne uzupełnienie stanu wiedzy uważam także przeprowadzoną analizę skupień, która pozwoliła wyodrębnić aż 4 klastery, w których zostały pogrupowane oddzielnie gatunki nieklonalne i apomiktyczne, a



gatunki klonalne różniły się na tyle istotnie, że zostały przydzielone do odrębnych klastrow. Przeprowadzone badania biologii kwitnienia korelują z przyporządkowaniem badanych gatunków do sekcji w obrębie rodzaju *Ranunculus* przeprowadzonego wcześniej na podstawie cech morfologicznych.

Kolejna publikacja to kontynuacja badań nad biologią kwitnienia, jednak w tym przypadku przedstawione wyniki dotyczą wyłącznie *Ranunculus illyricum*, ale zostały one poszerzone o szczegółową analizę poszczególnych etapów cyklu ontogenetycznego tego gatunku. Przeprowadzone badania umożliwiły zweryfikowanie hipotezy, że liczba wykształconych roślin na drodze wegetatywnej w kolejnych sezonach jest równa liczbie uzyskanej z nasion w warunkach *ex situ*. Badania prowadzono przez 3 kolejne lata. Dodatkowo analizowano wpływ temperatury na kiełkowanie nasion. I tu nasuwają się pytania: **czy zastosowanie skaryfikacji nie miałyby istotnego wpływu na ten proces oraz czy w rodzinie Ranunculaceae spotyka się gatunki wymagające skaryfikacji do kiełkowania?** W celu porównania efektywności obu typów rozmnażania doktorant dokonał ciekawej analizy obliczając liczby skupień potomnych uzyskanych z 1 klonu. Ponadto stworzył algorytm wskazujący ile nasion musi wyprodukować roślina oraz jaki jest niezbędny czas, aby uzyskać 1 kwitnący osobnik. W przypadku rozmnażania wegetatywnego obliczeń dokonano na podstawie tylko 1 klonu. **Czym się kierowano przy tym wyborze? Czy tego rodzaju kalkulacja nie byłaby bardziej miarodajna gdyby dotyczyła uśrednionych wyników z większej liczby klonów?** Przeprowadzone badania wykazały, że u *Ranunculus illyricum* rozmnażanie wegetatywne jest bardziej efektywne niż generatywne. Jednak, jak słusznie twierdzi doktorant, rozmnażanie generatywne jest niezbędne do zwiększenia różnorodności genetycznej w obrębie populacji. Za cenne uważam, że doktorant widzi rozmnażanie materiału w warunkach *ex situ* jako jeden ze sposobów ochrony tego gatunku, a co za tym idzie możliwość tworzenia kolekcji zachowawczych, czy zasilania populacji na stanowiskach naturalnych. **Czy doktorant uważa, że takie działania będą wystarczające w celu ochrony jaskra iliryskiego i czy wystarczająco zabezpieczą jego populację *in situ*?** Być może



opracowanie protokołu mikrozmnazania w warunkach *in vitro* dla tego gatunku byłoby zasadne, a nawet konieczne.

Trzecia publikacja zawiera wyniki badań prowadzonych na *Aconitum bucovinense* gatunku endemicznego dla wschodnich i południowych Karpat, krytycznie zagrożonego wyginięciem. Zwieńczeniem tych badań jest opracowanie systemu regeneracji z eksplantatów liściowych na drodze pośredniej organogenezy i aklimatyzacja regenerantów do warunków *ex vitro*. Mgr Dawid Kocot wybrał jako materiał inicjalny liście, kierując się wynikami badań innej grupy badaczy, którzy wskazywali na bardzo długi okres kiełkowania nasion i wysoką śmiertelność siewek. **Czy jednak została podjęta próba wyprowadzenia kultury *in vitro* z nasion? Czy skaryfikacja i odkażenie powierzchniowe łupiny nasiennej nie wpłynęłoby pozytywnie na żywotność siewek?** Mimo bardzo ograniczonego dostępu do materiału wyjściowego wyprowadzono kulturę kalusową, a następnie przy zastosowaniu pożywki z dodatkiem benzyloaminopuryny uzyskano pędy przybyszowe. Jednak na etapie ukorzenia zwiększenie stężenia BAP w pożywce z $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-3}$ do $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-3}$ przy jednoczesnym dwukrotnym wzroście stężenia auksyn uważam za niewłaściwy kierunek. Analizując wyniki wyraźnie widać, że wpływało to na zmniejszenie odsetka ukorzenionych pędów i długości korzeni, a jedynie nieznacznie wpłynęło na wzrost liczby korzeni na pęd. **Czym doktorant kierował się wybierając taki zestaw pożywek do ukorzenia, a nie pożywki zawierające jedynie auksyny? Dlaczego BAP nie została wycofana z pożywki na etapie ukorzenia? Czy obserwowano indukcje kalusa u podstawy pędu przy wzroście stężenia regulatorów wzrostu w pożywce?** Na zdjęciach zaprezentowanych w publikacji słabo widoczna jest ta strefa. **Formowanie pędów przybyszowych na pożywkach ukorzeniających doktorant tłumaczy obniżeniem zawartości soli mineralnych i przedłużeniem czasu pasażu. Czy jednak nie jest to spowodowane obecnością cytokinin w pożywce? Czy są to pędy przybyszowe, czy pachwinowe, na jakiej podstawie została dokonana kwalifikacja?** W opublikowanych wcześniej protokołach mikropropagacji dla wielu gatunków z rodzaju *Aconitum* zastosowano na etapie ukorzenia pożywki zawierające stosunkowo niskie stężenia



IAA, NAA czy IBA. Dobry rozwój systemu korzeniowego i brak obecności kalusa u podstawy pędu, który może ograniczać funkcjonalne połączenie korzeń-pędu, ma kluczowe znaczenie podczas aklimatyzacji.

Natomiast przeprowadzona analiza aktywności peroksydazy podczas ukorzenia pędów potwierdziła wstępną hipotezę, że jej aktywność rośnie podczas indukcji tego procesu i że istnieje korelacja pomiędzy jej aktywnością a efektywnością ukorzenia wyrażona w postaci liczby korzeni na pęd. Jednak nie mogę się zgodzić z twierdzeniem doktoranta, że pożywka charakteryzuje się większą aktywnością peroksydazy, ponieważ enzym syntetyzowany jest w komórkach roślinnych a nie w pożywce.

Przeprowadzono także analizę ploidalności uzyskanych regenerantów i nie wykazano zmian w porównaniu do kontroli (rośliny wyhodowanych z nasion). Jednak nie można wykluczyć zmienności genetycznej w uzyskanych osobnikach, ponieważ zastosowaną metodą można ocenić jedynie duże zmiany w obrębie genomu, tj. powielenie liczby chromosomów, natomiast pojedyncze delecje chromosomów, czy rearanżacja w obrębie genów wymagają zastosowania innych metod badawczych **Czy planowane są takie badania, aby było możliwe wykorzystanie tego materiału do działań konserwatorskich? Jeżeli tak, to jakie metody zostaną użyte.**

Opracowany przez doktoranta system regeneracji dla tojadu bukowińskiego to pierwsze doniesienie dla tego gatunku o uzyskaniu kompletnych roślin na drodze organogenezy pośredniej z fragmentów liści. Mimo niewątpliwego sukcesu, zachęcam do podjęcia próby zwiększenia efektywności tego systemu poprzez podniesienie wydajności etapu ukorzenia, co może przełożyć się na zwiększenie przeżywalności podczas aklimatyzacji do warunków *ex vitro*.

Recenzowaną rozprawę doktorską pod kątem merytorycznym oceniam bardzo dobrze. Uwagi, które nasunęły mi się podczas analizy pracy, nie umniejszają wartości zaprezentowanych wyników, lecz stanowią przyczynek do podjęcia naukowej dyskusji. Podjęty temat uważam, za bardzo istotny. Doktorant wykazał się znajomością nie tylko technik mikroskopowych, ale także metod cytochemicznych, biochemicznych, a także biegłości w wykorzystaniu technik *in vitro* w celu realizacji badań i weryfikacji



postawionych hipotez . Przeprowadzone analizy statystyczne nie budzą wątpliwości, że badania przeprowadzone zostały rzetelnie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca została napisana ładnym językiem i ze szczególną dbałością o poprawną polszczyznę, co sprawia dużą przyjemność podczas czytania.

Badania mgr Dawida Kocota stanowią cenny wkład do wiedzy o biologii zagrożonych wyginięciem gatunków jakimi są jaskier iliryjski i tojad bukowińskiego, a także mogą stanowić element ich ochrony gatunkowe i powinny być kontynuowane.

Wniosek końcowy

W oparciu o przeprowadzoną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Dawida Kocota pt. „Biologia i rozmnażanie rzadkich i zagrożonych gatunków roślin z rodziny Ranunculaceae” stwierdzam, że praca spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi. zmianami) oraz Art. 175 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i Rozporządzeniem Ministra Nauki Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 roku w sprawie dziedzin naukowych i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr Dawida Kocota do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Alina Twejdel