

Warszawa, 31.07.2017 r.

dr hab. Anna Mięka, prof. PAN  
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie  
ul. Prawdziwka 2  
02-973 Warszawa

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr Marty Urbaniec-Kiepur**  
**pt. „Krioprezerwacja nasion i wierzchołków wzrostu lili żłotogłów (*Lilium martagon* L.)**  
**jako metoda ochrony ex situ”**  
**Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Bach**

**Wstęp**

Krioprezerwacja jest narzędziem pozwalającym bezpiecznie i długoterminowo gromadzić materiał biologiczny z jednoczesnym ograniczeniem przestrzeni i kosztów utrzymywania próbek. Narzędzie to wpisuje się w strategię zabezpieczania zasobów genowych w warunkach ex situ.

Chociaż proces witrifikacji, na którym opiera się krioprezerwacja został zdefiniowany już w 1940 roku, to w przypadku roślin obecność wakuol, ściany komórkowej oraz zróżnicowana tolerancja gatunków na warunki stresowe przez wiele lat utrudniały efektywne wprowadzanie tkanek roślinnych do ciekłego azotu (LN). Obecnie opracowane w latach 90-tych ubiegłego wieku techniki krioprezerwacji materiału roślinnego są już dobrze poznane i powszechnie stosowane w tworzeniu banków genów roślin użytkowych. Ze względu na szereg trudności narzędzie to jest jednak w ograniczonym zakresie wykorzystywane w ochronie zasobów genowych dziko rosnących gatunków chronionych i zagrożonych wyginięciem. Dla tej grupy roślin kluczowe jest nie tylko opracowanie metody skutecznego zabezpieczania tkanek w LN, ale również poznanie siedliska, w którym dany gatunek występuje, a tym samym warunków sprzyjających jego reintrodukcji. Tylko takie kompleksowe podejście pozwoli na odniesienie sukcesu i ochronienie gatunków przed ich bezpowrotnym straceniem. Warto tu jeszcze podkreślić, że genetycznie warunkowana tolerancja na stres niskiej temperatury i suszy sprawiają, że poza zarodnikami i nasionami typu orthodox, każdy inny rodzaj materiału roślinnego wymaga indywidualnego dostosowania warunków krio zabezpieczania. Z tego względu podjęta w niniejszej rozprawie doktorskiej problematyka, której celem było poznanie stanowisk naturalnego występowania *Lilium martagon* i opracowanie metody krioprezerwacji dla długoterminowego zabezpieczania tego gatunku w warunkach ex situ jest cennym przedsięwzięciem tej pracy.

**Ocena formalna rozprawy**

Rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji, które ukazały się w latach 2010, 2014 i 2017 oraz streszczenia pokonferencyjnego opublikowanego w książce abstraktów 2<sup>nd</sup> International Symposium on Plant Cryopreservation, które odbyło się w 2013r. w Fort Collins, USA. Łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor*) tych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 1,888, a suma punktów MNiSW przynależnych tym publikacjom - 46.

Autorami publikacji są Doktorantka i Jej Promotor, przy czym Doktorantka jest zawsze pierwszym i korespondencyjnym autorem. Z załączonych oświadczeń wynika, że mgr Marta Urbaniec-Kiepusa uzyskała wszystkie efekty kształcenia przewidziane dla ósmego, doktoranckiego poziomu kształcenia (wg Europejskich Ram Kwalifikacji). Posiada Ona umiejętność rozwiązywania problemów naukowych (wliczając planowanie i wykonywanie badań oraz analizowanie wyników i ich publikowanie) oraz szeroką wiedzę w dziedzinie, którą reprezentuje.

Prace stanowiące dysertację zostały poprzedzone 42-stronicowym opracowaniem składającym się z rozdziałów występujących w klasycznej, monograficznej formie rozprawy doktorskiej. Znajdują się tam: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza i cel badań, metodyka, wyniki i dyskusja, podsumowanie, informacja o źródłach finansowania oraz cytowana literatura (156 pozycji). W końcowej części tego opracowania Doktorantka podsumowała swoją aktywność konferencyjną, zgodnie z którą wyniki badań przedstawiła na 7 konferencjach (w 5 z nich była pierwszym autorem). W tej części rozprawy Autorka zamieściła jedną mapę i 3 ryciny, które porządkują i uzupełniają opublikowane rezultaty badań.

Na załączonej mapie (str. 13) przedstawiającej wybrane do badań w niniejszej rozprawie stanowiska *Lilium martagon*, dwukrotnie zostało wskazane stanowisko 4 i 5; brakuje zaś stanowiska 2 i 3. Rycina 2 w przedstawionym opracowaniu nie ma opisanych osi. Powołanie w tekście na Ryc. 3 na str. 24 jest niewłaściwe, nie pokazuje ona bowiem kielkujących nasion lili złotogłów. Poza tym ta część pracy jest przygotowana starannie, z wykorzystaniem prawidłowej terminologii naukowej.

### Ocena merytoryczna

Cykl opublikowanych prac opatrzony jest wspólnym tytułem, który precyzyjnie odzwierciedla treść rozprawy. **Cel pracy** został jasno określony i konsekwentnie zrealizowany.

**Wstęp** załączonego opracowania porządkuje i poszerza wiedzę, w oparciu o którą zostały wykonane badania. W tej części pracy Autorka krótko scharakteryzowała Babiogórski Park Narodowy, na terenie którego *Lilium martagon* występuje na 9 stanowiskach. Załączona jest tu również charakterystyka badanego gatunku w aspekcie jego wykorzystania w praktyce, oraz nakreślone przyczyny i status zagrożenia. Kolejno omówiona została krioprezerwacja, jej dotychczasowe wykorzystanie oraz czynniki, które wpływają na efektywność tej metody. Czytając zarówno niniejsze wprowadzenie jak i opublikowane prace nie znajduję odpowiedzi na pytanie, **dłaczego spośród wykorzystywanych powszechnie 4 technik krioprezerwacji do zabezpieczenia pąków lili złotogłów została wybrana technika kropli?** W przeglądzie literatury pracy nr 3 Doktorantka podkreśliła wartość prowadzenia badań nad opracowaniem metod gromadzenia fragmentów tkanek, które stanowią dopełnienie zalecanej formy ochrony zasobów roślinnych w postaci nasion. Efektywne metody zabezpieczania tkanek otwierają drogę ochronie zmienności osobniczej populacji roślin chronionych występujących na niekorzystnych stanowiskach uniemożliwiających im wytwarzanie nasion.

**W materiale i metodach** zostały podsumowane wykorzystane w doświadczeniach narzędzia badawcze i materiał roślinny. Doktorantka scharakteryzowała 5 wybranych stanowisk występowania lili złotogłów poprzez określenie ich lokalizacji, typu zbiorowiska,

rodzaju gleby, typu stanowiska (słoneczne, półcieniste, cieniste). Podsumowała krótko również wykonane analizy chemiczne, które objęły określenie: pH gleby, zasolenie, zawartość fosforu i potasu oraz węgla organicznego. Warunki stanowiskowe powiązano z cechami fenotypowymi występujących tam osobników określając: wysokość, długość i liczbę liści oraz liczbę roślin kwitnących. W pracach eksperymentalnych Doktorantka sprawnie posługuje się techniką kultur in vitro, a w przypadku krioprezerwacji techniką kropli zwaną też kropli-witryfikacji. Dokonano ilościowej oceny efektywności krioprezerwacji, oznaczono fluorescencję chlorofilu oraz wydajność tlenową, cytometrycznie określono ploidalność roślin uzyskanych z nasion oraz pąków poddanych krioprezerwacji. Wyniki badań opublikowane w czasopiśmie *CryoLetters* (publikacja nr 2 i 3) są opatrzone analizą statystyczną, której brakuje w danych przedstawionych w publikacji nr 1.

**Wyniki** przedstawione w opracowaniu wykraczają poza dane zawarte w opublikowanych pracach stanowiących niniejszą rozprawę doktorską. Z opracowania dowiadujemy się, że Doktorantka dodatkowo określiła stadia rozwojowe badanych osobników *Lilium martagon* w oparciu o nieinwazyjną metodę bazującą na określeniu liczby liści wytworzonych przez pęd. Te nieopublikowane dane zostały przedstawione na Ryc. 2 i dają one szerszy pogląd na stan populacji tego gatunku na badanych stanowiskach w Babiogórskim Parku Narodowym. Efektem badań ekologicznych (publikacja nr 1) jest poznanie wpływu warunków siedliskowych (glebowych, temperaturowych, oświetlenia) na rozwój roślin, kwitnienie i liczebność występujących tam populacji. W efekcie końcowym znajomość tych uwarunkowań może pozwolić na skuteczniejszą reintrodukcję roślin *Lilium martagon*.

Kolejna publikacja (nr 2) dotyczy opracowania warunków krioprezerwacji nasion. Badania wykazały, że nasiona lili złotogłów są typu orthodox. Można je zdeponować w LN z zachowaniem przeżywalności i zdolności do dalszego rozwoju roślin bez specjalnego przedtraktowania oraz niezależnie od warunków temperaturowych, w których były one przetrzymywane przez okres pół roku od momentu ich zbioru (badano zakres temperatur: 15°C; 5°C; -5°C). Wykazano, że traktowanie LN skraca średni czas kiełkowania nasion o około 6 dni. W dyskusji przedstawiono możliwą przyczynę tego pozytywnego zjawiska. W niniejszej pracy nasiona lili złotogłów przechowywano w LN zaledwie 24 h. **Czy możliwe jest, że długoterminowe przechowywanie w LN nasion badanego gatunku może negatywnie wpływać na ich żywotność? Czy w literaturze można znaleźć przykłady stopniowej utraty żywotności /zdolności do kiełkowania/ materiału roślinnego postępującej wraz z czasem jego przechowywania?**

Celem trzeciej publikacji (nr 3) było opracowanie efektywnego protokołu krioprezerwacji pąków techniką kropli. Pąk zawierał merystem oraz jeden zawiązek liścia. Ten typ eksplantatu określano dalej w pracy mianem merystemu, zgodnie z wyjaśnieniem dokonany w metodyce na stronie 10. Jako przedtraktowanie zastosowano: 1) 4-tygodniowe hartowanie cebul przybyszowych w temperaturze 5°C (kontrola 20°C) i 2) traktowanie izolowanych wierzchołków wzrostu pożywką zawierającą 3 i 6% sacharozę. Optymalizowano czas i temperaturę traktowania roztworem PVS2. Efektem tych badań jest wskazanie protokołu pozwalającego na zabezpieczenie żywotności 100% eksplantatów, z jednoczesnym zachowaniem ich zdolności do odtwarzania roślin na poziomie ponad 93%. Rośliny otrzymane z przechowywanych w LN pąków nie wykazywały zmian fenotypowych oraz różnic w aktywności fotochemicznej. Ponadto nie stwierdzono zmian w ploidalności roślin

otrzymanych z poddanych krioprezerwacji nasion (komunikat nr 4) oraz pąków (powołanie na wyniki badań przygotowywanych do opublikowania). **W przypadku pąków brakuje informacji na temat liczby przebadanych obiektów.** Opis Ryc. 3B sugeruje, że zawartość DNA określono w roślinie poddanej krioprezerwacji, w rzeczywistości w LN przechowywano pąki.

**Dyskusja** przeprowadzona w opublikowanych pracach dotyka podejmowanych wątków badawczych i konfrontuje je z literaturą.

W pierwszym akapicie **podsumowania** Autorka wnioskuje iż niska zawartość fosforu i potasu ma wpływ na ograniczenie kwitnienia roślin. Wydaje się jednak, że przede wszystkim warunki świetlne regulują efektywne kwitnienie roślin lilii złotogłów. Wnioskowanie w tym zakresie jest utrudnione ze względu na liczebność roślin w poszczególnych populacjach, która waha się od 1 do 30.

Za najważniejsze osiągnięcie tej pracy uznaję wykazanie, że krioprezerwacja może być efektywnym narzędziem w zabezpieczaniu nasion i pąków *Lilium martagon*. Ponadto scharakteryzowanie cech osobniczych roślin w badanych populacjach na tle warunków siedliskowych może w przyszłości przyczynić się do zwiększenia powodzenia reintrodukcji tego gatunku.

Chciałabym prosić o dodatkowe odpowiedzi na następujące kwestie związane z tematyką pracy:

1. Proszę o zwięzłe przedstawienie dotychczasowych osiągnięć w zakresie wykorzystania kultur *in vitro* w mikrorozmnażaniu *Lilium martagon*.
2. Które z badanych stanowisk byłoby najodpowiedniejsze/zalecane w przypadku podjęcia się reintrodukcji, tak by szanse na jej powodzenie były jak największe?

### Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa jest wartościowym opracowaniem łączącym badania z zakresu biologii eksperymentalnej roślin i ekologii. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością wielu technik doświadczalnych, zdolnościami koncepcyjnymi, trafnym formułowaniem wniosków, umiejętnościami przygotowania publikacji naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Urbaniec-Kiepurys spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy 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 z dnia 16.04.2003 r. z późn. zm.) i w związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

/dr hab. Anna Mikula, prof. PAN/