

Kraków, 15.11.2022 r.

Dr hab. Paweł Olejniczak, prof. IOP PAN
Centrum Badań i Ochrony Roślin Górskich
Instytut Ochrony Przyrody PAN
w Krakowie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Dawida Kocota pt.:

*BIOLOGIA I ROZMNAŻANIE RZADKICH I ZAGROŻONYCH GATUNKÓW ROŚLIN
Z RODZINY RANUNCULACEAE*

wykonanej w Katedrze Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin
Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie

Promotor: **dr hab. inż. Barbara Nowak**

Promotor pomocniczy: **dr inż. Ewa Sitek**

Przedstawiona do recenzji praca składa się ze zbioru trzech powiązanych tematycznie, anglojęzycznych publikacji naukowych poprzedzonych szczegółowym, zbiorczym omówieniem. Artykuły te poświęcone są zagadnieniom związanym z biologią rozmnażania wybranych gatunków roślin z rodziny jaskrowatych oraz możliwością zastosowania uzyskanych wyników dla ich ochrony. Obserwowany współcześnie dramatyczny spadek liczby gatunków w skali globalnej sprawia, że szczególnie ważne jest podejmowanie wysiłków mogących temu zapobiec. Konieczność prowadzenia działań zmierzających do powstrzymania ginięcia gatunków jest usankcjonowana prawnie zarówno na poziomie regulacji krajowych jak i w skali międzynarodowej, w tym w Konwencji o Różnorodności Biologicznej. Szacuje się, że około 1/3 gatunków roślin naczyniowych na Ziemi jest zagrożona wyginięciem. Konwencja o Różnorodności Biologicznej wskazuje, że najważniejszą potrzebą dla efektywnego powstrzymania ginięcia gatunków roślin, oprócz właściwego zachowania krytycznych siedlisk, jest gruntowne poznanie biologii zagrożonych taksonów oraz podejmowanie działań ochronnych w formie in situ i ex situ. W potrzebę tę znakomicie wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska.

OCENA FORMALNA

Publikacje wchodzące w skład rozprawy to:

1. Kocot D., Sitek E., Nowak B., Kolton A., Stachurska-Swakoń A., Towpasz K. 2022. The Effectiveness of the Sexual Reproduction in Selected Clonal and Nonclonal Species of the Genus *Ranunculus*. *Biology*. 11, 85.
2. Kocot D., Sitek E., Nowak B., Kolton A., Towpasz K. 2022. Reproductive Biology of Dry Grassland Specialist *Ranunculus illyricus* L. and Its Implications for Conservation. *Biology*. 11, 873.
3. Kocot D., Nowak B., Sitek E., Starzyńska-Janiszewska A., Mitka J. 2022. *In vitro* shoot regeneration from organogenic callus culture and rooting of Carpathian endemic *Aconitum bucovinense* Zapal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 151 pp. 177-187.

W każdej z tych publikacji mgr inż. Dawid Kocot jest pierwszym autorem, a w trzeciej również autorem korespondencyjnym. Jego udział w ich powstaniu wynosi odpowiednio 35%, 35% i 50%, a części, za które Doktorant był odpowiedzialny, obejmują cały proces powstawania publikacji, co świadczy o jego znaczącym, twórczym w nich udziale. Czasopisma, w których ukazały się publikacje posiadają wartość wskaźnika cytowań (impact factor) między 2,7 a 5,1, co zapewnia ich globalny zasięg i umożliwia zauważenie uzyskanych wyników przez mogącą z nich skorzystać społeczność. Oprócz publikacji wchodzących w skład rozprawy Doktorant jest współautorem rozdziału w monografii wydanej przez Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz dwóch artykułów naukowych, w tym jednego anglojęzycznego, opublikowanego w *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Pan Dawid Kocoń jest autorem lub współautorem ponad dwudziestu doniesień na odbywających się w Polsce konferencjach krajowych i międzynarodowych. Udział licznych konferencjach świadczy o aktywności Doktoranta. W załączonym do rozprawy zestawieniu nie zostało jednak określone, czy były to ustne wystąpienia Doktoranta, czy np. współautorstwo zaprezentowanego posteru, co wpływa na możliwość zdobywania doświadczenia w uczestniczeniu w dyskursie naukowym, nabywaniu otwartości i krytycyzmu, cech ważnych w rozwoju naukowym.

OCENA MERYTORYCZNA

Tematem pierwszej publikacji jest oszacowanie wybranych parametrów związanych z rozmnażaniem generatywnym roślin oraz ich porównanie dla sześciu gatunków z rodziny jaskrowatych. W publikacji tej przedstawiono konkretnie wyliczone wartości odnoszące się do produkcji potomstwa generatywnego zarówno poprzez funkcje męskie jak i żeńskie, a następnie porównano poszczególne gatunki wykorzystując adekwatne analizy statystyczne. Ponadto autorzy opierając się na postulacie optymalnego podziału ograniczonych zasobów między różne funkcje roślin wysnuli hipotezę, że gatunki mające zdolność do rozmnażania klonalnego będą mniej efektywne pod względem mierzonych aspektów rozmnażania generatywnego niż gatunki rozmnażające się wyłącznie generatywnie. Następnie hipotezę tę testowano przy użyciu analizy skupień i wykazano, że oba gatunki klonalne odróżniają się znacząco od pozostałych pod względem charakterystyki rozmnażania generatywnego. Jednocześnie stwierdzono, że rozmnażanie generatywne u tych gatunków jest mniej efektywne niż u gatunków rozmnażających się wyłącznie generatywnie. Nieoczywistym, a ważnym wynikiem było wykrycie, że zabiegi przerywania spoczynku nasion mogą zmniejszać proporcję nasion kiełkujących, jak to miało miejsce w przypadku *Ranunculus bulbosus*.

Druga publikacja poświęcona jest szczegółowej analizie efektywności dwóch form rozmnażania, wegetatywnego i generatywnego, u jaskra iliryjskiego (*Ranunculus illyricus*) oraz porównaniu ich znaczenia dla utrzymania się populacji tego gatunku. Jaskier iliryjski to gatunek krytycznie zagrożony w Polsce o zaledwie jednym stanowisku potwierdzonym współcześnie na obszarze naszego kraju. Według Polskiej Czerwonej Księgi Roślin gatunek ten wymaga dla skutecznej jego ochrony zabezpieczenia *ex situ* w uprawach w ogrodach botanicznych oraz w bankach nasion. Publikacja dostarcza kluczowych informacji o skuteczności rozmnażania poprzez produkowane wegetatywnie bulwki oraz poprzez struktury generatywne, w tym zarówno nasiona, jak i pyłek. W mojej opinii ten oparty na kilkuletnich badaniach artykuł będzie stanowić fundamentalne opracowanie dla wszelkich podejmowanych działań zmierzających do zachowania w naszej florze jaskra iliryjskiego.

W trzeciej z wchodzących w skład rozprawy publikacji przedstawiono przebieg skutecznej hodowli kultur tkankowych dla nieprzebadanego pod tym względem gatunku, tojadu bukowińskiego (*Aconitum bucovinense*). Gatunek ten jest endemitem Karpat Wschodnich i Południowych, w Polsce jako krytycznie zagrożony występuje na zaledwie dwóch

potwierdzonych stanowiskach, wyłącznie w Bieszczadach. Autorzy po skrupulatnych badaniach w różnych kombinacjach stężeń fitohormonów opublikowali szczegółowy, optymalny protokół hodowli tojadu bukowińskiego obejmujący etapy od inicjacji kultur in vitro, przez organogenezę, ukorzenianie, po aklimatyzację roślin. Użycie jako materiału wyjściowego do hodowli nowych roślin części organów wegetatywnych, jak blaszka czy ogonek liściowy, otwiera nieocenione perspektywy namnażania osobników i ochrony gatunku ex situ. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji ograniczonej możliwości hodowli roślin z nasion. Dodatkowym atutem pracy jest stwierdzenie braku odchyłań ploidalności uzyskanych roślin w stosunku do materiału wyjściowego, co potwierdza możliwość użycia ich w programach ochrony tojadu bukowińskiego.

UWAGI

1. Tytuł rozprawy mylnie sugeruje, że przedmiotem opracowania jest przynajmniej reprezentatywna część zagrożonych gatunków z rodziny jaskrowatych, podczas gdy badane są dwa spośród, jak sam Doktorant przytacza, 18 narażonych na wyginięcie lub zagrożonych w tym taksonie (wg PCzKR). Wydaje się, że w tytule powinno paść przynajmniej określenie „wybranych” w odniesieniu do gatunków.

2. W publikacji pierwszej nie przekonuje mnie sposób weryfikacji jak najbardziej trafnie postawionej hipotezy o mniejszym inwestowaniu w funkcje generatywne u jaskrów mających możliwość rozmnażania wegetatywnego w porównaniu do gatunków nieklonalnych. Co prawda analiza skupień przeprowadzona została na podstawie obiektywnie zmierzonych parametrów związanych z rozmnażaniem generatywnym, ale trzeba pamiętać, że porównywane są zaledwie dwa gatunki klonalne z czterema nie rozmnażającymi się w ten sposób, co jest liczebnością niewystarczającą, by wysnuwać ogólne wnioski o tym, że hipoteza została potwierdzona. Ponadto w pracy skupiono się na tym, że metodycznie wydzielone klonalne taksony mają niższy potencjał rozmnażania generatywnego, ponieważ jest to wyrażone w mniejszej liczbie słupków lub zawiązywania i kiełkowania nasion. Jeśli jednak zwrócić na inne cechy, największą liczbę słupków w kwiecie ma jaskier iliryjski, a jeden z największych wskaźników żywotności pyłku ma ziarnopłon wiosenny, oba gatunki klonalne. Dlaczego te a nie inne cechy wzięto pod uwagę przy stwierdzaniu obniżenia wydatków na rozmnażanie generatywne u gatunków klonalnych?

3. W publikacji drugiej testowano hipotezę, że efektywność rozmnażania na drodze wegetatywnej równa jest efektywności rozmnażania w sposób generatywny. Nie widzę podstaw do sformułowania takiej hipotezy. Z przywoływanej przez Doktoranta teorii optymalnego podziału zasobów między obie formy rozmnażania wynika, że jeżeli jakiś czynnik zewnętrzny zwiększy wydatek na np. rozmnażanie wegetatywne, to zmniejszy się jednocześnie inwestycja w rozmnażanie generatywne. Trudno się zatem spodziewać, stabilnie utrzymywanej, równej efektywności obu form rozmnażania i jest dość oczywiste, że rzetelnie przeprowadzone badania odrzucą taką hipotezę.

Inne uwagi dotyczące tego artykułu odnoszą się do bardziej szczegółowych niejasności.

- Na str. 17. w pierwszym akapicie w sformułowaniu: „...potencjał do rozmnażania wegetatywnego zmieniał się z wiekiem...” nie określono jaki był kierunek zmian, czy potencjał ten wzrastał, czy malał?

- W ostatnim zdaniu tego akapitu ze sformułowania: „...co świadczy o obniżeniu potencjału wraz z wiekiem...” nie wynika o jaki potencjał chodzi.

- Na str. 17. w drugim akapicie pada określenie: „wysoki potencjał do rozmnażania generatywnego...” w odniesieniu do jaskra iliryjskiego. Czy nie stoi to w sprzeczności z wynikami pierwszej publikacji pokazującymi, że efektywność rozmnażania płciowego jest niższa u gatunków klonalnych, w tym jaskra iliryjskiego?


- w tym samym akapicie niewielka ilość zawiązanych nasion jest tłumaczona słabym zapyleniem, co może być konsekwencją ograniczonej dostępności naturalnych zapylaczy w hodowli, lub obcopylnym charakterem kwiatów. Czy Doktorantowi znane są jakieś dane dotyczące obcopylności jaskra iliryjskiego? Ta cecha może być kluczowa dla przetrwania izolowanej populacji klonalnego gatunku, której zmienność genetyczna, przy ograniczonej rekrutacji młodych roślin z nasion, będzie prawdopodobnie spadać, a w związku z tym spadać może szansa na skuteczne zapylenie.

- Na str. 18. w drugim akapicie pada stwierdzenie, że „zakładając najbardziej optymistyczne parametry (...) czyli liczbę nasion na kwiat – 19 i kiełkowanie nasion na poziomie 40%, do uzyskania jednego osobnika potrzebne są nasiona z więcej niż trzech kwiatów”. Skąd wzięto się to wyliczenie, bo przytoczone parametry wydają się niewystarczające dla wyprowadzenia takiego oszacowania?

4. W trzeciej publikacji niejasna jest dla mnie wielkość prób użytych do porównań. Wielkość ta nie jest podana przy tabelach prezentujących wyniki analizy wariancji, a w podrozdziale dotyczącym analizy statystycznej podane jest, że liczba powtórzeń została podana „in the methodology”. Nie znalazłem jednak liczebności poszczególnych grup dla poszczególnych etapów hodowli za wyjątkiem liczby 41 eksplantatów, co nie wyjaśnia, czy obejmuje to łącznie fragmenty blaszek liściowych i ogonków oraz czy liczba ta była jednakowa dla wszystkich analiz. W związku z tą publikacją nasuwa mi się jeszcze jedno pytanie, dlaczego nie porównano sukcesu hodowli w zależności od tego, czy eksplantatem była blaszka liściowa, czy ogonek?

WNIOSEK KOŃCOWY

Przytoczone powyżej uwagi, z których część może sugerować pewne niedociągnięcia rozprawy, nie umniejszają mojego uznania dla znaczenia zaprezentowanych wyników. Praca charakteryzuje się wysokimi walorami poznawczymi i szczególnym znaczeniem praktycznym dla planowania i wdrażania programów ochrony u wybranych gatunków roślin jaskrowatych. Doktorant wykazał się znajomością warsztatu naukowego, umiejętnością prowadzenia prac badawczych, wiedzą teoretyczną i wysokimi umiejętnościami praktycznymi, a zaprezentowana rozprawa stanowi spójny tematycznie zbiór artykułów rozwiązujący problem naukowy. W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Paweł Olejniczak, prof. IOP PAN