

Dr hab. inż. Piotr Salachna, prof. ZUT
Katedra Ogrodnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, 14 marca 2022 r.

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia ...16.03.2022r.

Recenzja pracy doktorskiej Pana magistra Krzysztofa Nowaka
„Zastosowanie pożywek płynnych w kulturach *in vitro* lili złotogłów
(*Lilium martagon* L.)”

Lilia złotogłów to jedna z najbardziej dekoracyjnych roślin ozdobnych rosnących dziko w Polsce, występująca w rozmaitych odmianach botanicznych. Niestety, zarówno gatunek jak i jego odmiany praktycznie nie są spotykane w produkcji ogrodniczej, głównie z powodu niedopracowanej technologii masowej reprodukcji cebul. Potencjał lili złotogłów jest ogromny; może być uprawiana na kwiaty cięte, jako roślina pojemnikowa, atrakcyjna bylina do ogrodów i terenów zieleni, a także być źródłem związków bioaktywnych wykorzystywanych w farmacji i kosmetologii. W dawnych czasach lilia złotogłów służyła najpierw jako pokarm i środek leczniczy, a później dopiero jako ozdoba. Ze względu na imponujące kwiatostany złożone z różowopurpurowych, pachnących kwiatów, rośliny były często pozyskiwane z naturalnych stanowisk i sadzone w otoczeniu domostw. O popularności lili złotogłów w kulturze i obyczajach świadczą jej stylizowane liczne motywy w sztuce ludowej Podhala. Z powodu nadmiernego zbioru cebul dla celów użytkowych, a także zmian w gospodarce leśnej i niekorzystnych zjawisk przyrodniczych lilia złotogłów stała się gatunkiem zagrożonym wyginięciem. Aby zapewnić istnienie lili złotogłów w środowisku przyrodniczym podjęto wiele badań zmierzających do ochrony *ex situ* poprzez m.in. poszukiwanie wydajnych metod reprodukcji gatunku. Kultury *in vitro* są bardzo efektywnym sposobem rozmnażania, zwłaszcza gatunków o niskim przyroście cebul, do których zalicza się lilię złotogłów. Z niekompletnych badań dotyczących optymalizacji warunków prowadzenia kultur *in vitro* lili złotogłów wynika, że do formowania organów przybyszowych lepiej nadają się pożywki stałe, zaś dalszy wzrost regenerantów może być efektywniejszy w kulturach płynnych. Opracowanie kompletnych protokołów masowej produkcji i szybkiej regeneracji jednolitego materiału roślinnego może wymiernie przyczynić się do zwiększenia popularności lili złotogłów w ogrodnictwie. Skuteczne metody namnażania w warunkach *in vitro* można również wykorzystać w celu

odnowy populacji lilii złotogłów zagrożonej wyginięciem. W tym kontekście podjęcie przez Pana magistra Krzysztofa Nowaka ukierunkowanych i spójnych badań nad intensyfikacją rozmnażania lilii złotogłów z wykorzystaniem techniki *in vitro* w pożywkach płynnych należy uznać za szczególnie celowe i oryginalne. Autor w ramach pracy doktorskiej podjął się następujących zadań: inicjacji kultur *in vitro* lilii złotogłów z nasion, indukcji organogenezy, zbadania wpływu stanu fizycznego i składu pożywki na wzrost i aklimatyzację cebul oraz oceny ploidalności uzyskanych regenerantów.

Ogólny opis pracy

Oceniana praca doktorska jest efektem serii eksperymentów naukowych wykonanych w Katedrze Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem promotora Pani dr hab. inż. Anny Kapczyńskiej, prof. URK. Badania zaprezentowane w pracy wpisują się w ważny i aktualny obszar badań nad mikrorozmnażaniem roślin prowadzonych od lat przez Zespół Katedry Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej.

Rozprawa ma charakter klasycznej monografii podporządkowanej tytułowi, zajmującej 105 stron, obejmującej streszczenie w języku polskim i angielskim (1 strona), spis treści (2 strony), wstęp (1 strona), przegląd literatury (35 stron), wykaz skrótów (pół strony), cel pracy (pół strony), materiał i metody (8 stron), wyniki (38 stron), dyskusję (6 stron), wnioski (3 strony) i bibliografię (10 stron). Dla wygody czytającego dobrze byłoby umieszczenie wyjaśnień skrótów przed streszczeniem i przeglądem literatury. Praca zawiera 17 czytelnych tabel i 36 klarownych rycin obejmujących schematy, zbiory zdjęć i wykresów, które trafnie ilustrują omawiane zagadnienia. Pozycji literatury jest 170, przy czym 21 z nich to pozycje w języku polskim, pozostałe są w języku angielskim. Z okresu po 2010 r. pochodzi 41 pozycji. Praca napisana jest w bardzo przystępny sposób i wyróżnia się wysoką starannością edytorską. Nieliczne błędy językowe i stylistyczne zaznaczono bezpośrednio w tekście pracy.

Szczegółowa ocena pracy

Streszczenie w obu wersjach językowych (polskiej i angielskiej) jest rzeczowe, zwięzłe napisane i zawiera najważniejsze informacje, co nie było łatwym zadaniem uwzględniając bardzo obszerną ilość wyników uzyskanych w ramach kolejnych doświadczeń. Jakkolwiek

dodanie informacji, co stanowiło problem badawczy oraz jakie znaczenie poznawcze i aplikacyjne mają uzyskane wyniki, uczyniłoby streszczenie jeszcze bardziej atrakcyjnym.

Wstęp pracy zawiera mocną argumentację podjętych doświadczeń w szerokim kontekście aktualnego stanu badań. Doktorant w sposób kompletny uzasadnia wybór lili złotogłów jako materiału do badań. Zwraca także uwagę nad czym należy pracować, aby uzyskać wysoką wydajność rozmnażania gatunku zapewniającą jednocześnie odpowiednią jakość i powtarzalność cech otrzymanego materiału roślinnego. Autor trafnie dostrzega problemy badawcze związane z mikrorozmnażaniem lili złotogłów i w dojrzały sposób uzasadnia podjęcie wykonanych badań.

Przegląd literatury jest usystematyzowanym i wyczerpującym zbiorem poprawnie dobranej literatury w języku polskim i angielskim, związanej z tematem podjętych badań. Doktorant jasno i poprawnie omawia poszczególne zagadnienia dotyczące systematyki i charakterystyki lili złotogłów oraz metod rozmnażania lili zamieszczając wiele cennych wiadomości. W estetyczny sposób prezentuje własne fotografie przedstawiające cechy morfologiczne roślin. Najobszerniejsza część przeglądu literatury, podzielona na osiem rzeczowych podrozdziałów, poświęcona jest rozmnażaniu lili z wykorzystaniem technik *in vitro*. Ta część stanowi bardzo dobre przedstawienie wiedzy na temat mikrorozmnażania lili. Autor skupia się w dużej mierze na badaniach dotyczących rodzaju eksplantatu i ukierunkowania inicjacji kultur, raportując w tabeli obszerne dane na ten temat dla ponad stu taksonów lili. Podobnie bardzo wartościowe są zebrane w tabelach wyniki badań dotyczących wydajności rozmnażania różnych taksonów lili w kulturach *in vitro* na pożywkach stałych oraz wyniki badań obejmujących wykorzystanie kultur płynnych. Dzięki tym zestawieniom można z łatwością porównywać dane szczegółowe o rodzaju eksplantatu, składzie pożywki, warunkach i typach prowadzenia kultur oraz wydajności namnażania. Fragment przeglądu literatury związany z wpływem chłodzenia cebul lillii na ich wzrost i rozwój mógłby być głębiej potraktowany, podobnie jak część poświęcona ploidalności komórek lili w warunkach *in vitro*, która jest opracowana bez szerszego ujęcia omawianej problematyki w stosunku do pozostałych rozdziałów.

Naczelnym **Celem pracy** było opracowanie wydajnej metody rozmnażania lili złotogłów z wykorzystaniem techniki *in vitro* z użyciem pożywek płynnych. W celach szczegółowych Autor pracy koncentruje uwagę na (i) ocenie intensywności formowania organów w zależności od stanu fizycznego i składu pożywki, (ii) wpływie stanu fizycznego pożywki oraz efektu następczego stosowanych pożywek różniących się składem i typem na

przyrost biomasy cebul, (iii) okresowym przechowywaniu uformowanych cebul w warunkach niskiej temperatury oraz wpływie tego czynnika na aklimatyzację i wzrost roślin *ex vitro* oraz (iv) oznaczeniu stopnia ploidalności zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin. Wszystkie postawione cele pracy zostały logicznie sformułowane w związku z wcześniej sprecyzowaną hipotezą badawczą. W tej części pracy jedyne zastrzeżenie budzi brak informacji w hipotezie, w stosunku do czego konkretnie Autor zakłada większą wydajność formowania cebul przybyszowych lili.

Materiał i metody przyjęte w pracy jasno definiują obiekt badań, układy badawcze i procedury eksperymentalne. Opis poszczególnych metodyk stosowanych w laboratorium jest dokładny i wyczerpujący. Wyjściowy materiał badawczy stanowiły nasiona lili złotogłów trzech różnych populacji, pochodzące z wolnego zapylenia. Skrupulatne i obiektywne metody oceny kiełkowania w warunkach *in vitro* pozwoliły na wybór jednej populacji cebul do dalszych badań. W fitotronie założono dwa główne doświadczenia związane z mikrorozmnażaniem. Pierwsze obejmowało indukcję organogenezy na fragmentach siewek z zastosowaniem pożywek różniących się stanem fizycznym (pożywka płynna lub stała), składem podstawowym (50% lub 100% MS), zawartością sacharozy (3% lub 6%) i obecnością lub brakiem regulatora wzrostu NAA i/lub BA. W drugim doświadczeniu badano wzrost cebul przybyszowych w zależności od stanu fizycznego pożywki (pożywka płynna lub stała), jej składu podstawowego (50% lub 100% MS) i obecnością lub brakiem regulatora wzrostu NAA. Za każdym razem kultury prowadzono 16 tygodni, a następnie przeprowadzono wymagające czasu i ogromnego zaangażowania obserwacje morfometryczne. Po zakończeniu eksperymentu przeprowadzono interesujące badania histologiczne tkanek zawiązków cebul przybyszowych wykorzystując techniki mikroskopowe. W doświadczeniu dotyczącym aklimatyzacji cebul prowadzonym w pokoju wzrostowym badano, jak chłodzenie wpływa na vegetację roślin uzyskanych z pożywek płynnych i stałych. Na zakończenie doświadczeń przeprowadzono ocenę ploidalności regenerantów za pomocą cytometru przepływowego. Uzyskane wyniki Autor pracy opracował statystycznie za pomocą standardowych analiz nie budzących zastrzeżeń. Mam dwa pytania do części metodycznej pracy: 1. Na jakiej podstawie przyjęto długość kultury wynoszącej 16 tygodni (7 pasaży) i czy można byłoby ten okres skrócić? 2. Ile trwał dokładnie okres vegetacji roślin w czasie aklimatyzacji zważywszy na fakt, że ostatnie zasilanie roślin nawozem miało miejsce po 18 tygodniach uprawy?

Wyniki pracy Autor starannie przedstawia w jedenastu podrozdziałach z wykorzystaniem czytelnych tabel i barwnych wykresów słupkowych zawierających

komunikatywne opisy. Dokumentacja zgromadzonych danych jest uwiarygodniona dodatkowo licznymi fotografiami pozwalającymi czytelnikowi pracy na śledzenie poszczególnych prac badawczych. Rozdział otwiera opis uzyskanych wyników dotyczących kiełkowania nasion i rozwoju siewek lilii złotogłów. Doktorant oceniając masę cebul i korzeni (nie podano w pracy niestety jaką) przeznaczył do kolejnych etapów badań materiał roślinny uzyskany z nasion zebranych na Pogórze Wielickim. W toku prac okazało się, że z fragmentów korzeni nie uzyskano pąków przybyszowych ani kalusa, zarówno w pożywkach płynnych, jak i kontrolnej zestalonej agarem. Z kolei fragmenty łusek pozyskane z cebul siewek były bardzo dobrym materiałem do indukcji organogenezy przybyszowej. Porównując powstawanie pąków przybyszowych i formowanie kalusa z fragmentów łusek na pożywce zestalonej i w pożywce płynnej, większą wydajność indukcji cebul przybyszowych, korzeni, liści i kalusa uzyskano w pożywce płynnej. Następnie Autor sprawdził, jaki wpływ na organogenezę przybyszową ma skład pożywki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdził, że (i) poziom MS nie wpłynął na liczbę inicjowanych cebul przybyszowych, (ii) stężenie sacharozy na poziomie 6% w porównaniu do 3% hamowało inicjację cebul przybyszowych z fragmentów łusek lilii, (iii) pożywka płynna bez regulatora wzrostu albo wzbogacona w NAA pozwalała na indukcję podobnej liczby cebul przybyszowych. Doktorant analizował także występowanie niepożądanego zjawiska witrifikacji (nadmiernego uwodnienia tkanek) towarzyszące kulturom płynnym i wykazał, że zwiększenie zawartości sacharozy do 6% ograniczało witrifikację tkanek. Kolejnym etapem pracy było uzyskanie jak największego przyrostu masy cebul otrzymanych w pierwszym etapie badań. Autor stwierdził, że w pożywkach płynnych rośliny charakteryzowały się większym przyrostem świeżej masy eksplantatu i świeżej masy cebul, większą średnicą i wysokością cebul oraz liczbą łusek w porównaniu do roślin z pożywki stałej. Kontynuując ten aspekt badań Autor sprawdził, czy wzrost cebul zależy od składu pożywek płynnych. Okazało się, iż niezależnie od obecności NAA, większy przyrost świeżej masy całych eksplantatów uzyskano na pożywce z 100% ilością MS, zaś większy przyrost świeżej masy cebul wykazano na pożywce z 50% ilością MS. W ostatnim etapie rozmnażania *in vitro*, gdzie badano wpływ chłodzenia na aklimatyzację roślin, Doktorant wykazał, że większość uzyskanych w pożywce płynnej cebul weszła w stan spoczynku, a zastosowany w badaniach 6 tygodniowy czas chłodzenia wpłynął na przerwanie spoczynku u większości cebul rosnących na pożywce stałej. Sekcję wyników zamykają dwa histogramy prezentujące zawartość jądrowego DNA w komórkach rośliny kontrolnej i rośliny uzyskanej na pożywce 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem NAA. Z danych wynika, że nie doszło do zmian w ilości DNA.

Konieczne jest wyjaśnienie, dlaczego zaprezentowano wyniki dla jednego rodzaju pożywki, skoro w metodyce jest informacja, że próby wybrano losowo z każdej pożywki.

Dyskusja zawiera zgrabne podsumowanie wyników i ich szczegółowe porównanie z licznymi danymi literaturowymi. Doktorant ostrożnie interpretuje swoje wyniki na tle dostępnych danych uzyskanych przez inne zespoły naukowe, wskazując na podobieństwa lub różnice. Uzyskane dane z pierwszego etapu badań uszczegółwiają dotychczasową wiedzę związaną z etapami kiełkowania nasion i rozwoju siewek lili *złotogłów*. W części poświęconej indukcji organogenezy Autor stwierdza, że na fragmentach korzeni nie obserwowano pąków przybyszowych ani kalusa. Cenna byłaby w tym miejscu próba rozbudowania wątku i wyjaśnienia przyczyn braku kompetencji korzeni do zaindukowania organogenezy. Czy fakt, że lilia *złotogłów* kiełkuje podziemnie, czyli najpierw tworzy z korzenia zarodkowego cebule, a dopiero po jarowizacji podejmuje intensywny wzrost liści i korzeni może mieć w tej kwestii znaczenie? Autor potwierdza doniesienia o większej efektywności pożywek płynnych w stosunku do pożywek stałych w indukcji cebul przybyszowych, korzeni, liści i kalusa ale bez odpowiedzi pozostaje pytanie dlaczego płynne pożywki są skuteczniejsze. Bardzo proszę Pana magistra Krzysztofa Nowaka o zaproponowanie przekonującego wyjaśnienia. Kolejna część dyskusji skupia się na wpływie składu pożywek na organogenezę. Doktorant uważnie systematyzuje uzyskane wyniki w odniesieniu do indukcji cebul, korzeni i liści i konfrontuje je z bogatą literaturą, a następnie zwraca uwagę na problem nadmiernego uwodnienia kultur, który jak wynika z przeprowadzonych badań, można ograniczyć zwiększając poziom sacharozy w pożywce. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób skład pożywki może wpływać na witrifikację eksplantatów. Dyskusja wyników w zakresie wpływu stanu fizycznego i składu pożywek na wzrost cebul, aklimatyzację roślin i ocenę ploidalności ma w większości charakter opisowy, bez prób rozważania o zaobserwowanych zależnościach. Dlatego w tym miejscu proszę Autora o uzasadnienie sformułowanych zaleceń, aby czas chłodzenia dla cebul z pożywek płynnych wydłużyć o więcej niż badane 6 tygodni, a także proszę o odpowiedź na pytanie dlaczego kontrola cytologiczna roślin produkowanych w kulturach *in vitro* jest tak potrzebna.

Wnioski zostały oryginalnie zredagowane i logicznie pogrupowane zgodnie z przebiegiem poszczególnych badań i stanowią razem skuteczną procedurę rozmnażania *in vitro* lili *złotogłów* mogącą znaleźć zastosowanie zarówno dla celów naukowych, hodowlanych jak i komercyjnych. Ostatni wniosek kończy konkretny schemat namnażania

roślin, który można wykorzystać przy opracowywaniu procesu produkcyjnego *in vitro* lili złotogłów w szerszej skali z wykorzystaniem bioreaktorów.

Podsumowanie

Bardzo wysoko oceniam pracę doktorską Pana magistra Krzysztofa Nowaka, która wnosi nowe i ważne dla nauk ogrodniczych informacje zarówno w warstwie teoretycznej jak i aplikacyjnej. Doktorant bardzo starannie przeprowadził doświadczenia ze znajomością technik *in vitro*, a uzyskane wyniki właściwie opisał i zinterpretował. Autor wykazał się umiejętnością formułowania i rozwiązywania złożonych problemów badawczych, krytyczną analizą wyników i biegłością ich interpretacji na tle zebranej literatury. Najważniejszym osiągnięciem ocenianej pracy doktorskiej jest opracowanie powtarzalnej i efektywnej metody masowego rozmnażania lili złotogłów w pożywkach płynnych w kulturze *in vitro*, z zamiarem jej zastosowania w przyszłości w kulturach bioreaktorowych. W efekcie badania Doktoranta przyczynią się do popularyzacji lili złotogłów wśród producentów i miłośników roślin. Ponadto w aspekcie ochrony *ex situ*, opisane protokoły intensywnego namnażania lili złotogłów mogą być wykorzystane do stałego utrzymywania materiału gotowego do introdukcji gatunku czy jego botanicznych odmian w ramach ewentualnych programów zasilania lub odtwarzania populacji na stanowiskach naturalnych. Opracowane w pracy zalecenia rozmnażania gatunku powinny jak najszybciej znaleźć powszechne zastosowanie w praktyce.

Przedstawiona praca doktorska spełnia wszystkie warunki określone dla rozpraw doktorskich określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Pana magistra Krzysztofa Nowaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Seledź