

Warszawa, 4.04.2022 r.

Dr hab. Andrzej Pacholczak, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Roślin Ozdobnych INO
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Nowaka
pt. „Zastosowanie pożywek płynnych w kulturach *in vitro*
lilii złotogłów (*Lilium martagon* L.)”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Kapczyńskiej, prof. URK
w Katedrze Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Wydziału Biotechnologii
i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie**

Praca doktorska Pana Krzysztofa Nowaka dotyczy mikrorozmnażania cennego gatunku ozdobnego jakim jest lilia złotogłów (*Lilium martagon* L.). Ta cebulowa roślina zasługuje na uznanie ze względu na naturalne występowanie na terenie Polski i możliwe zagrożenie populacji wyginieciem. Od zawsze gatunki ozdobne narażone były na niszczenie lub nielegalne przenoszenie ze stanowisk naturalnych do prywatnych kolekcji. Lilia złotogłów oprócz niezwykle dekoracyjnych kwiatów, posiada także właściwości lecznicze wykorzystywane dawniej w medycynie ludowej, co dodatkowo potęgowało niszczenie naturalnych populacji tego gatunku. Ważne jest więc poświęcenie badań i wykorzystanie nowoczesnych technik jakimi obecnie dysponujemy, celem opracowania jak najbardziej efektywnej metody rozmnażania tego wartościowego gatunku. Zwiększenie na rynku dostępności materiału nasadzeniowego zmniejszy pozyskiwanie roślin ze stanowisk naturalnych, za czym idzie ochrona populacji przed niszczeniem przez ludzi.

I w tym miejscu nasuwa się moje pierwsze pytanie: czy można/czy powinno się wykorzystać materiał otrzymany *in vitro* w celu zasilenia naturalnych populacji roślin zagrożonych wyginieciem? Proszę o uzasadnienie swojego stanowiska w tej sprawie.

Celem przedstawionych w pracy badań było opracowanie wydajnej metody mikrorozmnażania lili złotogłów z wykorzystaniem pożywek płynnych, co może przyczynić się do intensyfikacji procesu namnażania cebul przybyszowych oraz poszerzy wiedzę na temat reakcji roślin na warunki kultury płynnej. Przedstawiona praca jest stosunkowo obiecującym opracowaniem wielotorowych badań nad różnymi aspektami mającymi wpływ na namnażanie lili w kulturach *in vitro*. Jako zwolennik łączenia nauki z jej praktycznym zastosowaniem, mogę na wstępie stwierdzić, że praca zdecydowanie ma potencjał do bezpośredniego wdrożenia (w tym produkcji w bioreaktorach), co jest jej wielką zaletą.

Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy 105 stron i składa się z 9 głównych rozdziałów. Treść wzbogacono 17 tabelami i 36 rycinami (w skład których wchodzi fotografie i wykresy). Całość pracy zgodnie ze spisem literatury oparto na 170 pozycjach, z czego jednak jednej pozycji ze spisu brak w tekście, zaś 2 cytowanych w tekście nie ma w spisie literatury.

Rozdział **Wstęp** jest krótki i treściwy. Wprowadza w tematykę pracy i uzasadnia celowość podjętych badań nad mikrorozmnażaniem lili złotogłów (*Lilium martagon* L.),

gatunku niewątpliwie ozdobnego, jednak w Polsce objętego ochroną gatunkową ze względu na zagrożenie wyginięcia populacji głównie z powodu ścinania atrakcyjnych kwiatów.

Rozdział **Przegląd literatury** zawarto na 34 stronach, z czego 15 stron zajmują obszerne tabele (łącznie 3) przedstawiające zbiór dotychczasowych osiągnięć z zakresu mikrorozmnażania gatunków z rodzaju *Lilium*, poświęcone poszczególnym zagadnieniom: od wydajności namnażania na różnych pożywkach, aż po typ wykorzystanych eksplantatów pierwotnych i wtórnych. Całość przeglądu literatury podzielono na 4 główne rozdziały i 8 podrozdziałów dla tematu poświęconego ściśle tematyce pracy, czyli rozmnażaniu lili w kulturach *in vitro*.

W przeglądzie literatury Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością tematu i właściwego doboru pozycji do przedstawienia podjętej w pracy problematyki. Przedstawił systematykę rodzaju *Lilium* wraz z przyjętą klasyfikacją ogrodniczą poszczególnych grup lili ogrodowych, a następnie szczegółowo opisał występowanie, morfologię i cykl rozwojowy gatunku jakim zajmował się w pracy (*L. martagon* L.). Znaczącą część przeglądu literatury doktorant poświęcił metodom rozmnażania lili, co uważam za bardzo ważny aspekt w kontekście przeprowadzonych w pracy badań. Powszechnie stosowaną metodą rozmnażania wegetatywnego wszystkich gatunków i odmian lili jest otrzymywanie cebul przybyszowych z łusek cebuli matecznej (tzw. łuskowanie). Jest to stosunkowo prosty sposób reprodukcji, jednak z jednej łuski otrzymuje się przeciętnie 3 cebule potomne, a z jednej dużej cebuli matecznej można odłamać średnio 30 łusek. Następnie Doktorant słusznie wskazał, że technika *in vitro* gwarantuje wysoką wydajność rozmnażanie roślin w porównaniu do tradycyjnie wykorzystywanych metod. W tym fragmencie Autor przedstawił możliwość wykorzystania podczas mikrorozmnażania lili wybranych typów regeneracji i warunkujących je czynników, a także różnych eksplantatów oraz pożywek z różnymi modyfikacjami. Zakończeniem rozdziału jest przedstawienie problematyki aklimatyzacji lili oraz następczego wpływu czynników z fazy namnażania *in vitro* cebul, na ten etap. Krótko wspomniano też w ostatnim podrozdziale o możliwości zmian liczby chromosomów w materiale uzyskanym *in vitro*.

Na duże uznanie zasługuje bogaty zbiór dostępnych w literaturze danych, dotyczących poszczególnych zagadnień związanych z mikrorozmnażaniem lili, zebrany w 3 kilkustronicowych tabelach, co wskazuje na dogłębną analizę tematu przez Autora oraz ogromną pracę włożoną w stworzenie takiego zestawienia opartego na tylu pozycjach.

Rozdział **Materiały i metody** został skonstruowany prawidłowo i dość szczegółowo na 7 stronach, jednak brak jest zachowania konsekwencji podrozdziałów w odniesieniu do omawianych dalej wyników. W przypadku oceny kiełkowania nasion, doktorant powołuje się na współczynnik Piepera (przyjęta poprawna forma nazwiska to Pieper, a nie Piper), jednak brak jest właściwego źródła literatury: powinno cytować się pierwszego autora publikującego dane wyniki/czy wzory, a nie inną (późniejszą) publikację, w której tylko wykorzystano czyjeś dane źródłowe. W tym przypadku powinna pojawić się publikacja: Pieper G, Eggebrecht H. 1952. Das Saatgut (...), chyba, że zastosowano modyfikację wzoru Piepera w publikacji Dorywalskiego i in. 1964 i to ją wykorzystano w pracy? Jeśli tak, to brak o tym wzmianki w pracy. Na pewno należy zwrócić uwagę na prawidłowy opis stosowanych wzorów, gdyż niestety w w/w wzorze dotyczącym współczynnika kiełkowania nie sporządzono właściwej legendy wykorzystanych symboli. W przypadku umownej skali opracowanej dla oceny kalusa pomocnym mogłoby się okazać zamieszczenie zdjęcia odpowiadającego jej opisowi. W

podrozdziale 5.3.2. pojawia się termin pobrania próbek do analiz histologicznych, gdzie autor wskazuje na utrwalenie prób po 12 tygodniach od założenia doświadczenia inicjacji organogenezy. Jest to jednak sprzeczne z informacjami umieszczonymi w wynikach (po 16 tygodniach).

Analiza statystyczna nie została opisana szczegółowo pod kątem poszczególnych doświadczeń, co jest trudne przy późniejszej interpretacji wyników (w zależności od doświadczenia pojawia się analiza jedno-, dwu- lub trzyczynnikowa). Mimo przedstawienia niektórych wyników w procentach, w opracowaniu statystycznym nie ma wzmianki o przeprowadzonej transformacji danych. ***Czy taka transformacja została wykonana? Oraz czy nie zasadnym było wykorzystanie tylko 3-czynnikowej analizy wariancji dla wyników z etapu namnażania?***

W metodyce brakuje jednak uzasadnienia celowości wykonania oceny ploidalności otrzymanych roślin. Zagadnienie ogólnie potraktowano pobocznie zaczynając od przeglądu literatury, przez wspomnianą metodykę, aż do opisu otrzymanych wyników.

Rozdział **Wyniki** został opracowany bardzo szczegółowo. Zebrane dane są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają możliwości praktycznego wykorzystania do szybkiego namnażania cebul przybyszowych w kulturach płynnych. Ponadto przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki mogą być podstawą do opracowania protokołów rozmnażania dla innych ważnych roślin cebulowych.

W pierwszym punkcie wyników Doktorant opisał skuteczną inicjację kultur z wykorzystaniem dezynfekcji powierzchniowej nasion lilii złotogłów. Następnie przedstawiono proces kiełkowania nasion i rozwoju siewek lilii złotogłów w warunkach *in vitro* z podziałem na cztery etapy, co dodatkowo zilustrowano autorską ryciną. W kolejnym punkcie opisano wyniki dla organogenezy przybyszowej, gdzie wskazano że na wyłożonych fragmentach korzeni nie obserwowano formowania organów przybyszowych, zaś korzenie w miarę trwania kultury zamierały. Zatem do dalszych doświadczeń wykorzystano jedynie łuski cebulowe, na których organogeneza zachodziła z intensywnością zależną od zastosowanej pożywki. Źródłem energii dla regenerujących w kulturach *in vitro* eksplantatów są węglowodany, zaś stan skupienia pożywki wpływa zazwyczaj na współczynnik regeneracji. Doktorant wykazał, że stężenie sacharozy, która jest najczęściej wykorzystywanym źródłem węglowodanów w pożywce ma istotny wpływ na inicjację cebul przybyszowych u lili, a jej zawartość poniżej 3% ogranicza liczbę inicjowanych cebul przybyszowych oraz ogranicza ich wzrost. Niezależnie od stężenia sacharozy, na pożywce płynnej z jednego eksplantatu można uzyskać istotnie więcej cebul przybyszowych (oraz korzeni i liści), oraz prawie 3-krotnie więcej kalusa, w porównaniu do pożywki stałej. Istotną obserwacją jest pojawiające się zjawisko wityfikacji, która stanowi częsty problem w kulturach tkankowych. Doktorant wykazał, że ta niepożądana deformacja tkanek, objawiająca się nadmiernym uwodnieniem, pojawia się w trakcie namnażania cebul w kulturach płynnych, zaś w ogóle nie obserwowano tego zjawiska na pożywkach zestalonych agarem. I w tym miejscu stawiam następane pytania: ***Z czego może to wynikać? Jakie są najczęstsze powody występowania wityfikacji? Czy jest to proces odwracalny?***

Do ukierunkowania, przyspieszenia oraz zwiększenia wydajności indukcji i regeneracji roślin w kulturach *in vitro* wykorzystuje się regulatory wzrostu dodawane w różnych stężeniach i kombinacjach do pożywki. Autor oceniając wpływ egzogennych regulatorów wzrostu (niezależnie od pozostałych czynników) dowiódł, że największą liczbę cebul przybyszowych

(średnio 20 sztuk na jeden eksplantat) i korzeni (średnio 24 sztuki jeden eksplantat) można otrzymać na pożywkach bez regulatorów wzrostu oraz na pożywkach wzbogaconych w 0,54 μM NAA. Cytokina BA zaś wpływa na zmniejszenie liczby powstających cebul i korzeni. Ciekawym aspektem wyników jest wykazanie następczego efektu pożywki inicjalnej na przyrost cebul w kolejnych etapach. Przyrost świeżej masy cebul inicjowanych na pożywkach zawierających 100% MS (niezależnie od zawartości regulatora wzrostu) na pożywce wzrostowej (niezależnie od jej stanu skupienia), był 1,5 razy większy w porównaniu do pożywki zawierającej 50% MS. Z jednej strony otrzymane wyniki są oczywiste, gdyż większa zawartość substancji zgromadzonych w cebulach dzięki pełnowartościowej pożywce powinna skutkować takimi właśnie rezultatami, jednak w literaturze trudno jest znaleźć udokumentowanie aspektów związanych z konsekwentną reakcją eksplantatów, co stanowi dużą wartość rozprawy Doktoranta i dzięki czemu wyniki te będą chętnie cytowane po opublikowaniu. Pod koniec rozdziału przedstawiono wyniki dotyczące wpływu chłodzenia cebul lilii złotogłów na ich późniejszą aklimatyzację. Na procent cebul zaaklimatyzowanych nie miało wpływu chłodzenie (zaaklimatyzowało się średnio około 82%), jednak etap ten istotnie wpłynął na czas pojawienia się liści.

Niewiele do pracy wnoszą wstawione na końcu wyniki analizy ploidalności otrzymanych roślin. Jak wykazał Doktorant, analizy stopnia ploidalności zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin nie wykazały zmian zawartości DNA w jądrach komórkowych. Otóż do badań pobrano materiał z zaaklimatyzowanych roślin, które otrzymano *in vitro* w ciągu ok. 16 tygodni trwania kultury. Przy tak krótkim czasie, bez stwarzania szczególnie stresowych warunków, praktycznie nie było możliwości wystąpienia zmian w DNA. Doktorant potwierdza to w przytoczonej literaturze, gdzie jakiegokolwiek zmiany ploidalności obserwowano właśnie dopiero po kilkuletnim namnażaniu cebul *in vitro*. ***W tym miejscu nasuwa się pytanie o celowość przeprowadzonych badań dotyczących ploidalności. Ponadto proszę o wskazanie, jakie są inne metody oceny ewentualnych zmian genetycznych, które mogą pojawić się w materiale otrzymanym in vitro?***

Mam też kilka ogólnych uwag do całego rozdziału. Wyniki przeanalizowano oddzielnie dla poszczególnych zmiennych (stanu skupienia pożywki, jest składu, stężenia w niej sacharozy, oraz regulatorów wzrostu), co jest nieadekwatne do Tabeli 4 przedstawiającej układ doświadczenia. Ponadto brakuje analogicznych punktów do zawartych w metodyce, w wyniku czego utrudnione jest odnalezienie stosownych fragmentów m. in. podrozdziału „Badania histologiczne” które są opisane w ciągłym tekście wyników. Dla łatwego odbioru powinno się uporządkować treść rozdziału tak, by opisy wyników korespondowały z ich graficznym przedstawieniem (w obecnej formie trzeba szukać powiązanych treści opisów i rycin nawet kilka stron od siebie). Ponadto przyjęło się, że wyniki doświadczeń powinny być formułowane w czasie przeszłym, co doktorant starał się robić, jednak w wielu miejscach nie zostało to zastosowane. Doktorant wymiennie stosuje w opisie wyników „stężenie MS” oraz „zawartość MS”, gdzie ani jedno ani drugie sformułowanie nie jest zbyt fortunnym określeniem i może wprowadzać w błąd.

Niewątpliwym osiągnięciem pracy doktorskiej mgr. inż. Krzysztofa Nowaka jest:

- wykazanie, że zastosowanie pożywki płynnej znacząco zwiększa wydajność formowania cebul przybyszowych;

- wykazanie powiązania między zastosowaniem płynnych kultur, a występowaniem zjawiska witryfikacji;
- opracowanie optymalnej pożywki do efektywnego namnażania w kulturach *in vitro* lili złotogłów, mianowicie płynnej 50% MS, z dodatkiem 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu, co ma bezpośrednie znaczenie wdrożeniowe;
- wykazanie, że chłodzenie przed aklimatyzacją cebul otrzymanych *in vitro* w 3°C, wpływa na częstszy rozwój u nich liści w warunkach *ex vitro* w porównaniu do cebul niechłodzonych.

Rozdział **Dyskusja** została przeprowadzony poprawnie na 6 stronicach, jednak nie poruszono wszystkich zagadnień, którymi zajmował się doktorant, tj. pominięto przedyskutowania badań histologicznych. Małym mankamentem dyskusji jest jednak oparcie niektórych wywodów i zagadnień na stosunkowo starej literaturze (lata 90-te), gdzie tematyka pracy związana z kulturami *in vitro* roślin cebulowych ma wiele adekwatnych pozycji z ostatnich kilku lat. Podważa to wiarygodność tych zestawień i wysnutych na ich podstawie przemyśleń. Należałoby to zmienić podczas przygotowywania publikacji opartej na niniejszej rozprawie.

Jako innowacyjność pracy można by uznać zastosowanie pożywek płynnych i kultur zawieszinowych do rozmnażania *Lilium martagon*, których wpływ na regenerację testowano u innych genotypów z tego rodzaju. Warto to podkreślać, gdyż w przedstawionej dyskusji mgr inż. Krzysztof Nowak wielokrotnie powołuje się na publikację Rybczyńskiego i Gmolińskiej z 1989, która stanowi właśnie o mikrorozmnażaniu lili złotogłów i już w niej autorzy wykazali wiele aspektów, które w swojej pracy powielił Doktorant (m.in. korzystny wpływ NAA i hamujące działanie BA na inicjację cebul tego gatunku).

Podkreślić należy dobrze przedyskutowany fragment wyników dotyczący różnych czynników wpływających na organogenezę, gdzie autor prawidłowo podszedł do każdego badanego aspektu jednostkowo z wykorzystaniem wielu pozycji literatury do poparcia swoich wyników.

Wnioski obejmują wszystkie etapy i doświadczenia przeprowadzone w pracy. Zdecydowanie jest to najsłabszy punkt pracy, gdyż większość wniosków została źle sformułowana i stanowią powtórzenie, czy też streszczenie wyników, przez co jest ich aż 17. Na uznanie zasługuje jednak podsumowanie osiągnięć pracy w formie syntetycznie ujętej graficznie procedury, która może stanowić dodatkową wartość wdrożeniową przeprowadzonych badań. Jednak nie powinna ona być ujęta we wnioskach, tylko np. w kolejnym punkcie „Podsumowanie”.

Uwagi ogólne do pracy: skróty myślowe, nieprawidłowe sformułowania.

- Doktorant używa określenia „ilość MS”, co nie jest prawdą, gdyż w pracy chodzi o wykorzystanie pełnego lub też zredukowanego składu pożywki (MS lub ½ MS);
- nietrafione sformułowanie „Obserwowano całkowity brak korzeni na cebulach” str. 61;
- brak jest w spisie literatury cytowanych w pracy pozycji np. Katayama i Migawa 1979, Korabi i in. 2007
- brak w tekście pracy pozycji ze spisu literatury: Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.A., Bihamta M.R. 2007. A protocol for mass production of Rosa hybrid cv. Iceberg through in vitro propagation. Iranian Journal of Biotechnology 5(2): 100-104;

- brak chronologii w cytowaniach literatury (np. str. 5, 6, 9, 38) - wskazanie pozycji literatury podajemy zawsze w nawiasie w kolejności od najstarszej, do najnowszej;
- błędy w cytowanych w tekście pracy pozycjach (np. w dyskusji Hann i in. 2005 powinno być Han i in. 2005, zamiast Fuku i in. 1989 powinno być Fukui i in. 1989);
- na rycinach 18, 19 brakuje skali powiększenia;
- ryc. 31 słabej jakości i nie wnosząca nic do pracy;
- pełna naukowa nazwa gatunku składa się z trzech części – nazwy rodzaju i nazwy gatunku (epitetu gatunkowego), oraz skrótu nazwiska autora nazwy (np. *Lilium martagon* L.). Dotyczy to wszystkich roślin przywoływanych w pracy (np. w przeglądzie literatury i dyskusji).

Inne drobne błędy: s. 61 – po wyrazie członie sformułowania „jedno” powinien znaleźć się łącznik; niektóre tytuły rozdziałów, fragment przeglądu literatury (str. 27), streszczenie oraz wnioski nie są wyjustowane; błędy interpunkcyjne (np. str. 7, 13, 23, 39) oraz liczne literówki (m. in. 46); zdanie nie powinno rozpoczynać się od 1% (str. 24). Niniejsze uwagi, mają często charakter jedynie techniczny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Krzysztofa Nowaka stanowi pracę opartą na wcześniejszych publikacjach z zakresu mikrorozmnażania lili (w tym lili złotogłów), jednak o nowatorskim ujęciu wielu istotnych zagadnień mających wpływ na otrzymanie spektakularnych wyników. Praca ma zatem wartość poznawczą oraz, jak wspomniano na wstępie, aplikacyjną i wnosi znaczący wkład do nauk ogrodniczych.

Praca pt. „Zastosowanie pożywek płynnych w kulturach *in vitro* lili złotogłów (*Lilium martagon* L.)” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Pozytywnie oceniam pracę Pana mgr inż. Krzysztofa Nowaka i wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie doktoranta do publicznej obrony.



Dr hab. Andrzej Pacholczak (prof. SGGGW)