



Dr hab. Justyna Lema-Rumińska, prof. Uczelni
Pracownia Roślin Ozdobnych i Warzywnych
Katedra Przyrodniczych Podstaw Rolnictwa i Ogrodnictwa
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Moniki Kamińskiej

**pt. „Przechowywanie kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum*
pienicum Pawł. w warunkach kultury *in vitro* jako narzędzie
aktywnej ochrony bioróżnorodności genetycznej roślin”**

Ocena rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, przekazanej pismem z dnia 16.10.2019 r. przez Pana prof. dr hab. Wenera Ulricha, Dziekana Wydziału.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Kamińskiej, przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Aliny Trejgell, prof. Uczelni w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu, stanowi monografię naukową zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dodatkowo część wyników zawartych w monografii naukowej została już opublikowana w wiodącym światowym czasopiśmie z zakresu kultur tkankowych roślin – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, w którym Doktorantka opublikowała w roku 2018 dwie oryginalne prace o łącznej wartości współczynnika wpływu $IF= 4.400$. W obu pracach Pani Mgr Monika Kamińska jest pierwszym autorem, co świadczy o istotnym wkładzie w powstanie tych prac. Ponadto Doktorantka zaprezentowała wyniki w postaci komunikatów i streszczeń na 10 konferencjach naukowych (w tym dwóch międzynarodowych). Jest to bardzo dobry wynik, świadczący o przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia liczących się w świecie badań naukowych.

Oceniana rozprawa doktorska stanowi monografię naukową składającą się z głównych rozdziałów: Wstępu, Przeglądu literatury, Celu i zakresu pracy, Materiału i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków oraz Literatury. Dodatkowo praca została podzielona na liczne dobrze uporządkowane i przejrzyste podrozdziały, które stanowią logiczną całość. Ponadto Doktorantka załączyła do manuskryptu streszczenia w j. polskim i angielskim oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy. Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymagania

formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Manuskrypt obejmuje łącznie 204 strony, a wyniki zaprezentowane są na 79 rycinach oraz w 24 tabelach. Wiele z prezentowanych rycin zawiera zdjęcia, które dobrze dokumentują przebieg doświadczeń. Autorka cytuje w dysertacji aż 460 pozycji literatury, głównie z tzw. Listy Filadelfijskiej oraz 2 źródła internetowe.

Temat rozprawy został trafnie określony, gdyż głównym celem prezentowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości przechowywania wierzchołków wzrostu *Taraxacum pieninicum* w formie tzw. sztucznych nasion w warunkach spowolnionego wzrostu w kulturze *in vitro*, co stanowi ważne narzędzie ochrony bioróżnorodności genetycznej roślin. Gatunek wybrany do badań jest krytycznie zagrożony wyginięciem w środowisku naturalnym i występuje tylko na jednym stanowisku na terenie Pienin w Karpatach Zachodnich. Ponadto strategia ochrony *in situ* (w środowisku naturalnym) oraz *ex situ* (w konwencjonalnych kolekcjach Ogrodów Botanicznych) jest dla tego gatunku mało efektywna z uwagi na brak syntezy taraksacyny i znaczące zgryzanie liści przez gatunki roślinożerne oraz szybką utratę żywotności nasion. Z tych względów opracowanie metody ochrony *ex situ* opartej na kulturze *in vitro* o spowolnionym wzroście z wykorzystaniem kapsułowanych wierzchołków wzrostu (tzw. sztucznych nasion) wydaje się bardzo zasadną metodą ochrony *T. pieninicum*, która umożliwi przechowywanie ich przez długi okres czasu bez konieczności wykonywania pasażu, co dodatkowo znacznie obniża koszty związane z przygotowaniem pożywek oraz pracą.

We Wstępie Autorka wprowadziła czytelnika w zagadnienia związane z problematyką gatunków zaklasyfikowanych przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody (IUCN) jako krytycznie zagrożone, których jest obecnie na liście ponad 5 000 gatunków roślin. Określiła, że wpływ na sytuację mają nie tylko zmiany klimatu, ale przede wszystkim wzrastająca ingerencja człowieka w środowisko naturalne powodująca znaczący spadek bioróżnorodności gatunków każdego roku. Oceniała ryzyko stosowania tradycyjnych metod przechowywania nasion w temperaturze poniżej 0°C i wskazała na konieczność opracowywania skuteczniejszych metod opartych o kultury *in vitro*.

W rozdziale Przegląd literatury, Doktorantka scharakteryzowała gatunek *Taraxacum pieninicum* podjęty w badaniach. Przedstawiła metody przechowywania materiału roślinnego, uwzględniając ich skuteczność. Omówiła znaczenie retardantów wzrostu, takich jak kwas abscysynowy oraz kwas jasmonowy, zastosowane w niniejszych badaniach. Ponadto Autorka scharakteryzowała sztuczne nasiona i ich wykorzystywanie dla gatunków, których nasiona są z pewnych powodów niedostępne, co znacząco poszerza również ich zastosowanie do przechowywania unikatowych lub zagrożonych wyginięciem gatunków oraz ich transport między ośrodkami. Bardzo szczegółowo Doktorantka przedstawiła podrozdziały dotyczące „Stresu chłodu” oraz „Aklimacji do chłodu” omawiając tu mechanizmy percepcji niskiej temperatury, wtórne przekaźniki sygnału wywołanego chłodem oraz stres oksydacyjny a także uwzględniając molekularne podstawy aklimacji do chłodu, rolę fitohormonów w tym procesie oraz zmiany na poziomie biochemicznym. Znacznie mniejszą uwagę poświęciła Doktorantka podrozdziałowi „Stabilność genetyczna”. W przeglądzie literatury Autorka wykazała się znajomością literatury światowej oraz uwzględniła najnowsze osiągnięcia naukowe dotyczące omawianych zagadnień.

Doktorantka umiejętnie sformułowała główny cel badań, którym było opracowanie systemu przechowywania kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum pieninicum* Pawł. w warunkach kultury *in vitro* o spowolnionym wzroście, umożliwiającego znaczące wydłużenie okresu między pasażami. Ponadto Doktorantka określiła cele szczegółowe, którymi były: ocena możliwości wydłużenia czasu przechowywania zakapsułowanych eksplantatów poprzez wykorzystanie naturalnych retardantów wzrostu – kwasu abscysynowego (ABA) i kwasu jasmonowego (JA) oraz zweryfikowanie możliwości konserwacji sztucznych nasion bez podłoża wzrostowego, co dodatkowo może wpłynąć na obniżenie kosztów procedury i ma charakter wysoce aplikacyjny w bankach genów. Celem była także ocena uzyskanych po przechowywaniu regenerantów pod względem stabilności genetycznej za pomocą cytometrii przepływowej oraz markerów molekularnych typu: RAPD, ISSR, SCoT, co jest wysoce zasadne gdyż umożliwia wykluczenie niepożądanego zmienności somaklonalnej w opracowanej metodzie przechowywania materiału biologicznego u *T. pieninicum*.

Materiał i metody badań są właściwie dobrane do celu pracy i prawidłowo opisane. Doktorantka stosowała jako materiał badawczy nasiona pochodzące z kolekcji Ogrodu Botanicznego – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej Polskiej Akademii Nauk w Powsinie. Rozdział ten został dodatkowo podzielony na podrozdziały, w których Doktorantka omówiła badania wstępne i określiła metody ekspozycji na ABA, JA oraz sposób dodawania sacharozy do roztworu alginianu sodu przed kapsułowaniem wierzchołków wzrostu. W zasadniczej części badań Autorka określiła warunki przechowywania sztucznych nasion *T. pieninicum*, na podłożu MS z zastosowaniem retardantów wzrostu oraz na szalkach bez podłoża wzrostowego. Ponadto Doktorantka opisała szczegółowo metody: mikropropagacji, ukorzeniania pędów oraz aklimatyzacji do warunków *ex vitro* *T. pieninicum* po przechowywaniu w chłodzie. Ponadto Doktorantka przedstawiła metody analiz materiału roślinnego po przechowywaniu w chłodzie w liściach uzyskanych w wyniku konwersji sztucznych nasion. Zastosowane metody badawcze dotyczące oznaczenia zawartości chlorofilu, nadtlenu wodoru, L-proliny, rozpuszczalnych cukrów, i endogennych fitohormonów (ABA, JA), zostały precyzyjnie opisane. Rośliny namnożone i zaaklimatyzowane do warunków polowych, po 9 i 12 miesiącach przechowywania na podłożu MS zostały poddane analizie stabilności genetycznej przy pomocy cytometrii przepływowej oraz markerów molekularnych typu: RAPD, ISSR, SCoT, które także zostały szczegółowo opisane.

Uzyskane dane Doktorantka analizowała przy wykorzystaniu testu Tukey'a. Ponadto istotność wpływu badanych czynników na przechowywany materiał roślinny oraz ich wzajemne interakcje na akumulację wybranych związków chemicznych przeanalizowała przy użyciu dwu- oraz trzyczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Uzyskane przez Panią Mgr Monikę Kamińską wyniki badań zostały bardzo dobrze zaprezentowane w tabelach oraz na wykresach i udokumentowane licznymi rycinami zawierającymi zdjęcia badanych roślin. Ta część manuskryptu obejmuje 97 stron i zawiera pokaźną liczbę 67 rycin oraz 20 tabel. Cały rozdział jest napisany przejrzysto, a wyniki badań są dobrze uporządkowane. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła u *Taraxacum pieninicum* m. in., że: kwas abscysynowy (ABA) istotnie hamował

namnażanie pędów w porównaniu do kontroli, niezależnie od użytego stężenia; kwas jasmonowy (JA) w stężeniach 5 – 15 mg·dm⁻³ stymulował proliferację pędów, jednakże różnice nie były statystycznie istotne w stosunku do kontroli; współczynnik namnażania pędów dla materiału przechowywanego w obniżonej temperaturze był istotnie niższy na świetle w stosunku do kontroli oraz materiału przechowywanego w ciemności niezależnie od czasu przechowywania. Ponadto Doktorantka stwierdziła istotny wpływ sposobu aplikowania ABA na zawartość chlorofilu po przechowywaniu kapsułowanych wierzchołków pędu przez 3 i 6 miesiące, natomiast stężenie ABA nie miało istotnego wpływu na zawartość chlorofilu, niezależnie od czasu chłodzenia. Poziom nadtlenu wodoru w materiale roślinnym po 3 miesiącach przechowywania w chłodzie wzrastał jedynie w pędach poddanych prekulturze z ABA.

Za pomocą zastosowanej cytometrii przepływowej Doktorantka wykazała, że regeneranty po najdłuższym, zastosowanym w eksperymencie przechowywaniu (9 i 12 miesięcy) w obniżonej temperaturze, niezależnie od warunków świetlnych, charakteryzowały się taką samą ploidalnością, co rośliny kontrolne. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że uzyskane przez Panią mgr M. Kamińską profile markerów molekularnych typu: RAPD, ISSR i SCoT z wykorzystaniem dobranych starterów były takie same dla roślin uprawianych klasycznie z nasion i dla regenerantów uzyskanych na drodze mikropropagacji po przechowywaniu w obniżonej temperaturze w kulturze *in vitro*. Świadczy to o tym, że opracowana przez Doktorantkę metoda przechowywania kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum pieninicum* w warunkach kultury *in vitro* daje możliwość ich konserwacji z zachowaniem stabilności genetycznej roślin, co ma niebagatelne, praktyczne znaczenie, dla banków genów.

W Dyskusji Autorka porusza zagadnienia związane z technologią uzyskiwania sztucznych nasion, która łączy zalety mikropropagacji w warunkach *in vitro* z rozmnażaniem poprzez nasiona i ich przechowywaniem. Dyskutuje szeroko wyniki własnych badań z literaturą światową możliwość przechowywania niekapsułowanych i kapsułowanych wierzchołków wzrostu, ich konwersję, przeżywalność, spowolnienie wzrostu, odporność na stres, temperaturę przechowywania, poziom fitohormonów, rodzaju eksplantatu, wpływ światła, proces aklimacji do chłodu, wpływ obecności w bielmie sacharozy oraz stabilność genetyczną otrzymanych po regeneracji roślin. Doktorantka wykazała się w Dyskusji umiejętnością przedstawienia własnych wyników na tle bogato cytowanej literatury światowej, co świadczy o dojrzałości naukowej Pani mgr Moniki Kamińskiej.

Na zakończenie Doktorantka przedstawiła bardzo syntetycznie ujęte i przejrzyste skonstruowane Wnioski oraz zalecenia praktyczne dla banków genów.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Kamińskiej należą:

- a/ Stwierdzenie, że uprawa *Taraxacum pieninicum* w warunkach obniżonej temperatury spowalnia wzrost pędów a przez to umożliwia znaczące wydłużenie okresu między pasażami.
- b/ Stwierdzenie, że światło w połączeniu z niską temperaturą stanowi czynnik stresogenny podczas przechowywania *T. pieninicum*.
- c/ Stwierdzenie, że traktowanie kwasem abscysynowym i kwasem jasmonowym eksplantatów

T. pieninicum ogranicza ich wzrost, co przyczynia się do wydłużenia okresu ich przechowywania w obniżonej temperaturze.

d/ Wykazanie, że zastosowane retardanty wzrostu, szczególnie kwas jasmonowy, łagodzą skutki stresu chłodu w pędach *T. pieninicum*.

e/ Stwierdzenie, że sztuczne nasiona *T. pieninicum* mogą być przechowywane bez podłoża wzrostowego, co minimalizuje koszty i wymogi wyposażenia laboratoryjnego.

f/ Wykazanie, że suplementacja sztucznego bielma sacharozą umożliwi wydłużenie czasu przechowywania sztucznych nasion *T. pieninicum* bez podłoża wzrostowego.

g/ Stwierdzenie, że pędy *T. pieninicum* po przechowywaniu w obniżonej temperaturze są zdolne do efektywnej regeneracji w warunkach optymalnego wzrostu.

h/ Wykazanie, że uzyskane po przechowywaniu mikrosadzonki *T. pieninicum* są stabilne genetycznie, co wykazano za pomocą cytometrii przepływowej oraz przy pomocy markerów molekularnych typu: RAPD, ISSR i SCoT.

i/ Wykazanie, że zaaklimatyzowane do warunków polowych regeneranty *T. pieninicum* po przechowywaniu i rozmnożeniu w warunkach *in vitro* są zdolne do kwitnienia.

Ponadto na szczególne podkreślenie, moim zdaniem, zasługują zalecenia aplikacyjne dla banków genów poprzez wyselekcjonowanie przez Doktorantkę najkorzystniejszych warunków przechowywania *T. pieninicum* w warunkach spowolnionego wzrostu w kulturze *in vitro*. Zalecenia te brzmią:

1. „Efektywne przechowywanie sztucznych nasion *T. pieninicum* można uzyskać poprzez ich wyłożenie na pożywkę MS i umieszczenie w temperaturze 4°C w ciemności. Suplementacja sztucznego bielma kwasem jasmonowym w stężeniu 5 - 20 mg·dm⁻³ znacząco ogranicza przerastanie kapsułki przez pędy, co pozwala na wykonywanie pasażu jedynie raz w roku”.
2. Zalecenia podaje również Doktorantka w celu rozmnożenia i ukorzenia materiału po chłodzeniu, gdzie: „kulturę należy prowadzić na pożywce MS z dodatkiem 0,25 mg·dm⁻³ BAP oraz 0,025 mg·dm⁻³ NAA (pożywka proliferacyjna), a następnie na pożywce MS bez regulatorów wzrostu (pożywka ukorzeniająca) w temperaturze 26 ± 1°C, na ciągłym świetle o natężeniu 80 μmol·m⁻²·s⁻²”.

Reasumując, pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny monografia pod tytułem: „Przechowywanie kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum pieninicum* Pawł. w warunkach kultury *in vitro* jako narzędzie aktywnej ochrony bioróżnorodności genetycznej roślin” stanowi bardzo dobrą podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie naukowej *biologia*.

Podczas lektury pracy nasunęło mi się jednak kilka pytań i uwag.

Pytania i uwagi:

1. We Wstępie zabrakło moim zdaniem podkreślenia wagi wybranej metody ochrony bioróżnorodności genetycznej w stosunku do pozostałych metod ochrony *ex situ* np. kriokonserwacji.
2. W Przeglądzie literatury w podrozdziale 2.2. pt. „Przechowywanie materiału roślinnego” bardzo pobieżnie potraktowano metody oparte o kriokonserwację. Proszę wyjaśnić czy metoda kriokonserwacji jest metodą bardziej kosztoclonną od zaproponowanej metody kapsułowania wierzchołków wzrostu?
3. W Przeglądzie literatury bardzo rozbudowane zostały podrozdziały pt. ”Stres chłodu” i „Aklimacja do chłodu” (zajmują łącznie 15 stron), natomiast podrozdział dotyczący „Stabilności genetycznej” zajmuje wraz z omówieniem markerów molekularnych i cytometrii zaledwie 2 strony. Dlaczego?
4. W rozdziale Materiał i metody pojawił się błąd w jednostkach, jest: „ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ”, a powinno być: „ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ”. Warto na to zwrócić uwagę przy przygotowywaniu pracy do druku.
5. Na stronie 33 (w rozdziale Materiał i metody) pojawia się określenie „w warunkach obniżonego natężenia światła ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$)”. Proszę wyjaśnić, jakie jest „normalne” natężenie światła w laboratoriach kultur *in vitro*, a także proszę porównać te wartości do kultur o spowolnionym wzroście.
6. W Spisie literatury pojawiły się drobne błędy związane ze skrótami nazw czasopism. Niektóre nazwy występują pod różnymi skrótami np. Sci Hort, Sci Hortic lub Sci Horticult. Należałoby je ujednoczyć przy przygotowaniu publikacji do druku.
7. Czy podjęto się próby reintrodukcji do środowiska naturalnego, namnożonego materiału *in vitro*? Czy w przyszłości planuje się takie próby?

Pragnę zaznaczyć, że powyższe uwagi to drobne nieścisłości, głównie redakcyjne, które nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy.

Podsumowanie

Podsumowując, niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr Moniki Kamińskiej pt. „Przechowywanie kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum pinnaticum* Pawł. w warunkach kultury *in vitro* jako narzędzie aktywnej ochrony bioróżnorodności genetycznej roślin” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z tego względu przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Biologia na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani Mgr Moniki Kamińskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Biorąc pod uwagę wartość naukową recenzowanej pracy oraz ze względu na fakt, że przedstawiony do oceny monografia została już częściowo opublikowana w dwóch

publikacjach z tzw. Listy Filadelfijskiej (łączny współczynnik wpływu IF=4.400), wnioskuje także do Wysokiej Rady Dyscypliny Biologia o wyróżnienie powyższej rozprawy.



Bydgoszcz, 15.11.2019 r.