

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Kamińskiej

**pt. "Przechowywanie kapsułowanych wierzchołków wzrostu *Taraxacum pieninicum* Pawł.
w warunkach kultury *in vitro* jako, narzędzie aktywnej ochrony
bioróżnorodności genetycznej roślin"**

Skończywszy pierwszy ogląd pracy doktorskiej Pani Kamińskiej, jeszcze nie, by przystąpić do pisania recenzji, ale by zorientować się w temacie pracy, zadumałem się, jak różnie ludzie postępują. Jedni, swoją działalnością, przyspieszają sukcesję (czyt. wymieranie) gatunków, zaś inni starają się ją spowolnić poprzez ratowanie gatunków ginących, lub zagrożonych wyginięciem. Naturalna sukcesja oznacza bowiem zastępowanie umierających osobników przez rodzące się nowe lub wymieranie jednych gatunków i ewolucyjne wykształcanie się nowych. Załamanie tej równowagi bywa przyczyną masowego wymierania, lub masowej ekspansji gatunków. Kataklizm taki zdarzał się w historii Ziemi, np. w wyniku gwałtownych epizodów kosmicznych lub wielkich zlodowaceń, a także w epoce ekspansji gadów i, zaryzykowałbym tezę, że trwał później, już jako czas ekspansji ssaków, a obecnie ludzi. Sukcesja gatunków jest więc koniecznym elementem rozwoju ziemskiej biosfery.

Dominacja ludzi, wywiera rosnący wpływ na historię dużej liczby gatunków roślin i zwierząt na ogromnych połaciach Ziemi. Działalność człowieka, powoduje, niestety, udokumentowane obawy, że jesteśmy w dużej mierze odpowiedzialni za wymarcie lub wymieranie wielu gatunków. Wymieranie może być faktem dokonany, kiedy przestajemy obserwować osobniki określonego gatunku, lub *in statu nascendi*, kiedy liczba osobników z roku na rok systematycznie się zmniejsza.

Można wskazać wiele przyczyn wymierania gatunków, albo ich przejścia w stan zagrożenia. Trudno określić z całą pewnością, jaka ich część jest pochodzenia antropomorficznego, jednak poczucie odpowiedzialności ludzi za stan środowiska i kierunek zachodzących w nim zmian, powinno indukować działania w kierunku ratowania wymierających gatunków. Taki charakter mają badania prowadzone przez panią Monikę Kamińską w celu określenia możliwości przedłużania żywotności kapsułowanych wierzchołków wzrostu na przykładzie *Taraxacum pieninicum* Pawł. Dodatkowo zauważam, że „Pawł.” oznacza, że gatunek ten opisał po raz pierwszy Profesor Bogumił Pawłowski z UJ, a ja sam zdążyłem jeszcze być studentem Profesora, który zmarł w 1971 roku, więc oficjalny żywot tego gatunku wydaje się być raczej krótki.

Kapsułowanie wierzchołków wzrostu roślin nie jest bardzo popularną metodą prezerwacji rzadkich genotypów roślinnych. Częściej spotyka się metodę kapsułowania zarodków uzyskiwanych metodą *in vitro*, jednak najpopularniejszą metodą prezerwacji jest krioprezewacja, chyba dlatego, że jest ona bogata w warianty metodyczne: zróżnicowanie temperatury przechowywania (ciekły azot lub hel), metodologia przygotowywania tkanek i dochodzenia do finalnej temperatury, a następnie powrotu do temperatur dodatnich, ale przede wszystkim bogactwo roztworów w których tkanki są zamrażane i substancji stosowanych jako krioprezerwanty. Rzadziej stosowane są metody naturalne, polegające ogólnie rzecz biorąc na stwarzaniu warunków, w których procesy wzrostu tkanek są w największym stopniu spowolnione

– np. niska temperatura, czy niska zawartość tlenu. Dlatego też z uznaniem widzę, że autorka podjęła ryzyko zastosowania do przerwacji badanego gatunku roślin metody kapsułkowania wierzchołków wzrostu i obniżenia temperatury ich wzrostu.

Przedstawiona rozprawa doskonale lokuje się w środowisku biologów wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK o bogatych tradycjach badań nad indukcją rozwoju roślin rozumianego, jako pojawianie się nowych organów, procesów, substancji, a ostatnio też nowych organizacji komórek. Badania te prowadzone były przez kolejne generacje największych polskich uczonych, którzy przejmowali tę tematykę od poprzedników i przekazywali następcom, że wymienię chronologicznie Profesorów: Michniewicza, Kopcewicza, Tretyna, a potem młodszych, ponieważ obserwujemy radiację tej linii ewolucyjnej i pojawienie się nowych kierunków badań, mających swoich liderów, co w genetyce ewolucyjnej oznacza, że ten kierunek ewolucji ma się dobrze i nadal się rozwija. Jedną z liderów, której badania, możliwe, że lokują się najbliżej tego głównego kierunku, jest Pani doktor habilitowana Alina Trejgell, opiekunka Doktorantki. A wszystko to piszę, by zauważyć, że Pani mgr Kamińska miała dużo szczęścia, trafiwszy do szkoły naukowej, gdzie mogła korzystać z wielkiego doświadczenia starszych kolegów, co zdarza się relatywnie rzadko.

Uwagi ogólne o pracy

Rozprawa zaczyna się wykazem źródeł informacji składających się na przygotowaną rozprawę. Są to dwie publikacje, wydane w 2018 roku przez czasopismo „impaktowane” Plant Cell, Tissue and Organ Culture, których Pani Kamińska jest pierwszym autorem, 10 komunikatów i streszczeń konferencyjnych, w których również Doktorantka jest pierwszym autorem (lata publikacji 2015 – 2019), a także wyniki dotąd nieopublikowane. Uznaję liczbę i zakres tematyczny tych wszystkich źródeł za zupełnie wystarczający do przygotowania dobrej rozprawy doktorskiej.

W dalszej kolejności występują polsko- i angielskojęzyczne streszczenia. Umieszczenie streszczenia na początku rozprawy nie jest najczęściej spotykane w rozprawach doktorskich, sądzę jednak, że w tym miejscu lepiej spełnia swoje zadanie, zapowiadając w sposób „kompaktowy” treść pracy, zaś umieszczone na końcu pozwala czytelnikowi jedynie na sprawdzenie czy wszystko, co było wcześniej, prawidłowo zrozumiał.

Spis treści jest dość detaliczny, jednak nie nadmiernie, choć zauważyłem, że niektóre podrozdziały zajmują 1/3 strony, a z drugiej strony dwa podrozdziały 5.2.2.1. i 5.2.2.2. – łącznie 69 stron. Dalej następuje wykaz stosowanych skrótów. Spośród głównych rozdziałów, najobszerniejszy jest rozdział Wyniki, zaś pracę zamykają Podsumowanie, nieco ukryty wniosek i na końcu spis cytowanej literatury. Rozprawa ma klasyczną konstrukcję i obejmuje 79 rycin i fotografii oraz 24 tabele; mieści się na 204 stronach druku (a także na 14 nienumerowanych wstępnych kartach), zaś spis piśmiennictwa - 460 pozycji.

Wstęp (Przegląd literatury)

Na początku przeglądu literatury Autorka scharakteryzowała gatunek będący przedmiotem jej rozprawy doktorskiej, a więc *Taraxacum piennicum*, czyli mniszek pieniński. Gatunek ten znajduje się w stanie skrajnego zagrożenia, a nawet przez jakiś czas był uznawany za wymarły, bo ze zbocza oberwał się blok skalny, wraz z porastającą go murawą naskalną, w skład której wchodziła ostatnia kępa mniszka pienińskiego. Na szczęście ujawniono „nową” ostatnią kępę roślin i znów będziemy

obawiali się wydarzenia ostatecznego. Trochę podobną sytuację mieliśmy z Tragankiem zwistokwiatowym czyli *Astragalus penduliflorus*, który rósł w dolinie Smytniej, zamkniętej dla turystów. Jednak jelenie miały do niej swobodny wstęp i któreś zimy zgryzły największe krzewy do połowy wysokości. Z tego powodu zastanawiałem się czy właściwe jest tworzenie miejsc zwanych „arkami”, w których mają wegetować osobniki zagrożonych gatunków. Może skuteczniejsze byłoby wyprowadzenie ich na zewnątrz i uprawa na skwerach, miejscach rekreacyjnych, a nawet w prywatnych ogrodach i zbadanie, w których miejscach zagrożone rośliny czułyby się najlepiej. W naszej „rządowej” wersji często bywa, że ochrona tych roślin polega na obserwacji coraz rzadszych osobników, aby na koniec wystawić gatunkowi oficjalny akt zgonu.

Jeśli chodzi o to, jaka metoda ochrony jest optymalna dla ochrony mniszka pienińskiego, przyjmuję za Autorkę, że optymalna wydaje się być metoda spowolnionego wzrostu, wykorzystująca zoptymalizowane dla tego celu wartości różnych czynników chemicznych, i fizycznych spowalniania wzrostu, jak i zastosowanie fitohormonów. Mam przy tym dwa pytania. **Po pierwsze nie czuję problemu z monitorowaniem żywotności nasion zamrożonych w LN, nawet jeśli nie są to duże próbki nasion, a po drugie, przyroda stosuje metodę spowalniania wzrostu zarodków w nasionach pozostających w stanie spoczynku poprzez zmniejszanie ich wentylacji, w wyniku czego następuje obniżenie stężenia tlenu z równoczesnym wzrostem stężenia dwutlenku węgla. Czy taka metoda bywa stosowana?**

Autorka słusznie zauważa, że kultury *in vitro* bywają pracochłonne i powtarzanie ich w trakcie przechowywania obniża wartość tych metod. Zauważę tylko, że podstawowe zastosowanie tych metod jest inne aniżeli w celach spowolnienia wzrostu tkanek. O różnych wersjach techniki krioprezerwacji pisałem wcześniej i tylko dla porządku zauważę, że warunki ciekłego helu (LHe) mogą być bezpieczniejsze dla materiału roślinnego.

Autorka proponuje połączenie *in vitro* i chłodu, a więc obniżanie temperatury w kulturach *in vitro*, przy zastosowaniu różnych czynników spowalniających wzrost a nieszkodzących samym tkankom, czyli tzw. krioprotektantów, jak i fitohormonów, takich jak ABA i JA, użytych w bezpiecznych stężeniach. Wykorzystuje się tu fakt, że tzw. współczynnik temperaturowy Q_{10} zmienia się wraz z temperaturą, najczęściej rośnie wraz z jej spadkiem, a ponadto ma mniejszą wartość dla procesów fizycznych, jak np. dyfuzja cząsteczek, a większą dla reakcji chemicznych, czy enzymatycznych, a nawet dla procesów wysokiego rzędu jak przepuszczalność membran, czy procesy takie jak podziały komórkowe, czy organogeneza. Współczynnik temperaturowy to potężne narzędzie i nie zdziwiłbym się, gdyby miało się okazać, że mechanizm działania obydwu wymienionych fitohormonów opiera się także na różnych wartościach Q_{10} dla różnych reakcji.

Pojęcia kapsułowanych tkanek i sztucznych nasion częściowo się przenikają. **Czy autorka mogłaby (teoretycznie) w tytule swojej pracy zastąpić termin „kapsułowane wierzchołki wzrostu” na termin „sztuczne nasiona”, opierając się na ostatnim akapicie na str 10?**

Dalsza część wstępu poświęcona została różnym aspektom działania chłodu, w tym udziałowi stresu oksydacyjnego. Akceptuję informacje zawarte w tym rozdziale, chciałbym jednak zwrócić uwagę na dwa aspekty. Po pierwsze rozpuszczalność tlenu w wodzie wzrasta w miarę spadku temperatury silniej niż np. azotu. Stąd zawartość rozpuszczonego w wodzie tlenu jest nieco wyższa aniżeli skład fazy gazowej ponad pożywką. **Czy nie sądzi Pani, że ta właściwość tlenu może w jakimś stopniu tłumaczyć aktywowanie się stresu oksydacyjnego w warunkach**

chłodowych i wywoływanie procesów chemicznych, czy nawet molekularnych? A druga sprawa - czy obniżanie temperatury w kulturach sterylnych, powodujące występowanie podciśnienia wewnątrz naczyń hodowlanych, nie rodzi niebezpieczeństwa „zaciągnięcia” do wnętrza naczynia nowej porcji powietrza, niekoniecznie sterylnego? W swoich badaniach pracy spotkałem się ze zjawiskiem, że kultury rosnące w chłodzie wykazywały większy procent zakażeń, niż kultury rosnące w wyższej temperaturze i to nawet przy zamykaniu naczyń parafilmem. **Czy Pani nie spotkała się z podobnym skutkiem chłodzenia naczyń hodowlanych?**

Ostatnią część tego rozdziału stanowią rozważania na temat stabilności genetycznej kultur *in vitro*. Autorka przedstawiła to zagadnienie prawidłowo i nie kwestionuję tych informacji. Chciałbym jednak zgłosić pewne uwagi. Po pierwsze – przyjmuje się, że rozmnażanie przez protoplasty, albo embriogenezę wiąże się z większym niebezpieczeństwem zmian genetycznych, w porównaniu z organogenezą somatyczną, czy rozmnażaniem wegetatywnym. Czyżby zmiany te nasilały się, procesach, w których kultury te przechodzą przez stadium jednokomórkowe? Po drugie – czy może jest tak, że mikrozmiany genetyczne, zachodzące w komórkach, tworzą łącznie pewną naturalną pulę zmienności genetycznej, z której gatunek może „czerpać” i wykorzystywać w ewolucji powszechnej. Z natury swojej, kultury *in vitro* są wspaniałym narzędziem wzmocnienia działań ochroniarskich, zwłaszcza jeśli kończą się mikrorozmnażaniem i sukcesem w aklimatyzacji regenerantów. Nie chciałbym jednak, aby obawy o wystąpienie zmian genetycznych skutkowały zaniechaniem technik prezerwacji. Wolałbym bowiem rozmnożyć rośliny odbiegające genetycznie od wzorca, niż mieć ten „wzorzec” jako ostatni zasuszony egzemplarz w zielniku.

Autorka sformułowała **Cel** swoich badań, jako „Opracowanie systemu przechowywania kapsułowanych wierzchołków wzrostu pędów mniszka pienińskiego w warunkach kultur *in vitro* o spowolnionym wzroście, co wydłuża okres między pasażami. Cel ten może wydawać się skromny na tle całości osiągnięć kultur *in vitro*, którymi emocjonujemy się od nie tak wielu lat ale trzeba sobie uświadomić, że na całą naszą wiedzę składają się w ogromnej większości wyniki takich jednostkowych badań. To zaś oznacza, że akceptuję cel badań w przedstawionym brzmieniu.

Materiał i metody

Na wstępie opisano metodę kiełkowania nasion mniszka i otrzymywania pędów pachwinowych ze zregenerowanych mikroroślinek, następnie metodę optymalizacji uzyskiwania tych pędów i pobierania fragmentów wierzchołkowych, zwanych sztucznymi nasionami i wreszcie metodykę doświadczeń zasadniczych nad przedłużonym przechowywaniem sztucznych nasion, w tym metodykę doświadczeń hodowlanych, analiz biochemicznych, cytologicznych i molekularnych. Na końcu opisano użyte w pracy metody analizy statystycznej. W mojej opinii Autorka zastosowała metody właściwe do poszczególnych eksperymentów i nie zgłaszam w tej kwestii żadnych uwag.

Wyniki

1. Badania wstępne

Pierwotne eksplantaty pędowe hamowały wzrost pod wpływem dodatku ABA i JA, natomiast po dodaniu sacharozy można było określić, optymalne dla wzrostu pędów i dla kiełkowania sztucznych nasion, stężenie tego cukru (ok 6%).

2. Badania zasadnicze

- Pędy zregenerowane z kapsułowanych kultur przeżywały w ponad 80% roczny okres chłodu. Od początku hodowli światło stymulowało wzrost i ulistnienie pędów, natomiast w nieznacznym stopniu wpływało niekorzystnie na ich przeżywalność przy dalszej hodowli. Jednak współczynnik namnażania nie obniżał się istotnie podczas najdłuższego czasu hodowli oraz podczas aklimatyzacji do wyższej temperatury po chłodzeniu, przy czym warunek podstawowy dla aklimatyzacji, a więc procent ukorzenia oraz wzrost i rozwój korzeni, został spełniony.
- Aklimatyzowane kultury regenerowały nowe pędy z pąków przybyszowych. Ploidalność pędów przybyszowych, mierzona stosunkiem liczby jąder $2C/4C$, nie zależała od warunków świetlnych dla kultur *in vitro* i roślin kontrolnych, rosnących w glebie, aczkolwiek najbardziej zbliżone do kontroli były rośliny *in vitro* hodowane na świetle. Rośliny te zostały porównane także pod względem ich stabilności genetycznej. Doceniam staranność Doktorantki i odnotowuję końcowy wynik analiz, że profile fragmentów DNA uzyskanych tymi metodami były takie same dla kontroli i dla roślin uprawianych w warunkach *in vitro*, aczkolwiek nawet ujawnienie jakiegokolwiek niestabilności genetycznej nie deprecjonowałoby tych wyników w obliczu naczelnego celu, a więc zmniejszenia niebezpieczeństwa wyginięcia badanego gatunku.

Wpływ ABA dodanego w trakcie prekultury lub do sztucznego nasiona

- Dodatek ABA zmniejszył szybkość wzrostu roślin w porównaniu z kontrolą. Efekt ten nasilał się przy zwiększaniu stężenia hormonu. W ciemności wzrost korzeni był zahamowany, a w obecności ABA zupełnie ustawał.
- Widoczny jest wpływ ABA na liczebność zregenerowanych pędów, zwłaszcza w ciemności, efektywniejsze są stężenia ABA: >10 mg/l. Przedłużenie kultury do czasu drugiego pasażu powtórzyło ten efekt, ale wtedy, gdy stężenie ABA było mniejsze od 15 mg/l.
- Przeżywalność sztucznych nasion po dodaniu ABA. Nie można było istotnie poprawić tego wskaźnika działając egzogennym ABA, ponieważ przeżywalność roślin kontrolnych wahała się w przedziale 80 - 90%. Autorce pozostało jedynie „wyłowienie” nielicznych kombinacji światło/ABA, gdzie przeżywalność sięgała 100%, lub skupienie się na najdłuższej kulturze (9 miesięcy). Tu, rzeczywiście widać najwięcej kombinacji światło/stężenie hormonu, gdzie przeżywalność jest największa, jeśli ABA dodawano do kapsułki.
- Procent ukorzenionych pędów po drugim pasażu. Przy skróceniu czasu kultury sztucznych nasion korzystniej działa mniejsze stężenie ABA, zaś przy dłuższej hodowli – stężenie większe i wtedy pędy ukorzenione stanowią więcej niż 90% wszystkich pędów.
- ABA dodany do osłonki sztucznych nasion zwiększał zawartość chlorofilu w liściach jednak tylko, gdy okres kultury był niedłuższy niż 6 miesięcy, przy czym wyższe stężenie ABA było korzystniejsze przy dłuższych czasach kultury.
- Większe stężenie ABA generowało silniejszy stres oksydacyjny w sztucznych nasionach (większe stężenie nadtlenu wodoru), efekt ten występował w 5 na 6 serii pomiarowych. Światło indukowało silniejszy stres niż jego brak (w 25 wariantach stężenie nadtlenu wodoru było większe na świetle, a tylko w 2 - mniejsze), niezależnie od stężenia ABA.
- Chłód i światło łącznie generowały silniejszy stres oksydacyjny mierzony szybkością dekompozycji lipidów membranowych. Światło indukowało silniejszy stres niż jego brak (w 26

wariantach, stężenie MDA było większe na świetle, a tylko w 1 - mniejsze), niezależnie od stężenia ABA i czasu chłodzenia, co sugeruje celowość przechowywania sztucznych nasion w ciemności.

- Światło indukowało też silniejszy stres, mierzony stężeniem proliny. Jest to ciekawa informacja, gdyż nie brak publikacji, które poddają w wątpliwość wartość stężenia proliny, jako wskaźnika natężenia stresu. W przedstawianych wynikach zawartość proliny w kulturach prowadzonych na świetle była w 26 kombinacjach wyższa, a tylko w 1 – mniejsza. Silniejszy stres charakteryzował kultury, w których ABA podawany był do wnętrza kapsułki.

- Światło sprzyjało akumulacji cukrów w tkankach, co wydaje się oczywistym efektem.

- Po zakończeniu chłodzenia i przeniesienia roślin do warunków optymalnych fluktuacje parametrów biochemicznych zmniejszyły się, co wskazuje na stabilizację fizjologiczną kultur. Dotyczy to w szczególności zawartości chlorofilu w liściach.

- Dodatek różnych stężeń JA do kultur uprzednio chłodzonych, w celu konwersji roślin pokazuje, że uzyskane rośliny są mniejsze w porównaniu z kontrolnymi i efekt ten nasila się wraz ze wzrostem stężeniem JA. Pamiętać jednak trzeba, że celem rozprawy jest m.in. spowolnienie wzrostu roślin, a w takim przypadku można przyjąć, że JA spełnił postulowaną rolę.

- Współczynnik namnażania pędów był większy w kulturach z ciemności. Ten efekt jest w pełni zrozumiały, ponieważ wcześniej autorka pokazała, że w ciemności różne wskaźniki zgodnie pokazują, obniżenie stresu. Wpływ JA jest bardziej skomplikowany i przed przystąpieniem do szerzej zakrojonych badań, np. przy staraniach o grant, należałoby część badań powtórzyć selekcyjując tylko niektóre kombinacje parametrów wzrostu. Może też dałoby się ponownie łącznie przeanalizować tabele i odpowiadające im fotografie, dla znalezienia zbieżności.

Wpływ JA na przechowywane kultury

- Zawartość chlorofilu w badanych kombinacjach „warunki kultury/stężenie JA” była zmienna. Na 24 takie kombinacje w 18 przypadków zawartość JA była mniejsza, a w 6 przypadkach – większa. Test parametryczny powinien wskazać większą częstość przypadków pierwszego rodzaju. Może należałoby ponownie zbadać najbardziej skrajne kombinacje roślin z większym stężeniem chlorofilu.

- Wpływ JA na zawartość nadtlenu wodoru (natężenie stresu oksydacyjnego) jest trudny do interpretacji, głównie z tego powodu, że dominujący jest wpływ światła na jego wielkość. Faktyczny wpływ światła można udowodnić nawet stosując test nieparametryczny, uzyskując bardzo wysoki poziom istotności. W przypadku hodowli sztucznych nasion wysokie stężenia JA częściej indukują mniejszy stres oksydacyjny, natomiast gdy hormon ten dodaje się do pożywki wyższy stres indukują kultury w których JA jest dodawany w wyższych stężeniach.

- Wpływ JA na trwałość lipidów błonowych. Jak poprzednio, światło jest dominującym czynnikiem generującym stres oksydacyjny i jego degradujący wpływ na strukturę lipidów membranowych. Jeśli JA dodawany jest do wnętrza kapsuł, wówczas jego działanie stopniowo się zmniejsza tak, jakby z czasem hormon ten się zużywał, lub dyfundował na zewnątrz.

- Światło silnie stymuluje zawartość proliny. Po krótkiej inkubacji stężenie proliny jest największe, możliwe, że następuje częściowe adaptacja do stresu i zawartości proliny generalnie się zmniejszają.

- Zawartość cukrów. Zanim przejdę do omówienia tych wyników, proszę o wyjaśnienie metodycznego. Zawartość proliny i cukrów wyznaczano na 1mg tkanki, ale czy było to przeliczenie

na/mg s.m. czy na mg św.m. **Nie musi Pani udzielać odpowiedzi, wystarczy uwzględnić jednostkę na prezentacji.** Częściej obserwowano akumulację cukrów, jeśli JA był dodany do wnętrza kapsuły. Interesujące też jest to, że JA działa w najmniejszym stężeniu, a później obserwuje się jakby „zmęczenie tkanki” nadmiarem tego hormonu. Natomiast oczywistym jest, że należy skonfrontować zawartości cukrów z żywotnością tkanek, namnażaniem itp.

- Autorka badała też współdziałanie lub konkurencję pomiędzy różnymi fitohormonami. JA na świetle silnie stymulował akumulację ABA, natomiast często hamował stężenie ABA poniżej kontroli. Wysoki poziom JA na początku kultury spadał podczas jej kontynuowania, ale nawet po 9 miesięcznej hodowli pozostawał wyższy niż dodany do pożywki lub do kultury. Szybkość tego spadku była tym większa im mniej hormonu zawierało środowisko. Jest to zadziwiający efekt. Czyżby świadczył on o tym, że błonowe receptory albo transportery JA uodporniają się i słabiej przenoszą JA w warunkach większego stężenia tego hormonu w środowisku?

Analizy wykonane po namnożeniu chłodzonych pędów w warunkach optymalnych

- Zawartość chlorofilu w tkankach zmieniała się w relatywnie niewielkim stopniu, co nie dziwi, jednak zaskakujące jest to, że w tkankach rosnących na świetle zawartość ta była **mniejsza**. Można byłoby wiązać ten fakt ze zmianami w uwodnieniu tkanek. Inną przyczyną zróżnicowania stężeń chlorofilu w porównywanych obiektach mogłoby być zapotrzebowanie na asymilaty, które jest wypadkową intensywności wzrostu tkanek oraz intensywności oddychania, bo chlorofilu nie można traktować, jak innej substancji, która może się akumulować w tkankach. **Co Pani o tym sądzi?**

- Zawartość proliny podczas wzrostu kultur w pożywce i w kapsułkach w optymalnych warunkach, kilkakrotnie się zmniejszyła, co prawdopodobnie wiązało się z wyższą temperaturą wzrostu. Pozostał jedynie stresogenny efekt światła oraz wzrastającego stężenia JA.

- Autorka zbadała przeżywalność wierzchołków wzrostu na pożywce z sacharozą. Z uznaniem zobaczyłem, że wierzchołki w optymalnych stężeniach sacharozy przeżywały w wysokim stopniu (nawet w ponad 80%) przez okres przechowywania dochodzący do 12 tygodni. Zdjęcie kapsułki obniżało tę przeżywalność. Autorka wykazała także, że nasiona kapsułkowane zachowały wysoki współczynnik namnażania w kulturze z dodatkową sacharozą, aczkolwiek trudno określić, które stężenie było najlepsze.

- Stopień zazielenienia kultur był dobry i w mało zależny od stężenia sacharozy.

- Zawartość nadtlenu wodoru, proliny oraz cukrów wskazuje, że stopień „zestresowania” kultur nie był nadmiernie wysoki, a więc warunki indukcji i regeneracji kultur wierzchołków pędów, zostały dobrane właściwie. Tego wniosku nie umniejszają pojedyncze przypadki „bardziej stresogennych kombinacji warunków kultury.

Dyskusja stwierdzam, że doktorantka wykazała odwagę ację, podejmując się badań nad gatunkiem, który z nieokreślonych powodów spadł do kategorii gatunków zagrożonych wyginięciem. W literaturze naukowej często spotyka się publikacje poświęcone ratowaniu tych gatunków. Ponieważ liczba tych gatunków zwiększa się szybciej aniżeli liczba naukowców pracujących w tej grupie zagadnień, regułą jest, że niewiele albo zgoła jedna osoba pracuje nad jednym gatunkiem. Ponadto, nie słyszałem, aby badania ochroniarskie przynosiły duży splendor. Jednak jestem nadal przekonany, że takie badania są bardzo potrzebne, a ich znaczenie będzie

rosto wraz z nasilaniem się katastrofalnych skutków globalnego ocieplenie, choć z drugiej strony, obawiam się, że wizja wzrostu poziomu oceanu światowego wygra z dziesiątkami, a nawet setkami ginących gatunków roślin i zwierząt.

U różnych gatunków przyczyny zagrożenia mogą być różne. Przykładowo, może być tak, że gatunek ginie z powodu zmian klimatycznych, albo klimatyczno/glebowych i wtedy wystarczy poszukać dla niego siedliska bardziej odpowiadającego jego wymaganiom. Boję się jednak, że jest to utopia, ponieważ na pewno odezwą się głosy, że tego robić nie wolno, bo to zaburza wyniki wcześniejszych badań fitosocjologicznych. Swego czasu dowiedziałem się, że roślin zagrożonych wyginięciem, namnożonych metodą *in vitro*, nie wolno wysadzić poza miejscem, gdzie aktualnie giną, żadną miarą nie w ogrodach, ogródkach parkach itd. Po zakończeniu badań wszystkie te rośliny należy zniszczyć pod rygorem kary administracyjnej, a o tym fakcie powiadomić Ministerstwo. Jedynym wyjątkiem są ogrody botaniczne, gdzie można te rośliny umieścić za zgodą dyrektora. I w ten sposób ogrody botaniczne przekształcą się w rezerваты, jak dla Indian.

A jak już poznamy, słabe strony zagrożonego gatunku, to może uda się rozpocząć prace celowane w to słabe miejsce. Na przykład, jeśli przyczyną słabości jest krótka żywotność nasion, można podjąć działania nad jej przedłużeniem poprzez hormonizację, może stratyfikację, może kontrolowaną imbibicję i tak dalej. I dopiero, jak wszystkie metody zawiodą, należy podjąć kroki ostateczne i przejść do metod *in vitro*, czy chłodzenia, tak jak chorych wprowadza się w stan kontrolowanej śpiączki, albo podcina pod sztuczne krążenie.

Dyskusja

Na wstępie Doktorantka krótko przedstawiła cel i przebieg swojej pracy. Niby powtórzenie, ale jakże właściwe w tym miejscu. W szczególności zaznaczyła, że szacuje się, iż dla 5 tysięcy zagrożonych gatunków, metody konserwacji *in vivo* nie są efektywne. Ta konstatacja niejako „ustawia” ocenianą pracę i pokazuje wagę zastosowanych w pracy metod konserwacji. Następnie Autorka przedstawia znaczenie metod, jakie zastosowała, fizjologiczne podstawy ich działania, a także efektywność tych metod. Głównie chodzi mi o kapsułowanie, obniżenie temperatury wzrostu, rolę naturalnego spoczynku, dobór warunków świetlnych a w tym możliwą odmienną rolę światła w kulturach *in vitro* w porównaniu z warunkami naturalnymi, optymalny fotoperiod, znaczenie cukrów, znaczenie występowania ciemnego okresu w procesie hodowli, symulowanie okresowego niedoboru cukrów i wreszcie efektywność stosowania w kulturach *in vitro* fitohormonów hamujących wzrost, jak ABA i JA i wreszcie rolę stresu jako całościowego procesu i poszczególnych jego składników i czynników.

Z uznaniem stwierdzam, że Doktorantka nie przeprowadziła zubożonej wersji dyskusji, spotykanej często nie tylko w rozprawach doktorskich ale także w publikacjach, gdzie występuje ona jako „buchalterskie” porównanie uzyskanych przez siebie wyników z wynikami opisanymi przez innych i zaznaczenie które wyniki są zgodne z cytowanymi publikacjami, a gdzie tej zgody nie ma. Przedstawiona w rozprawie „dyskusja” jest tekstem dojrzałym, wzbogacającym całą rozprawę i podnoszącym znakomicie jej poziom naukowy, a przy okazji świadczącym o Autorce, jako osobie dojrzałej do prowadzenia badań naukowych. Tak więc bardzo wysoko oceniam przeprowadzoną przed Doktorantką dyskusję.

Podsumowanie i wnioski

Autorka zebrała wyniki swojej pracy, formułując wnioski, które faktycznie pełnią funkcje mieszane – jako wnioski i podsumowanie. Z doświadczenia wiem, że często doktoranci traktują obydwie określenia zamiennie. Autorka sformułowała 9 krótkich i konkretnych wniosków, które oddają główne rezultaty wykonanych eksperymentów. Oceniam je bardzo pozytywnie i przyznam się, że podczas studiowania wielości zaprezentowanych wyników niepokoiłem się o to, jak Doktorantka poradzi sobie z ich ogarnięciem. Dodatkowo, po podsumowaniu Doktorantka zamieściła dwa akapity, które stanowią wniosek kończący pracę i wybiegający w przyszłość. Akceptuję ten fragment pracy i uważam go za cenne zamknięcie całości rozprawy.

Spis literatury

Nie mam uwag, co do doboru cytowanych publikacji, których autorka zebrała znaczącą liczbę. Nie dziwi to zresztą, jeśli wziąć pod uwagę wielość zagadnień biologicznych, analitycznych i fizjologicznych, które wymagały omówienia lub przedyskutowania.

Wniosek końcowy

Wyrażam opinię, która we mnie narastała w trakcie studiowania rozprawy, łącznie z tematem, który pochwaliłem na wstępie niejako *a priori*. Uważam, że rozprawa przedstawiona przez Panią mgr Monikę Kamińską, doskonale, wpisuje się w wysiłki botaników i ekologów dla opracowania i weryfikacji metod konserwacji i przedłużenia ochrony zagrożonych roślin zagrożonych gatunków na przykładzie mniszka pienińskiego (*Taraxacum pieninnicum*). Badania zostały przeprowadzone w oparciu o nowoczesne metody badawcze i analityczne, w tym metodę hodowli *in vitro*, w chłodzie oraz w temperaturze optymalnej, analizy zmian metabolicznych zachodzących pod wpływem zmian równowagi hormonalnej w hodowanych tkankach, analizy biochemicznych aspektów stresu, głównie stresu oksydacyjnego, wreszcie metody badań molekularnych. W tym znaczeniu Doktorantka wytyczyła nowe drogi badawcze i kompleksowe metody analiz, jako propozycje dla przyszłych badań. Poza tym godna podkreślenia jest szczegółowa analiza uzyskanych wyników, także prawidłowa i kompletna analiza statystyczna i wreszcie rzadko spotykana tak szczegółowa dyskusja wyników, wykonana, co podkreślę, na podstawie cytowanego bardzo bogatego piśmiennictwa.

Przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie kryteria wymagane dla dysertacji doktorskiej, a wielością przedstawionych wyników i merytoryczną wagą większości z nich, plasuje ją w szeregu tych najlepszych. Wysoko oceniłem także „ogarnięcie” całości przedstawionych detalicznych wyników i wpasowanie ich w ramy podsumowania i konkretnych wniosków. Dlatego stawiam wniosek nie tylko o dopuszczenie Pani mgr Moniki Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, ale także o wyróżnienie rozprawy, a powody tego ostatniego wniosku zawarłem w poprzednim akapicie.

Kraków, 21.11 2019



Prof. dr hab. Franciszek Dubert