

Skierniewice, 17.06.2019

Dr hab. Małgorzata Podwyszyńska, prof. I.O.  
Zakład Biologii Stosowanej  
Instytut Ogrodnictwa  
Ul. Konstytucji 3 Maja 1/3  
96-100 Skierniewice  
e-mail: [malgorzata.podwyszynska@inhort.pl](mailto:malgorzata.podwyszynska@inhort.pl)  
tel. 46 83453353

## RECENZJA

### pracy doktorskiej pt. Wybrane aspekty mikrorozmnażania wawrzynka wilczełyko (*Daphne mezereum* L.)

**Autor: mgr Karolina Nowakowska**

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Nowakowskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Pacholczaka w Katedrze Roślin Ozdobnych Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Metoda mikrorozmnażania stwarza szerokie możliwości, zwłaszcza w przypadkach, w których tradycyjne metody rozmnażania wegetatywnego zawodzą i nie pozwalają na szybkie rozmnożenie zdrowych roślin o potwierdzonej tożsamości odmianowej. Technika mikrorozmnażania jest wsparciem dla hodowców, pragnących szybko rozmnożyć i wprowadzić na rynek nowe odmiany, a także szkółkarzy chcących poszerzyć asortyment o gatunki rzadko produkowane ze względu na trudności w rozmnażaniu wegetatywnym czy problemy z uzyskaniem zdrowego materiału wolnego od chorób. Ponadto mikrorozmnażanie jest szeroko wykorzystywane w programach ochrony gatunków zagrożonych wyginieciem. Wybór do badań wawrzynka wilczełyko oraz jego uprawnej formy o białych kwiatach jest szczególnie uzasadniony, gdyż wpisuje się nie tylko w potrzeby rynku szkółkarskiego, ale też konieczność ochrony gatunkowej.

Przedstawiona do recenzji praca została napisana na 202 stronach, łącznie z załącznikami obejmuje 236 stron. Została zilustrowana 29 fotografiami dobrej jakości. Wyniki zamieszczono w 52 tabelach, na 13 wykresach, zawiera 282 pozycje literaturowe, spis 9 aktów prawnych dotyczących ochrony gatunkowej i bioróżnorodności, 92 załączniki w formie tabelarycznej ze składem stosowanych pożywek, sekwencjami starterów wykorzystywanych w analizach molekularnych i wynikami analiz wariacji, które uwiarygodniają istotność różnic pomiędzy średnimi.

Spis treści zawiera 7 głównych rozdziałów podzielonych aż na 80 podrozdziałów i podpunktów. Zostały one ułożone według powszechnie stosowanej kolejności. Pracę poprzedzają streszczenia w języku polskim i angielskim, w których ujęto wszystkie aspekty pracy.

**Wstęp** jest krótki i treściwy. W klarowny sposób uzasadnia celowość podjętych badań nad mikrorozmnażaniem wawrzynka wilczełyko, gatunku rzadko występującego w Polsce a zagrożonego z powodu niszczenia jego siedlisk poprzez ścinanie atrakcyjnie kwitnących pędów. Zamieszczono również wykaz skrótów, który pozwala ominąć stosowanie pełnych nazw często używanych terminów i nazw związków chemicznych.

**Przegląd literatury** światowej i krajowej jest bardzo obszerny, obejmuje 45 stron i jest podzielony na 6 głównych podrozdziałów z licznymi podpunktami; świadczy o dobrej znajomości zagadnienia oraz o umiejętności przedstawiania przez doktorantkę najważniejszych wyników badań prowadzonych na świecie. Pierwsze 3 rozdziały zostały opisane bardzo dobrze. Autorka wykazała w nich znajomość problematyki dotyczącej zagrożeń dla środowiska naturalnego związanych z działalnością człowieka, poruszyła aspekty ochrony gatunkowej, regulacji prawnych dotyczących ochrony środowiska i zachowania bioróżnorodności na świecie, w Unii Europejskiej oraz w kraju. Przytacza akty prawne począwszy od zapisów w Konstytucji RP, poprzez dyrektywy Rady EWG oraz krajowe ustawy i rozporządzenia. Dokonała szczegółowego opisu botanicznego wawrzynka wilczyńko, jego wymagań siedliskowych i statusu prawnego, jako gatunku objętego od roku 2014 częściową ochroną gatunkową, przytaczając zapisy stosownego rozporządzenia. Doktorantka charakteryzuje dwie formy botaniczne wawrzynka 'Alba' i 'Rubra'. W kolejnych podrozdziałach interesująco ze znajomością tematu, opierając się również na własnych doświadczeniach, omawia trudności związane z rozmnażaniem wegetatywnym ze względu na bardzo niskie zdolności sadzonek do ukorzeniania oraz generatywnym z powodu słabego kiełkowania nasion oraz ich bardzo ograniczonej dostępności. Autorka przytacza także informacje o swoich wcześniejszych pracach, w tym zakończone sukcesem doświadczenie z dobrymi, około 90-procentowymi wschodami roślin uzyskanymi po letnim wysiewie nasion. Szczegółowo opisuje przeszkody natury fizjologicznej, budowy anatomicznej czy biochemicznej, które mogą być przyczyną słabego ukorzeniania sadzonek wawrzynka i innych gatunków roślin drzewiastych. Brakuje pozycji literaturowej odnoszącej się do hamującego ryzogenezę działania kumaryny (str. 33).

W podrozdziale 4. Autorka omówiła ogólnie poszczególne etapy mikrorozmnażania. Interesująco i szeroko opisała zagadnienie dotyczące występowania endogennych bakterii, jako uciążliwych zanieczyszczeń utrudniających zapoczątkowanie kultur in vitro wielu gatunków roślin, w tym wawrzynka, problemu, z którym sama się zmagając prowadząc badania. Nie uniknęła kilku błędów: s. 36 - Tween, który....ułatwia działanie detergentów (Tween jest detergentem); s. 37, w. 8 - bakterie endogenne pozostają w stanie letalnym (latentnym); s. 39 – pożywka... jest idealnym środowiskiem (nie zawsze); podpunkt 4.2. Namnażanie - niepotrzebne są informacje dotyczące regeneracji roślin z pojedynczych komórek, protoplastów czy kalusa - praca doktorska dotyczy mikrorozmnażania opartego na stymulacji do rozwoju pąków bocznych (kątowych czy inaczej pachwinowych) bezpośrednio z eksplantatów inicjalnych - fragmentów pędów z pąkami bocznymi; s. 44, w. 3. - potwierdzili ten precedens (raczej regułę, prawidłowość); s. 44, w. 3 od dołu - węgiel nie indukuje ukorzeniania, może oddziaływać korzystnie, sprzyjać jakiemuś procesowi; podpunkt 4.4. Aklimatyzacja – kilka informacji jest powtórzonych w punkcie 5.4. Węglowodany w pożywce – w tym podpunkcie są pewne nieścisłości dotyczące niewystarczającej aktywności fotosyntetycznej oraz słabej sprawności aparatów szparkowych, cienkiej kutikuli roślin w warunkach in vitro, co skutkuje ich niskimi zdolnościami do adaptacji ex vitro; s. 46, akapit 2. - sformułowanie „rośliny nie są w stanie samodzielnie fotosyntetyzować” jest nieuprawnione, gdyż w licznych pracach dowiedziono, że rośliny w kulturach in vitro są zdolne do fotosyntezy, ale na skutek niskiej intensywności światła i ograniczonej wymiany gazowej (niedostatku CO<sub>2</sub>) aktywność fotosyntetyczna jest częściowo hamowana; s. 47, akapit 2. - informacje o aklimatyzacji powszechnie znane, zbyt szczegółowe, mogły być pominięte;

W podrozdziale 5. Autorka wyczerpująco opisała czynniki wpływające na regenerację roślin in vitro, wiele uwagi poświęciła roli regulatorów wzrostu. W podrozdziale tym jest kilka niedociągnięć: podpunkt 5.1.2. Zawartość związków organicznych i ich rola w roślinie - nie wnosi wiele - są to informacje powszechnie znane i można je było pominąć. Znajduje się tu też kilka nieścisłości, czy

niefortunnych sformułowań, np. „substancja zwana chlorofilem”, „zmiany dwutlenku węgla i wody na węglowodan” (raczej asymilacja, przemiana); „węglowodany stanowią ważny substrat zapasowy” (raczej materiał zapasowy); s. 50 – „cukry, niczym hormony...” (cukry pełnią też funkcję cząstek sygnałnych); s. 51 – pożywka White’a (rok?); s. 59 – „cytokininy...w przypadku roślin drzewiastych stymulują proliferację pędów” (także innych grup roślin); s. 59 – „najlepiej to widać na zbliżonych do siebie roślinach” (spokrewnionych gatunkach).

W podrozdziale 6. poprawnie zostało omówione zagadnienie występowania podczas mikrorozmnażania zmienności genetycznej będącej wynikiem zmian w strukturze DNA (mutacji) czy zmian epigenetycznych - przejściowych na skutek m.in. zmiany stopnia i wzoru metylacji DNA. Jednakże 12-wierszowy wprowadzający tekst (s. 60) nie dotyczy tego zagadnienia - autorka opisuje w nim zróżnicowane, zależne od genotypu, reakcje roślin na czynniki występujące w kulturach in vitro; s. 62 – dla markerów ISSR powszechnie używa się terminu markery polimorfizmu sekwencji międzymikrosatelitarnych.

**Materiały i metody** zostały opisane jasno i szczegółowo, w prawidłowej kolejności w odniesieniu do omawianych dalej wyników. Jednak brakuje kilku istotnych szczegółów metodycznych w części dotyczącej doświadczeń etapu namnażania – nie podano liczby powtórzeń i informacji, jakie to były eksplantaty: czy były to eksplantaty inicjalne – fragmenty pędu pobierane z krzewów czy pojedyncze pędy z już istniejących kultur in vitro. Tytuł doświadczenia 2.1.2.7, nie jest zgodny z jego celem - badano w nim wpływ regulatorów wzrostu oraz rodzaju pożywki na wzrost i rozwój pędów oraz parametry biochemiczne dwóch genotypów wawrzynka; brakuje informacji kiedy zbierano próby (po 6 tyg.?). Podobnie tytuł doświadczenia 2.1.3.3. również jest nieadekwatny do celu - badano wpływ stężenia IBA w pożywce półpłynnej z dodatkiem perlitu na ukorzenianie mikrosadzonek *D. mezereum*.

W opisie doświadczeń niepotrzebne są tabele 2, 3, 4 i 5, gdyż wszystkie informacje zamieszczono w tekście. Zamiast określenia „0” lepiej używać terminu kombinacja kontrolna lub kontrola, gdyż w tekście zdefiniowano co ją stanowi.

**Wyniki** zostały opracowane bardzo starannie i szczegółowo. Doktorantka rozpoczęła badania od zapoczątkowania kultur in vitro z fragmentów młodych pędów pobieranych z krzewów rosnących na stanowiskach naturalnych, w Katedrze Roślin Ozdobnych - SGGW oraz w szkołkach, przy czym tylko materiał z dwóch ostatnich źródeł dał początek kulturom in vitro, które wykorzystywano do dalszych badań. Największym problemem na tym etapie były zanieczyszczenia endofityczną bakterią. Autorka w szczegółowych analizach, w tym z wykorzystaniem najnowszych metod opartych na sekwencjonowaniu bakteryjnego DNA, zidentyfikowała uciążliwą bakterię, jako *Mycobacterium* z grupy prątków. Określiła też z dużym prawdopodobieństwem gatunek bakterii jako *M. peregrinum* lub *M. vanbaaleni*, powszechnie występujących w glebie i wodzie. Uważam ten fragment pracy za bardzo udany. Następnie Doktorantka cierpliwie krok po kroku, stosując różne zabiegi odkażania uzyskiwała czyste kultury, które mogła wykorzystać do dalszych badań nad regeneracją i namnażaniem pędów. W kolejno przeprowadzonych doświadczeniach wykazała, że najlepszą pożywką do namnażania pędów wawrzynka, ze względu na uzyskiwane najwyższe współczynniki namnażania oraz dobrą jakość mikrosadzonek, jest MS z dodatkiem 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA, zawierająca meta-Topolinę. Nieco mniejsze liczby pędów uzyskiwano w obecności BA. Dodatek GA<sub>3</sub> do wymienionych pożywek nie spowodował zwiększenia współczynnika rozmnażania. W obecności zeatyny uzyskiwano mniej pędów, a 2iP, kinetyna i TDZ w zastosowanym stężeniu 1 mg l<sup>-1</sup> okazały się nieprzydatne do namnażania pędów wawrzynka. Zbędne było przeprowadzenia doświadczenia 1.2.6. - kombinacje regulatorów wzrostu BA,

mT i GA<sub>3</sub> (wszystkie w stężeniu 1 mg l<sup>-1</sup>) w połączeniu z 0,1 mg l<sup>-1</sup> NAA w pożywce MS i WPM były już oceniane w poprzednich doświadczeniach. Sukcesem zakończył się cykl doświadczeń poświęcony ukorzenianiu *in vitro*. Dzięki zoptymalizowaniu stężenia IBA (4 mg l<sup>-1</sup>) oraz zastosowaniu półpłynnej pożywki WPM zawieszanej w perlicie Doktorantka uzyskała stosunkowo wysoką efektywność ukorzeniania - około 50% więcej ukorzenionych pędów niż na pożywce tradycyjnie zestalanej agarom z tą samą zawartością IBA. Dodatek do pożywki węgla aktywnego wpłynął hamująco na ukorzenianie. Do tej części pracy mam następujące uwagi. Na wykresach 4, 5 i 6 w opisach osi X nie jest konieczne podawanie informacji o pożywce WPM. Ponadto umieszczenie tych trzech wykresów w ramach 1 rysunku ułatwiłoby interpretację wyników; podobna uwaga dotyczy wykresów 7, 8, 9 oraz 10, 11 i 12. Dla trzech ostatnich wymienionych wykresów sugeruję zmianę tytułu: Wpływ IBA w półpłynnej pożywce WPM z dodatkiem perlitu na ukorzenianie pędów wawrzynka. Brakuje informacji na temat aklimatyzacji roślin i dalszego ich wzrostu w warunkach *ex vitro*.

Niewiele natomiast wnoszą do pracy analizy molekularne, których celem była ocena stabilności genetycznej rozmnażanego *in vitro* materiału roślinnego, sprawdzenie czy zastosowane regulatory wzrostu spowodowały zmiany genetyczne (mutacje) wykrywalne markerami RAPD i ISSR. Otóż do badań pobrano eksplantaty nie z jednego, ale wielu różnych krzewów pochodzących z rozmnażania generatywnego, a więc zróżnicowanych genetycznie. Nie oznaczono rozklonowanych roślin tak, by było wiadomo, z której rośliny matecznej pochodzą. W związku z tym nie można było uzyskanych polimorficznych produktów analizy molekularnej DNA mirorozmnażanych roślin odnieść do profilu DNA roślin matecznych, z których pochodziły. Te wyniki są więc niepublikowalne. Natomiast korzyścią tej części pracy są wyselekcjonowane startery ISSR i RAPD, których użycie w analizie molekularnej genotypów wawrzynka generuje liczne produkty polimorficzne. W przyszłości startery te mogą być użyte do oceny stabilności czy tożsamości genetycznej lub stopnia pokrewieństwa genotypów wawrzynka wilczełyko.

Ciekawym fragmentem pracy są wyniki dotyczące zróżnicowanych w mikrorozmnażanych pędach zawartości chlorofilu, karotenoidów, cukrów, aminokwasów, białka, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz aktywności katalazy w zależności od stosowanych regulatorów wzrostu. Doktorantka wykazała, że w porównaniu do innych regulatorów wzrostu, meta-Topolina oprócz pozytywnego wpływu na wzrost i rozwój pędów wawrzynka *in vitro*, spowodowała zwiększenie w pędach zawartości chlorofilu oraz ww. związków organicznych. W obecności tej cytokininy niższy był poziom jednego z wolnych rodników H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wszystko to zdaniem autorki przemawiało za tym, iż mT wpływała korzystniej niż BA na kondycję mikrorosadzonek wawrzynka.

Mam jednak kilka ogólnych uwag do całego rozdziału. Wyniki doświadczeń dotyczących namnażania pędów i ukorzeniania są opisane zbyt szczegółowo, powinny być ujęte bardziej syntetycznie. W każdym doświadczeniu wyniki ocenianych cech (np. % regeneracji, liczba i długość pędów) można było umieścić nie w trzech, ale w jednej tabeli, pomijając średnie uzyskane dla kombinacji regulatorów wzrostu i dla rodzaju pożywek. Podobnie w przypadku wyników dotyczących ukorzeniania, każda cecha: % ukorzenionych pędów, liczba i długość korzeni, podane są w oddzielnych tabelach – powinny być umieszczone w jednej tabeli. Wydaje się, że nie było konieczne przedstawianie wyników obserwacji wykonanych w pierwszym terminie - po 3 tyg. Można je było krótko skomentować w tekście. Zmniejszyłoby to znacznie objętość pracy i ułatwiło interpretację wyników. Wyniki w tabelach dotyczące wpływu regulatorów wzrostu na regenerację i namnażanie pędów oraz na parametry biochemiczne pochodzą z analizy jednoczynnikowej wariancji wykonanej oddzielnie dla każdego rodzaju pożywki; tak wynika z oznaczeń literowych, średnie (w ostatniej kolumnie i ostatnim wierszu) pochodzą z analizy dwuczynnikowej. Wydaje się to niezrozumiałe.

Ciekawa i wnosząca nowe informacje na temat formowania zawiązków korzeni przybyszowych jest część pracy poświęcona obserwacjom anatomicznym pędu wawrzynka. Doktoranta wykazała, że budowa wewnętrzna pędów jest typowa dla roślin drzewiastych, IBA w wyższym stężeniu wpływało na przyspieszenie procesu różnicowania drewna wtórnego; zawiązki korzeni przybyszowych formowały się na zewnątrz pierścienia drewna wtórnego, bardzo często w miejscach, gdzie zachowane były pierwotne promienie rdzeniowe, zaś dodatek do pożywki  $4 \text{ mg l}^{-1}$  IBA wyraźnie przyspieszał ich rozwój i zwiększał liczbę zawiązków korzeni przybyszowych.

**Dyskusja** została przeprowadzona poprawnie. Zostały poruszone wszystkie zagadnienia, którymi zajmowała się doktorantka w trakcie swoich badań. Wykazała zmysł krytyczny i dobrą znajomość literatury światowej, nie pominęła polskich autorów. Nie uniknęła jednak powtórzeń wyników (s. 177, 178, 180, 186) i kilku drobnych błędów czy nieprawidłowych sformułowań: s. 171 „porównaniu sekwencji z programem BLAST” – porównanie sekwencji przy użyciu programu BLAST z sekwencjami dostępnymi w bazie NCBI; s. 174 – tidiazuronu raczej nie uznaje się za cytokininę, uważa się, że jest związkami o działaniu cytokininy; s. 177 „...w stosunku do próby bez regulatorów wzrostu” – w stosunku do kombinacji czy traktowania, ten nieprawidłowy termin jest w kilku miejscach; s. 183 „m-Topolina wpływała lepiej na kondycję roślin optymalizując działanie czynników stresowych” – łagodząc działanie czynników stresowych; s. 184 – „zjawisko przypadkowego ukorzenia” – niezrozumiałe.

**Wnioski** z wyjątkiem ostatniego, dotyczącego analizy molekularnej mikrorozmnażanych roślin, zostały prawidłowo sformułowane i obejmują wszystkie osiągnięcia pracy.

**Za najważniejsze osiągnięcia naukowe oraz aplikacyjne** będące wynikiem badań prowadzonych przez mgr Karolinę Nowakowską uważam:

- zidentyfikowanie bakterii endofitycznej będącej sprawcą uciążliwych zanieczyszczeń mikrobiologicznych eksplantatów inicjalnych
- uzyskanie wysokiego współczynnika rozmnażania wawrzynka wilczetyko dzięki zastosowaniu odpowiedniej pożywki i kombinacji regulatorów wzrostu
- znaczne podniesienie efektywności ukorzenia mikrosadzonek dzięki zastosowaniu w podłożu perlitu jako nośnika oraz IBA w optymalnym stężeniu
- analiza mikroskopowa pędu wawrzynka, która wykazała, że IBA indukuje formowanie zawiązków korzeni na zewnątrz pierścieni drewna wtórnego często w miejscach występowania promieni rdzeniowych, przecząc hipotezie, że trudność ukorzenia wawrzynka, może wynikać z bariery anatomicznej.

Uwagi ogólne, skróty myślowe, nieprawidłowe sformułowania.

- Cytowania autorów podaje się zawsze w pierwszym zdaniu, w którym opisuje się ich wyniki; w kilku miejscach jest inaczej, np. s. 42, akapit 1.; s. 43, akapit 1.

- Numeracja fotografii, wykresów, rysunków, szkiców nie powinna być oddzielna dla każdego rodzaju ilustracji wyników. Bez względu na rodzaj to rycina (Ryc.) lub rysunek (Rys.).

- W wielu przypadkach używane są sformułowania typu: „eksplantaty się ukorzeniły” (s. 44) lub „hartowanie eksplantatów podczas aklimatyzacji” a chodzi o ukorzone mikrosadzonki, pędy czy hartowanie roślin.

- Sformułowania takie jak: „traktowanie najniższym stężeniem regulatora wzrostu”, „wysokie stężenie cytokininy zwiększyło” czy „dodatek wyższego stężenia GA<sub>3</sub>” – prawidłowo powinno brzmieć: traktowanie regulatorem wzrostu w najniższym stężeniu, cytokinina w wysokim stężeniu zwiększyła, dodatek GA<sub>3</sub> w wyższym stężeniu.

- Sterylizacja eksplantatów - powinno się używać terminu dezynfekcja.

Inne drobne błędy: s. 14 – NAA, kwas naftylo-1-octowy - zapis „kwas 1-naftylooctowy” też jest prawidłowy, ale jeśli nazwy innych auksyn zostały napisane inaczej, to konsekwentnie wszystkie trzeba zapisywać według przyjętej reguły; s. 17 „ewolucja zastopowała”; s. 25 „w temperaturze poniżej 8°C latają trzmiele” – już w temp. 8°C latają trzmiele; s. 65 „ocena cech morfologicznych bakterii” tu raczej chodziło o cechy kolonii bakteryjnych.

Podsumowując uważam, że mgr Karolina Nowakowska wybrała właściwy temat na pracę doktorską. Przedstawiona praca zawiera wiele cennych wyników i informacji. Autorka słusznie zajęła się identyfikacją endogennej uciążliwej w kulturach in vitro bakterii. Bardzo cenną częścią pracy jest opracowanie metody ukorzeniania mikrosadzonek wawrzynka wilczełyko. Pozwoli to na wykorzystanie mikrorozmnażania tego gatunku w produkcji szkółkarskiej, może przyczynić się do zwiększenia konkurencyjności tej ważnej gałęzi ogrodnictwa.

Błędy i niedociągnięcia, które zmieściłam w recenzji, będą zapewne łatwe do usunięcia przy opracowywaniu publikacji naukowych. Doktorantka prowadząc badania wykazała systematyczność, dociekliwość, umiejętność analizowania i interpretacji wyników. Na uznanie zasługuje jej znajomość różnych technik badawczych z zakresu kultur tkankowych, biologii molekularnej, mikrobiologii, fizjologii, mikroskopii oraz programów bioinformatycznych wykorzystywanych w nowoczesnych badaniach. Jest bardzo dobrze przygotowana do dalszej pracy badawczej.

Uważam, że Dysertacja doktorska Pani mgr Karoliny Nowakowskiej wnosi wartości naukowe i aplikacyjne. Oceniam pracę pozytywnie, uważając, że spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z tym stawiam wniosek do Rady Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu – Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Nowakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Małgorzata Podwyszyńska

