

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Mirosław Angielczyk

Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë*

*australis* (Schrad.) Roem. et Schult)

w jej naturalnym środowisku i w uprawie

Development of southern sweet-grass (*Hierochloë australis*

(Schrad.) Roem. et Schult) in its natural environment

and in cultivation

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Zenona Węglarza

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzenci:

Prof. dr hab. Jerzy Puchalski

PAN Ogród Botaniczny

Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie

Prof. dr hab. Ewa Osińska

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2015

## Streszczenie

### **Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë australis* (Schrad.) Roem. et Schult) w jej naturalnym środowisku i w uprawie**

Przeprowadzone badania wykazały, że na obszarze północno-wschodniej Polski turówka leśna występuje w trzech zespołach roślinnych, w oddalonych od siebie, ubogich pod względem ilościowości populacjach. Populacje te są wyraźnie zróżnicowane fenotypowo, zarówno pod względem cech rozwojowych jak i zawartości związków kumarynowych. Wykazano, że roślina ta charakteryzuje się wysoką zdolnością adaptacyjną, zarówno przy jej reintrodukcji na stanowiskach naturalnych, jak i w uprawie. W uprawie charakteryzuje się ona także dużym potencjałem reprodukcyjnym, pozwalającym na jej rozmnażanie na drodze generatywnej jak i wegetatywnej. Naturalnie niską zdolność kiełkowania nasion można skutecznie podnieść poprzez kompleksowe użycie przedsięwziętych zabiegów tj. stratyfikacji, skaryfikacji i regulatorów wzrostu. Po raz pierwszy dla tej rośliny opracowano metodę rozmnażania w kulturach *in vitro* na drodze regeneracji pośredniej z użyciem niedojrzałych kwiatostanów jako eksplantatów inicjalnych. Uzyskane wyniki wskazują, że najważniejsze plonotwórcze parametry u turówki leśnej tj. liczba i masa liści osiągają najwyższe wartości przy 30% ograniczeniu dostępu światła słonecznego do roślin, a najwyższą zawartość kumaryny stwierdzono przy 50% zacienieniu. Masa liści oraz zawartość w nich kumaryny zależała także od wieku roślin i terminu zbioru liści. Podjęte próby uprawy turówki leśnej w ekologicznym gospodarstwie rolnym wskazują na możliwość jej uprawy na większą skalę.

**Słowa kluczowe:** populacje, reintrodukcja, zacienianie, wiek roślin, rozmnażanie, związki kumarynowe, uprawa polowa

## Summary

### **Development of southern sweet-grass (*Hierochloë australis* (Schrad.) Roem. et Schult) in its natural environment and in cultivation**

The undertaken studies indicate that in the area of north-eastern Poland southern sweet-grass occurs in three phytocenosis. Its populations are poor in terms of abundance and far away from each other. Examined populations differed in respect of developmental trait as well as content of coumarin compounds. It was shown that the species is characterized by high adaptability both in the reintroduction into natural sites and in cultivation. Southern sweet-grass is also characterized by high reproductive potential which allows, *ex situ*, for its generative and vegetative propagation. Naturally low germination ability of seeds can be increased by comprehensive pre-sowing treatment i.e. stratification, scarification and growth regulators. First time, for southern sweet-grass, the procedure of *in vitro* propagation on the way of intermediate regeneration, with using of immature inflorescences as initial explantats, was elaborated.

Obtained results indicate that the most important yielding parameters i.e. number and mass of leaves were the highest at 30% reduction of sunlight, while the highest content of coumarin in leaves was obtained at 50% reduction of sunlight. The yield of leaves and coumarin accumulation depended also on the plant age and the term of harvest. Undertaken trials of cultivation of southern sweet-grass in organic farm indicate the possibility of its cultivation on bigger scale.

**Key words:** populations, reintroduction, shading, plant age, reproduction, coumarin compounds, field cultivation

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej mgr inż. Mirosława Angielczyka**

**pt. „Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë australis* (Schard.) Roem. et Schult)  
w jej naturalnym środowisku i w uprawie”**

**wykonanej na Wydziale Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu pod  
kierunkiem prof. dr hab. Zenona Węglarza**

**1. Uwagi ogólne**

Wymogiem rozprawy doktorskiej jest, aby stanowiła ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywała ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, a także jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Podejmując się recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Mirosława Angielczyka, starałam się stwierdzić na ile dysertacja ta spełnia wymienione powyżej wymogi.

Drobiazgowa analiza literatury dotyczącej przedmiotu badań pozwoliła mi ustalić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie ukazujące w sposób kompetentny zagadnienia związane z rozwojem turówki leśnej (*Hierochloë australis* (Schard.) Roem. et Schult) w jej naturalnym środowisku i w uprawie. Turówka leśna jest gatunkiem mało poznanym. W Polsce spotykana jest w niewielkich skupiskach, w dużym rozproszeniu, głównie na Podlasiu oraz części Mazur i Mazowsza. Stanowiska na których rośnie są ubogie pod względem liczebności tego gatunku, nawet w miejscach jej najliczniejszego występowania. Obserwuje się również ustępowanie tego gatunku z naturalnych stanowisk, które związane jest z charakterystycznym jego rozwojem oraz z niewłaściwym zbiorem liści stanowiących surowiec kumarynowy. Od roku 1983 turówka leśna objęta jest w naszym kraju ochroną częściową, a rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 roku stan ten utrzymało. Umieszczona jest ona także (od roku 2006) na czerwonej liście roślin i grzybów Polski w grupie gatunków narażonych na wyginięcie, nie ulega więc wątpliwości, że badania zaprezentowane w tej pracy są ważne a jednocześnie bardzo interesujące. Praca dobrze ilustruje zagadnienie szeroko pojętej ochrony roślin leczniczych w naturalnym środowisku. Warto podkreślić, że na tle wielu publikacji z tego zakresu (wymienionych i cytowanych przez Autora), praca mgr Mirosława Angielczyka

wyróżnia się nie tylko tym, że badania zostały mocno skoncentrowane w czasie (cztery lata) ale przede wszystkim porusza wątki często całkowicie pomijane lub też analizowane we wspomnianych publikacjach tylko pobieżnie.

Pod względem metodologicznym dysertacja doktorska nie budzi wątpliwości i posiada charakter nowatorski.

## **2. Wybór przedmiotu i tematu rozprawy**

Problematyka wprowadzania do uprawy dziko rosnących roślin leczniczych nabiera obecnie szczególnej wagi, ze względu na zagrożenia dla naturalnego środowiska wynikające z ich nadmiernego i niekontrolowanego zbioru, jak i na rosnące wymagania ze strony przemysłu farmaceutycznego i przetwórczego co do jakości przetwarzanych surowców. Obydwa te aspekty zostały uwzględnione w pracy i przez jej autora rozwinięte.

Turówka leśna (*Hierochloë australis* (Schard.) Roem. et Schult) jako obiekt badawczy budzi zainteresowanie zarówno ze względu na jej znaczenie fitosocjologiczne jak i możliwości wykorzystania leczniczego i przyprawowego. Gatunek ten jest rośliną charakterystyczną dla flory naszego kraju i należy do bardzo „starych” polskich roślin użytkowych. Mimo upływu lat zapotrzebowanie na surowiec (liście), który wciąż pozyskiwany jest wyłącznie ze stanowisk naturalnych, jest duże i ciągle rośnie. W takim samym, a może jeszcze większym stopniu maleją zasoby naturalne tego gatunku. Realnym wyrazem powyższej sytuacji są coraz większe trudności związane z zaspokojeniem potrzeb przemysłu na ww. surowiec. Dodatkowo rosnąca z roku na rok cena skłania zbieraczy ziół do nieprzestrzegania zasad dobrej praktyki zbioru roślin dziko rosnących.

Szansą na zachowanie tej wartościowej rośliny w środowisku naturalnym jest lepsze poznanie fitosocjologicznych uwarunkowań jej występowania, przy zmieniającej się strukturze użytkowania lasów. Równie ważne jest szczegółowe poznanie biologii rozwoju turówki leśnej i wpływu czynników środowiska na ten proces w aspekcie wprowadzenia tego gatunku do uprawy. Przeprowadzone przez mgr Mirosława Angielczyka badania są próbą naświetlenia tego problemu i szczegółowego jego wyśnienienia.

## **3. Cel pracy, tezy i pytania badawcze**

Praca nie zawiera co prawda jasno sformułowanych hipotez badawczych ale za to profesjonalnie postawione i sformułowane cele badawcze, które wyczerpująco obrazują jej zakres przedmiotowy.

W zakresie poznawczym:

1. Poznanie zróżnicowania środowiskowego i chemicznego wybranych populacji turówki leśnej występującej na stanowiskach naturalnych we wschodniej Polsce.
2. Poznania biologii rozwoju wybranych populacji turówki leśnej w warunkach ich uprawy.
3. Określenie generatywnego i wegetatywnego potencjału reprodukcyjnego roślin.
4. Określenie relacji pomiędzy stopniem zacienienia roślin, a ich rozwojem i zmianami w gromadzeniu się związków kumarynowych.

W zakresie praktycznym:

1. Określenie skuteczności reintrodukcji turówki leśnej na wybranych stanowiskach naturalnych.
2. Określenie możliwości uzyskania standaryzowanego surowca pochodzącego z upraw.
3. Określenie wpływu stopnia zacienienia roślin oraz rodzaju podłoża na plonowanie turówki leśnej.

Ww. cele znajdują wyraz w treści pracy, gdzie Autor bierze pod uwagę różne elementy i aspekty badanych zjawisk i procesów.

#### **4. Struktura rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr Mirosława Angielczyka pt. „Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë australis* (Schard.) Roem. et Schult) w jej naturalnym środowisku i w uprawie” realizowana w latach 2011-2014 obejmuje 150 stron, 69 tabel, 6 barwnych wykresów, 6 rysunków i 85 fotografii. Opracowanie składa się ze wstępu i pięciu rozdziałów problemowych, ma zwartą i jednolitą strukturę. Pewne wątpliwości budzi połączenie w jeden rozdział metod i wyników, przypuszczam jednakże, że jest to działanie celowe Autora, zmierzające do bardziej przejrzystego przedstawienia wyników badań. Ogólnie można przyjąć, że koncepcja i układ pracy są uzasadnione problematyką założeń badawczych.

Poszczególne rozdziały spełniają kryteria pozwalające na wyodrębnianie ich w samodzielne części podejmujące ważne aspekty całościowej problematyki.

#### **5. Ocena merytoryczna rozprawy**

Wstęp wprowadza czytelnika w obszar wiedzy objętej zakresem badań, a w „Celu pracy” Autor podaje powody dla których podjął ww. badania oraz w jakim kierunku będą one prowadzone.

Przeprowadzenie badań, omówienie wyników oraz wnioskowanie poprzedziły wnikliwe studia literaturowe, które pozwoliły Autorowi na zgromadzenie i zacytowanie w pracy 96 pozycji piśmiennictwa oraz 2 strony internetowe, wśród których 48 (tj. 50%) to prace obcojęzyczne. Świadczy to o dobrej podbudowie teoretycznej pracy. Rozdział „Przegląd literatury” obejmuje łącznie 19 stron, jest opracowany dobrze, zwięźle i wyczerpująco, a także, co według mnie jest bardzo ważne, bezbłędnie i ściśle związany z charakterem prowadzonych badań. Autor wykorzystał publikacje z zakresu różnych dziedzin nauki, co jest całkowicie zrozumiałe jeśli uwzględnimy interdyscyplinarność problematyki stanowiącej podstawowy przedmiot badań.

Rozdział „Metody i Wyniki” został podzielony na dwa główne podrozdziały tj.:

1. Turówka leśna w środowisku naturalnym
2. Turówka leśna w uprawie

Dobór metod badawczych odpowiada celowi pracy. Należy też podkreślić, że pomimo różnorodności zastosowanych przez Autora metod doświadczenia zostały przeprowadzone prawidłowo.

Metody badawcze obejmowały:

1. Badania terenowe dotyczące lokalizacji i dokumentacji wybranych populacji turówki leśnej oraz oceny chemicznej pochodzących z nich surowców, wewnątrzpopulacyjnej zmienności chemicznej oraz reintrodukcji roślin na stanowiskach naturalnych.
2. Badania uprawowe związane z charakterystyką wybranych populacji pod względem rozwojowym i chemicznym, generatywnym i wegetatywnym rozmnażaniem roślin, wpływem zacienienia, rodzaju podłoża i sposobu zbioru surowca na plonowanie i jakość liści.

Niektóre informacje dotyczące zastosowanych metod wymagają w mojej ocenie koniecznych uzupełnień przed oddaniem pracy do druku. W podrozdziale 1.1 pt. Lokalizacja i dokumentacja wybranych populacji oraz ocena chemiczna pochodzących z nich surowców” (str. 30) podano, że powierzchnia zbiorowisk, na których wykonane były poszczególne zdjęcia fitosocjologiczne wynosiła od 100 do 200 m<sup>2</sup>. Według Wysockiego i Sikorskiego (2002) w przypadku badań prowadzonych w zbiorowiskach leśnych (a takie fitocenozy były przede wszystkim oceniane) powinna ona wynosić co najmniej 500 m<sup>2</sup>. Zbyt mała powierzchnia objęta badaniami może przyczynić się do nieuchwycenia właściwej dla zbiorowiska kombinacji gatunków. Poza tym podano, że obserwacje przeprowadzono

jednokrotnie, w pierwszej połowie czerwca, tymczasem według ww. autorów dla pełnej charakterystyki danej fitocenozy leśnej, czyli aby możliwe było zidentyfikowanie większości występujących w niej gatunków oraz wyróżnienie jednostki fitosocjologicznej, należy przeprowadzić badania co najmniej dwa razy, w okresie od kwietnia do października.

Informacje przedstawione w podrozdziałach „Wyniki” są rzetelnym dowodem prawidłowo przeprowadzonych eksperymentów. Wyniki badań zaprezentowane są w postaci tekstu pisanego, uzupełnianego tabelami, rycinami i fotografiami. Są one bardzo obszerne i zróżnicowane, lecz wyraźnie podporządkowane nadrzędnemu celowi pracy jakim jest określenie biologii rozwoju turówki leśnej i wartości surowca uzyskanego w warunkach *in situ* i *ex situ*. Są one poprawnie zestawione oraz zweryfikowane statystycznie. Zaletą tej części pracy jest podział na mniejsze podrozdziały, co z jednej strony ułatwia prezentację wyników i ich omówienie, a z drugiej ułatwia ich zrozumienie przez czytelnika.

Autor przedstawionej do recenzji dysertacji wykazał w swoich badaniach, że turówka leśna charakteryzuje się wysoką zdolnością adaptacyjną zarówno przy nasadzeniach na stanowiskach leśnych jak i w uprawie. Poza tym stwierdził, że skuteczność reintrodukcji na gniazdowych zrębach leśnych zależy od składu gatunkowego roślin towarzyszących i ich ilościowości.

Wyniki uzyskane w badaniach *ex situ* są ważnym, a jednocześnie solidnie udokumentowanym przyczynkiem do szybkiego wprowadzenia tej rośliny do uprawy, a co za tym idzie dają szansę na usunięcie zagrożeń związanych z jej nadmiernym zbiorem ze stanowisk naturalnych. Szczegółowe badania porównawcze przeprowadzone na roślinach w 1-szym, 2-im i 3-im roku wegetacji pozwoliły na określenie zależności pomiędzy przyrostem masy organów nadziemnych (liści) a gromadzeniem się w nich istotnych z farmakologicznego punktu widzenia związków biologicznie aktywnych (kumaryn). Poznanie tych zależności poza bezsprzecznym walorem poznawczym, może być bardzo przydatne przy opracowywaniu agrotechniki tej rośliny i standaryzacji surowca przeznaczonego dla przemysłu.

Istotnym elementem badań przeprowadzonych w niniejszej rozprawie są doświadczenia związane z ważnym czynnikiem determinującym rozwój turówki leśnej - światłem. Rośliny rosły przy pełnym świetle oraz przy 30 i 50% ograniczeniu dostępu światła słonecznego. Reakcja roślin na zróżnicowane warunki świetlne była bardzo wyraźna. Poziom najważniejszych parametrów plonotwórczych tj. liczba liści i ich masa były najwyższe u roślin rosnących przy 30% ograniczeniu dostępu światła słonecznego, natomiast najwyższą zawartością kumaryny charakteryzowały się rośliny rosnące przy 50% ograniczeniu światła.

Autor w swoich badaniach poza dotychczasową standardową oceną surowca podjął próbę oceny wartości siewnej nasion turówki leśnej. Uzyskane w tym zakresie wyniki okazały się bardzo obiecujące szczególnie w przypadku stwierdzenia, że masa nasion oraz ich wartość siewna zależy od stopnia zacienienia roślin i intensywności ich użytkowania tj. liczby wykonanych w okresie wegetacji zbiorów liści. Naturalnie niską zdolność kiełkowania nasion turówki leśnej można podnieść poprzez zastosowanie zabiegów przedśiewnych takich jak stratyfikacja, skaryfikacja i użycie regulatorów wzrostu.

Dużą wartość poznawczą wydają się mieć także przedstawione w pracy wyniki badań dotyczących rozmnażania turówki leśnej w kulturach *in vitro*. Są one bardzo obiecujące i wskazują, że mikrorozmnażanie tej rośliny na drodze regeneracji pośredniej z użyciem niedojrzałych kwiatostanów jako eksplantatów inicjalnych może być źródłem materiału rozmnożeniowego. Interesujące wydaje się również to, że w badaniach tych przy użyciu odpowiednich regulatorów wzrostu (2,4-D i BA) udało się uzyskać kalus wykazujący regenerację zarodków somatycznych.

Przedstawiona do recenzji praca jest obszerna i wielowątkowa, dlatego też Autor nie uniknął pewnych nieścisłości i błędów, które powinny być usunięte przy przygotowywaniu publikacji do druku. O kilku z nich chciałabym wspomnieć:

- wartości mierzonych parametrów, zgodnie z obowiązującymi w Polsce zaleceniami, powinny być podane w systemie SI, czyli zawartość związków biologicznie aktywnych w badanych surowcach należy we wszystkich tabelach i dla wszystkich grup związków czynnych podać w  $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$  (w pracy system mianowania nie jest jednolity, część wyników podana jest prawidłowo [ $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ], część natomiast w procentach).
- str. 42, tabela 6 „Wybrane cechy użytkowe dziko rosnących populacji turówki leśnej”: proponuję uzupełnić tabelę o liczbę osobników, na których przeprowadzono obserwacje (dopisać  $n=6$ ,
- str. 57 podano, że obserwacje dotyczą przyjęcia się roślin w kolejnych dwóch latach po ich wysadzeniu, w tabeli 10 przedstawiono natomiast wyniki również z 3 roku wegetacji
- str. 60, tabela 11 w tytule podano, że obserwacje przeprowadzono w drugim roku po wysadzeniu roślin, a wcześniej str. 57 zamieszczono informację, że w tym czasie rośliny nie zakwitły, brakuje też informacji na ilu roślinach prowadzono obserwacje,
- według mnie rozdział 2.5 powinien zostać umieszczony bezpośrednio za rozdziałem 2.3.2, gdyż dotyczy podobnych zagadnień, podobna jest także metodyka badań. Sprawi to, że zamieszczone w tej części pracy wyniki będą bardziej czytelne.



Ostatnie dwa rozdziały tj. „Dyskusja wyników” i „Wnioski” opracowane są poprawnie co wskazuje że Autor, opierając się na danych literaturowych, prawidłowo interpretuje własne wyniki. Znalazło to wyraz w prawidłowo sformułowanych wnioskach.

Pragnę podkreślić, że pomimo ww. uwag, nie znajduję w niniejszej pracy żadnych wyraźnych niedociągnięć czy uchybień.

Do ważniejszych osiągnięć pracy zaliczam:

1. Określenie zróżnicowania środowiskowego i chemicznego wybranych populacji turówki leśnej występującej na stanowiskach naturalnych i skuteczności jej reintrodukcji.
2. Poznanie biologii rozwoju wybranych populacji turówki leśnej w warunkach naturalnych i uprawowych.
3. Określenie generatywnego i wegetatywnego potencjału reprodukcyjnego roślin.
4. Określenie relacji pomiędzy stopniem zacienienia roślin oraz rodzajem podłoża, a ich rozwojem i zmianami w gromadzeniu się związków kumarynowych.
5. Określenie możliwości uzyskania standaryzowanego surowca pochodzącego z upraw.

## 6. Konkluzja

Reasumując uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë australis* (Schard.) Roem. et Schult) w jej naturalnym środowisku i w uprawie”

jest opracowaniem wartościowym i oryginalnym, którego przygotowanie wymagało od Autora dużego wysiłku badawczego. Mam też nadzieję, że przedstawione w recenzji krytyczne uwagi zostaną przez Doktoranta właściwie odebrane, a wskazane niedociągnięcia zostaną wyeliminowane z pracy, jak również zostaną uwzględnione przy przygotowywaniu ewentualnych publikacji.

Dlatego, biorąc pod uwagę ważność problemu badawczego, któremu jest poświęcona oceniana rozprawa, oryginalną koncepcję przedstawionych badań, przeprowadzone poprawnie doświadczenia, wymagające opanowania nowoczesnych metod badawczych i uzyskanie oryginalnych wyników wskazujących na potwierdzenie stawianych celów stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym 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.Nr 65, poz.595 z późn. zm) i zwracam się do Rady Wydziału

Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Mirosława Angielczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Angielczyk', is positioned to the right of the main text block.

Prof. dr hab. Jerzy Puchalski  
Polska Akademia Nauk  
Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania  
Różnorodności Biologicznej w Powsinie  
ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej  
mgr. inż. Mirosława Angielczyka  
pt. „Rozwój turówki leśnej (*Hierochloë australis*  
(Schrad.) Roem. et Schult w jej naturalnym środowisku”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest wynikiem szerokich badań autora nad turówką leśną, ważną rośliną dla przetwórstwa zielarskiego, a jednocześnie stosunkowo rzadkim gatunkiem flory rodzimej uznanym za narażony na wymarcie. Praca składa się ze 150 stron druku, w tym na 26 stronach zamieszczono ilustracje fotograficzne, a na 8 stronach spis cytowanej literatury. Układ pracy można uznać za typowy, gdyż zawiera wszystkie części wchodzące zwykle w skład takich prac: wstęp, cel pracy, przegląd literatury, metody i wyniki, dyskusję wyników, wnioski i spis piśmiennictwa. Dodatkowo dołączono krótkie streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Nie została wyodrębniona specjalna część dla opisu materiałów badań. Również stosowane metody badawcze nie zostały opisane wspólnie w odrębnej części, ale podano je przy opisie poszczególnych części badawczych. Nie pogorszyło to czytelności pracy. Wstęp pracy napisany prawie na jednej stronie krótko uzasadnia celowość podjętych badań. Cel pracy ujęto oddzielnie w zakresie poznawczym jako 4 cele szczegółowe oraz jako 3 cele szczegółowe w zakresie praktycznym. Przegląd literatury został napisany na 20 stronach i obejmował opis badanego gatunku rośliny i jego występowania, a także rozwoju fenologicznego. Następnie zacytowano akty prawne dotyczące ochrony roślin zagrożonych w Polsce. Kolejne części przeglądu literatury obejmowały opis surowca pozyskiwanego z turówki leśnej i skład chemiczny ze szczególnym opisem kumaryn i ich działania na żywe organizmy. Jak już wspomniano, metody i wyniki

zestawiono w ramach pięciu części badawczych stanowiących odrębne zagadnienia badawcze.

Pierwsza z głównych części odnosiła się do występowania turówki leśnej w środowisku naturalnym. Obejmowała ona charakterystykę botaniczną, ekologiczną i chemiczną roślin turówki leśnej na wybranych 12 stanowiskach naturalnych w Polsce Północnej i Wschodniej różniących się między sobą liczebnością oraz typem siedliska. Na stanowiskach tych została wykonana pełna analiza fitosocjologiczna zbiorowisk roślinnych. Wyróżnione zostały trzy typy, na których występowała turówka leśna, dla których podano skład florystyczny obejmujący rośliny zielne, drzewa i krzewy. Następnie określono w formie dendrogramu podobieństwo składu gatunkowego tych 12 stanowisk. Wśród nich wyróżniało się stanowisko Sieśki zaklasyfikowane do nitrofilnych zbiorowisk zrębowych. Dla roślin ze wszystkich stanowisk zebrano dane o wybranych cechach użytkowych, jak liczba sztuk liści na roślinę, a także świeża i sucha masa liści na roślinę. Do opisu stanowisk dołączono bardzo dobrze wykonane fotografie roślin i populacji. Następnie w roślinach zebranych ze wszystkich 12 stanowisk wykonano analizę chemiczną związków biologicznie aktywnych: kumaryn, flawonoidów i kwasów polifenolowych. Dla kumaryny stwierdzono bardzo istotne zróżnicowanie zawartości w roślinach pochodzących z poszczególnych stanowisk od 52,03 do 275,74 mg/100 g s. m. Dla jednej wybranej populacji turówki leśnej z Jedwabna stwierdzono także istotną zmienność chemiczną w zawartości kumaryny wewnątrz tej populacji. Bardzo interesującym aspektem badawczym i konserwatorskim była próba reintrodukcji turówki leśnej na stanowiska wtórne w 4 zrębach leśnych położonych w nadleśnictwie Rudka. Podano pełną charakterystykę tych stanowisk pod względem glebowym i fitosocjologicznym oraz oceniono wzrost i rozwój roślin w cyklu trzyletnich obserwacji. Zastosowane typy uprawy potwierdziły dobre przyjęcie się roślin na tych stanowiskach reintrodukcyjnych.

Druga główna część badawcza obejmowała badania nad turówką w uprawie polowej i złożona była z 4 odrębnych zadań badawczych. Materiałem do badań były rośliny turówki leśnej pochodzące z naturalnych stanowisk i uprawiane na polu doświadczalnym SGGW z zastosowaniem zróżnicowanych warunków uprawy, zwłaszcza stopnia nasłonecznienia czy też zacienienia poletek. Wykonana została też ocena cech morfologiczno-rozwojowych roślin, a także przetestowano wartość siewną zebranych nasion. Dla wszystkich wariantów doświadczeń wykonano analizę

chemiczną kumaryn, flawonoidów i kwasów polifenolowych. Rośliny pochodzące z różnych populacji naturalnych różniły się istotnie między sobą pod względem morfologicznym: liczbą i długością pędów generatywnych i wegetatywnych, a także produktywnością i wielkością nasion. Taką samą zmienność morfologiczną obserwowano dla liści, a głównie ich liczby i masy. Obserwacje te wykonano dla roślin pierwszego zbioru oraz dla odrostu po zbiorze. W liściach badanych populacji wykonano analizy chemiczne trzech grup związków biologicznie aktywnych. Interesującym wynikiem było, iż zawartość kumaryny dla wszystkich populacji wzrastała wyraźnie dla liści drugiego zbioru jako odrostu po pierwszym zbiorze.

Kolejne zagadnienie badawcze obejmowało różne wybrane aspekty rozmnażania generatywnego turówki leśnej. Szczególnie interesujące było badanie stopnia zacienienia na rozwój generatywny roślin. Porównano rozwój roślin przy pełnym nasłonecznieniu oraz ograniczeniu przez zacienienie dostępu światła o 30% i o 50%. Stwierdzono, że zacienienie miało wpływ na produkcję świeżej masy liści oraz na zawartość kumaryny. Ponieważ badania wskazały, iż nasiona turówki leśnej mogą podlegać spoczynkowi, wykonano szereg testów nad ich żywotnością po zastosowaniu stratyfikacji i skaryfikacji oraz w wyniku traktowania azotanem potasu i gibereliną  $GA_3$ . Wszystkie zastosowane techniki poprawiały zdolność kiełkowania nasion, a najlepszy efekt uzyskiwano przez krótką skaryfikację kwasem siarkowym, na następnie pobudzanie nasion do kiełkowania przez  $KNO_3$  lub  $GA_3$ . Badania objęły także testy zdolności kiełkowania i żywotności techniką tetrazoliową w trakcie przechowywania nasion przez 30 miesięcy. Przy wilgotności nasion około 8% zdolność kiełkowania spadła w tym czasie do niskiego poziomu 4%, ale żywotność oceniana w teście tetrazoliowym uległa małej zmianie, co wynikało zapewne z procesu spoczynku.

Kolejne zagadnienie badawcze związane było z wegetatywnym rozmnażaniem roślin turówki leśnej. Celem było określenie wpływu rodzaju sadzonek wegetatywnych na rozwój roślin w dwóch latach wegetacji oraz ocena efektu ich plonowania i zawartości związków aktywnych biologicznie. Obserwowano cechy morfologiczne roślin pochodzących z kępek jedno-, dwu- lub czteropędowych. Natomiast rodzaj sadzonki nie miał wpływu na zawartość wszystkich trzech analizowanych biologicznie aktywnych związków chemicznych.

Autor pracy podjął także nowatorskie badania nad możliwością rozmnażania roślin turówki leśnej w kulturach *in vitro*. Stosując cztery rodzaje eksplantatów oraz

zróżnicowane stężenie w pożywce MS w kombinacjach dwóch regulatorów wzrostu: 2,4D i benzyloadeniny uzyskano tworzenie się tkanki kalusowej o różnym natężeniu, która wykazała zdolności do organogenezy i tworzenia struktur podobnych do zarodków. W przypadku eksplantatów z niedojrzałych kwiatostanów osiągnięto stosunkowo wysoką regenerację na poziomie 17%. Uzyskane regeneranty poddawano dalszej hodowli *in vitro* w celu uzyskania rozkrzewionych pędów z zastosowaniem dwóch regulatorów wzrostu – TDZ i IAA, które powodowały wzrost masy i liczby pędów. Doświadczenia obejmowały też ocenę adaptacji mikrosadzonek uzyskiwanych w kulturach *in vitro* na zróżnicowane warunki *ex vitro*. Ukorzenianie się tych mikrosadzonek w warunkach *ex vitro* uzyskiwano na poziomie ponad 70%, co było znaczącym osiągnięciem. Ostatnie zagadnienie badawcze w ramach pracy doktorskiej poświęcone było badaniu wpływu zacienienia i wieku roślin na ich plonowanie i jakość liści w trzyletnim cyklu doświadczeń polowych. Badania te potwierdziły, iż stopień zacienienia ma bardzo istotny wpływ na plon liści, a szczególnie na zawartość kumaryn, których produkcja była najwyższa przy zmniejszeniu dostępu światła o 50%.

Dyskusja wyników przedstawiona została na 8 stronach. W pierwszej części na 2 stronach scharakteryzowano turówkę leśną i jej występowanie oraz znaczenie farmaceutyczne. Wydaje się, iż część tę można byłoby włączyć do rozdziału: Przegląd literatury. W dalszych częściach dyskusji autor w sposób wnikliwy przedyskutował swoje wyniki w stosunku do innych autorów cytując większość niezbędnych pozycji literatury. Spis literatury cytowanej w tekście obejmuje 96 pozycji, z czego około połowa (46) jest obcojęzyczna, co należy przyjąć za wystarczające w pracach doktorskich z tego zakresu badań. Przedstawiona do recenzji praca doktorska charakteryzuje się bardzo kompleksowym i multidyscyplinarnym podejściem do zagadnienia wykorzystania populacji naturalnych turówki leśnej w celu ich polowej uprawy na skalę przemysłową dla uzyskiwania cennego surowca chemicznego – kumaryny, a także flawonoidów i kwasów polifenolowych. Autor pracy przeprowadził szerokie i wszechstronne badania stosując różne metody badawcze. Wyniki badań zostały w pełni udokumentowane w postaci aż 69 tabel, 6 wykresów i 85 fotografii.

Należy podkreślić, iż tematyka pracy została bardzo trafnie dobrana, gdyż łączy ważne zagadnienia opisu i ochrony różnorodności gatunkowej turówki leśnej z praktycznym wykorzystaniem w produkcji przemysłowej z zachowaniem zasad

zrównoważonego użytkowania. Uzyskane wyniki stanowią doskonałą podstawę do ustalenia warunków ochrony *in situ* tego gatunku na stanowiskach naturalnych, jak i *ex situ* w warunkach sztucznych uprawy polowej i banku nasion. Turówka leśna to roślina bardzo rzadka dla flory naturalnej Polski, uznana za narażoną na wymieranie w przypadku oddziaływania niekorzystnych czynników biotycznych i abiotycznych. Należy uznać, że turówka leśna, choć znana i od dawna wykorzystywana, np. w produkcji polskiego markowego alkoholu, to nie była dotychczas wystarczająco zbadana pod względem botanicznym, ekologicznym i fitochemicznym. Bardzo dużą wartość mają kompleksowe badania autora pracy nad populacjami turówki leśnej ze stanowisk naturalnych. Należy wyróżnić wyniki precyzyjnie wykonanych obserwacji fitosocjologicznych zbiorowisk roślinnych na dużej liczbie aż 12 stanowisk w Polsce i ich powiązanie ze zmiennością chemiczną roślin na nich występujących. Osiągnięciem autora pracy było także opracowanie warunków skutecznej reintrodukcji roślin turówki leśnej na zdegenerowane stanowiska w zrębach leśnych. Innym ważnym osiągnięciem autora było stwierdzenie istotnego wpływu natężenia światła na produkcję związków fenolowych w liściach, a zwłaszcza kumaryn. Wysoko należy także ocenić wyniki autora pracy w zakresie opracowania metodyki generatywnego i wegetatywnego rozmnażania roślin turówki leśnej. Wszystkie zagadnienia badawcze realizowane były w sposób wszechstronny i konsekwentny, z zastosowaniem najnowszych metod, w tym zwłaszcza wykorzystanie techniki kultur *in vitro* dla mikropropagacji. Bardzo ważnym wynikiem badań jest opracowanie warunków regeneracji tkanki kalusowej w kulturze *in vitro* pochodzącej z eksplantatów z niedojrzałych kwiatostanów turówki, a także uzyskanie dobrego efektu adaptacji mikrosadzonek z tych kultur *ex vitro* objawiające w postaci ich wysokiego stopnia ukorzenienia. Autor przy opracowywaniu warunków generatywnego rozmnażania turówki leśnej uzyskał też interesujące wyniki w zakresie przechowywania nasion i pobudzania ich do kiełkowania. Daje to podstawy do tworzenia banku nasion tej rośliny. Uzyskane wyniki mają także duże znaczenie aplikacyjne, gdyż umożliwiają wprowadzenie wysoko efektywnych metod uprawy tej rośliny i uzyskiwania korzystnego plonowania w warunkach przemysłowych. Jest to bardzo istotne, gdyż może ograniczyć nielegalne pozyskiwanie tego surowca ze stanowisk naturalnych.

Praca została napisana w sposób przejrzysty. Po przeczytaniu całej pracy należy także zaakceptować pomysł autora, aby metodyki badań nie pisać jako

odrębnej części, ale opisywać oddzielnie przy każdej części badawczej. Taki sposób redakcji pracy zapewnił lepsze zrozumienie bardzo obszernej treści wynikającej z wyjątkowo szerokiego zakresu badań. Wartość merytoryczną i praktyczną osiągniętych w pracy wyników należy ocenić bardzo wysoko. Dowodem na to są zamieszczone wnioski. Są one syntetyczne i wnikliwe. Można się jedynie zastanowić, czy niektórych z nich nie należałoby połączyć. Na uznanie zasługuje bardzo bogata dokumentacja pracy, zwłaszcza dobrej jakości fotografie stanowisk i roślin doświadczalnych.

Autor pracy nie ustrzegł się przed drobnymi błędami w tekście. Recenzent zauważył sporo błędów interpunkcyjnych. Zostały one zaznaczone w tekście. Przed oddaniem pracy do opublikowania powinny być także poprawione drobne błędy literowe, np. roślina płonna, a nie płona, czy regenerant, a nie regenerat. W wielu miejscach pracy dla określenia stanu populacji używa się słowa ilościowość, a powinno być chyba liczebność. Przeglądając spis piśmiennictwa recenzent nie odnalazł w tekście pracy dwóch pozycji: De Castro i in. 2006 oraz Singh 2009. Ale być może zostały przez recenzenta przeoczone. Zauważone błędy mają jedynie charakter redakcyjny i nie zmniejszają wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując całą pracę należy bardzo wysoko ocenić jej wartość merytoryczną, jak i praktyczną. Autor pracy w sposób wszechstronny i kompleksowy zrealizował założone cele badań, a uzyskane wyniki dają doskonałą możliwość ich praktycznego wdrożenia w produkcji surowca zielarskiego. Przedstawiona praca wskazuje, iż mgr inż. Mirosław Angielczyk jest badaczem bardzo wnikliwym, o wszechstronnej znajomości metodyki badawczej obejmującej specjalistyczny zakres florystki, ekologii roślin, fizjologii nasion, biotechnologii roślin oraz oczywiście nauk ogrodniczych i fitochemii. Z uznaniem należy przyjąć doskonałe łączenie badań o charakterze podstawowym z pracami mającymi silny aspekt praktyczny, co wynika zapewne z Jego specjalności zawodowej jako wybitnego popularyzatora uprawy roślin leczniczych i aromatycznych oraz znanego w kraju producenta produktów zielarskich.

Zdaniem recenzenta praca doktorska mgr. inż. Mirosława Angielczyka w pełni spełnia warunki stawiane pracom doktorskim przez Ustawę dotyczącą uzyskiwania stopnia naukowego doktora. Biorąc pod uwagę dużą wartość merytoryczną i praktyczną wyników przedstawionej pracy doktorskiej wnoszę o dopuszczenie mgr.



inż. Mirosława Angielczyka do dalszych etapów postępowania o uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa na Wydziale Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Warszawa, dnia 15 czerwca 2015 r.



Prof. dr hab. Jerzy Puchalski