

dr hab. inż. Bożena Pawłowska
Katedra Roślin Ozdobnych
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54
31-425 Kraków

Kraków, 18.08.2016 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kasprzyk-Pawelec
pt. Regeneracja ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby
(Malvaceae) w kulturze in vitro**

**Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. nadzw. UMCS
oraz dr Karoliny Tomiczak**

Podjęta w pracy problematyka badawcza dotyczy regeneracji ślazuwca pensylwańskiego w kulturze in vitro, poczynając od wyprowadzenia kultury, poprzez regenerację, ukorzenianie otrzymanych pędów i w końcu aklimatyzację odtworzonych roślin. W pracy wykonano też mikroskopowy monitoring procesów regeneracyjnych oraz oceniono jakość i stabilność regenerantów na poziomie cytogenetycznym i molekularnym.

Sida hermaphrodita (L.) Rusby jest byliną, o zamierających na zimę pędach, pochodzi z Ameryki Północnej, w naszych warunkach może być używana jako roślina energetyczna oraz do fitoremediacji gleby, a jak wskazują ostatnie doniesienia jej potencjał jest znacznie większy, chociaż wciąż nie jest zbadany. Tradycyjny, generatywny sposób rozmnażania ślazuwca nastręcza trudności, które są najczęściej związane ze słabym kiełkowaniem nasion i w konsekwencji małą wydajnością tej metody mnożenia. W literaturze brak jest praktycznie informacji o regeneracji ślazuwca, w tym zatem kontekście podjęte badania wydają się jak najbardziej celowe. Ponadto przeprowadzenie wnikliwych analiz morfometrycznych, mikroskopowych, cytogenetycznych i molekularnych, uważam za uzasadnione, wartościowe dla nauki i cenne dla rolniczej praktyki.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Kasprzyk-Pawelec liczy 170 stron maszynopisu i zawiera zróżnicowany i bardzo bogaty materiał ilustracyjny oraz bibliografię, na którą składa się 257 pozycji i 5 powołań na źródła internetowe. Zebrana literatura to niedawno publikowane prace, wydane po 2000 roku, stanowią one 86% cytowanych publikacji. Spośród wszystkich pozycji literatury 61 publikowanych jest po polsku, pozostałe (ponad 3/4 wszystkich) w języku angielskim. Prace są cytowane w tekście, z wyjątkiem dwóch pozycji, których nie udało mi się odnaleźć (Henry i in. 1994 oraz Jasnowska i in. 2008). Na dokumentację pracy składa się: 27 tabel, 11 rycin oraz 29 barwnych tablic, które są zestawami złożonymi z kilku obrazów: najczęściej zdjęć omawianych obiektów, ale także

fotografii spod skaningowego mikroskopu elektronowego, ujęć przekrojów anatomicznych z mikroskopu świetlnego, histogramów pokazujących badania cytometryczne oraz zdjęć rozdziałów elektroforetycznych otrzymanych podczas analiz molekularnych. Wszystkie tabele, ryciny i barwne tablice są czytelne, a dokumentacja fotograficzna jest bardzo dobrej jakości, została przygotowana starannie. Na końcu rozprawy zamieszczono spis rycin oraz tabel, a także alfabetyczny wykaz wszystkich odczynników, które wykorzystano do przeprowadzania analiz, przy każdym odczynniku zamieszczono informacje o jego pochodzeniu, podano też numer katalogowy. Do pracy załączone jest streszczenie w języku angielskim. Rozprawa ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i składa się z ośmiu rozdziałów, z których cztery: Wstęp, Materiał i metody, Wyniki oraz Dyskusja są podzielone na dodatkowe podrozdziały. Praca ma przejrzysty i przemyślany układ. Jest pisana w konsekwentnie utrzymywanym porządku logicznym, dzięki czemu stanowi spójną całość. Czytelny i uporządkowany spis treści umożliwia łatwe poruszanie się w tekście, a zamieszczony na początku rozprawy wykaz skrótów ułatwia czytanie pracy.

Ocena merytoryczna

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie warunków regeneracji ślazuwca pensylwańskiego z wykorzystaniem techniki *in vitro*, a także ocena stabilności genetycznej otrzymanych regenerantów. W pierwszym etapie badań nasiona ślazuwca wprowadzono do kultury *in vitro* i uzyskano siewki, z których pobierane były eksplantaty do testowania wpływu regulatorów wzrostu na organogenezę. Wykonano szczegółowe obserwacje procesu regeneracji prowadząc szereg pracochłonnych analiz i pomiarów biometrycznych. Przeprowadzono monitoring regeneracji na poziomie mikroskopowym oraz oceniono jakość regenerantów przy użyciu metod cytometrycznych i molekularnych. Wreszcie uzyskane pędy ślazuwca ukorzeniono i z sukcesem poddano aklimatyzacji. Postawiony w pracy cel został zrealizowany.

Przegląd literatury zawarty w pierwszym rozdziale pracy (**WSTĘP**), na 25 stronach, Doktorantka podzieliła na cztery podrozdziały. Na początku przypomina podstawy kultury *in vitro*, omawia składniki pożywki i roślinne regulatory wzrostu, a także rozmnażanie *in vitro* na drodze organogenezy pośredniej. Dalej Autorka pochyła się nad występującą w kulturze *in vitro* zmiennością somaklonalną, aby kolejno przejść do syntetycznej charakterystyki badań mikroskopowych, cytogenetycznych i molekularnych prowadzonych w roślinnych kulturach *in vitro*. Ostatni podrozdział przeglądu literatury poświęcono roślinom energetycznym, szczegółowej charakterystyce ślazuwca pensylwańskiego i osiągnięciom w zakresie mikrorozmnażania tej grupy roślin. Uporządkowane tabelaryczne zestawienie dotychczasowych dokonań w regeneracji *in vitro* roślin energetycznych pokazuje, że używa się do inicjacji kultur także eksplantatów zawierających tkankę merystematyczną, a rozmnażanie prowadzone jest drogą pobudzania do rozwoju pąków bocznych. W tym kontekście widoczny staje się brak (w pierwszym podrozdziale) syntetycznego spojrzenia na metody mnożenia roślin w kulturze *in vitro* (pobudzanie do rozwoju pąków bocznych, wzbudzanie pąków przybyszowych i somatyczna embriogeneza - dwie ostatnie mogą mieć charakter pośredni lub bezpośredni), zwłaszcza, że i w dyskusji

poruszane są zagadnienia związane z somatyczną embriogenezą, a najlepsze wyniki w regeneracji pędów uzyskano, gdy eksplantatami wyjściowymi były jednowęzłowe fragmenty pędu zawierające tkankę merystematyczną. Poza tym uzupełnieniem, w mojej ocenie, przedstawiony przegląd literatury jest wystarczającym kompendium wiedzy potrzebnej do podjęcia eksperymentów nad regeneracją ślazuwca pensylwańskiego z wykorzystaniem techniki *in vitro*, a zakres tematyczny przeglądu literatury jest związany z podjętymi badaniami i nakreśla obecny stan wiedzy.

Inne zauważone przez mnie nieliczne uchybienia: na str. 9 powinno być Pattar i Jayaraj, a nie Pattar i in., na str. 12 - brakuje i in., str. 14 niepotrzebne są skróty imion autorów przy cytowaniu, str. 17 Holl zamiast Hall, str. 18 - czas kwitnienia lepiej zastąpić określeniem termin kwitnienia, str. 26 - przy podawaniu współczynnika namnażania w dolnej granicy brakło gatunku - u *Hibiscus rosa-sinensis*, str. 27 w tabeli trzeba ujednolicić jednostki PGR, najlepiej przeliczyć wszystko na mg L^{-1} , a et al zamienić na i in., str. 30 - brak autora zdjęć. Na str. 13 pojawia się zdanie cytowane za Mineo 1990 "w wyniku regeneracji wszystkie komórki potomne zawierają materiał genetyczny identyczny jak roślina macierzysta", które nie jest zgodne z zamieszczanymi potem informacjami, choćby na stronie 17. Dziś wiemy, że techniki *in vitro* mogą być źródłem zmienności, dlatego otrzymany materiał roślinny poddaje się wszechstronnym analizom, które określają jego zgodność z materiałem donorowym (wyjściowym), co zresztą zostało w niniejszej pracy zrealizowane.

W osobnym rozdziale sprecyzowano i przedstawiono **CEL PRACY** oraz szczegółowe zadania badawcze.

W rozdziale **MATERIAŁY I METODY** opisany został materiał roślinny wykorzystany w badaniach oraz wszystkie metody badawcze. Zamieszczono tu wiele tabel i rycinę, które ułatwiają zrozumienie użytych metod.

Oprócz obserwacji biometrycznych regenerujących eksplantatów sześciokrotnie pobierano fragmenty materiału roślinnego do badań cytologicznych. Przygotowano polimerowe preparaty do obserwacji w mikroskopie świetlnym, a także przeprowadzono procedurę pozwalającą na wykonanie obserwacji tkanek w mikroskopie elektronowym skaningowym. Dalej szczegółowo opisane są procedury określenia wielkości genomu i ploidalności regenerantów ślazuwca, a także przeprowadzone analizy molekularne (ISSR oraz AFLP) dla 48 wybranych regenerantów i 11 roślin kontrolnych.

Zamieszczone są w tym rozdziale informacje o wielkości badanej próby i liczbie powtórzeń, a zaprezentowane metody badawcze są odpowiednie dla zrealizowania postawionego celu.

Stwierdziłam drobne niedociągnięcia, które trzeba uściślić. Warto uzupełnić informacje o stanie fizjologicznym nasion przeznaczonych do siewu, a w rozdziale dotyczącym inicjacji kultur, szczegóły skaryfikacji w gorącej wodzie, a także wyjaśnić na czym polegała skaryfikacja mechaniczna oraz wspomnieć jakie obserwacje zostały przeprowadzone. Proponuję zmienić nieco rycinę 9, przedstawić na niej siewki w różnym wieku (7, 10, 14 i 21-dniowe i zaznaczyć przy każdej fragmenty pobierane do doświadczenia), w moim odczuciu stanie się wtedy bardziej czytelna. Podczas przygotowywania pracy do publikacji niezbędne będzie uzupełnienie warunków zewnętrznych kultur *in vitro* o wartość

wilgotności względnej w pokoju wzrostowym, zwanym czasem w starszej literaturze pokojem hodowlanym. I tutaj mam pytanie do Doktorantki: Czy nie uważa Pani, że hodowle in vitro (tak nazywane w Pani pracy) poprawniej byłoby nazwać kulturami in vitro (in vitro culture), chciałabym poznać Pani zdanie na ten temat.

Zauważyłam też pewne nieścisłości przy opisie warunków aklimatyzacji, sterylna gleba to nie jest dobre sformułowanie, chodzi z pewnością o podłoże ogrodnicze, ale trzeba uściślić jakie, uzupełnienia wymagają też warunki zewnętrzne w czasie aklimatyzacji: warunki świetlne, temperatura, czy stosowano zabezpieczenie przed rozwojem chorób grzybowych?

Rozdział **WYNIKI** jest utrzymany w tym samym porządku tematycznym jaki zastosowano w Materiałach i metodach. Został on przedstawiony na 60 stronach, przy czym 29 z nich zajęły tablice barwne, (119 fotografii) które są bardzo dobrą dokumentacją otrzymanych wyników. Oprócz tego rozdział ten zawiera 14 tabel i 2 ryciny. W pierwszej części ogólnie omówiono sposób otrzymania siewek do założenia właściwego doświadczenia, gdzie mechaniczna skaryfikacja nasion oraz 50% roztwór handlowego preparatu Domestos stosowany do dezynfekcji powierzchniowej przez 30 minut skutkowały najlepszą wydajnością kiełkowania. Po siedmiu dniach od założenia kultury uzyskano w tej metodzie 108 siewek, które posłużyły do dalszych badań. Rezultaty tego wstępnego doświadczenia pokazano w tabeli 13, której tytuł wymaga nieznacznego uzupełnienia, tabela pokazuje bowiem nie tylko skuteczność dezynfekcji, ale także % skielkowanych nasion. Pomimo, że jest to doświadczenie wstępne, warto uzupełnić analizy statystyczne dla tej części badań, pozwoli to na bardziej precyzyjne wnioskowanie. Dalej Autorka przedstawia w tabelach i na fotografiach oraz opisuje wpływ 32 zastosowanych pożywek na organogenezę (tj. formowanie kalusa, pędów i korzeni), dla każdego testowanego eksplantatu oddzielnie: 0,5 cm całych hypokotyli, 0,5 cm fragmentów 1 cm hypokotyli, 0,5 cm fragmentów 2 cm hypokotyli, 1 cm całych młodych liścieni, 1 cm fragmentów 2 cm liścieni, 0,5 cm fragmentów ogonków liściowych, 1 cm fragmentów liści, 0,5 cm jednowęzłowych fragmentów pędu. W tabelach podano procent eksplantatów formujących kalus, a jego jakość oraz ilość opisano na podstawie dokumentacji fotograficznej. W tabelach znalazły się też: % eksplantatów na których formowały się pędy i liczba pędów na 1 eksplantat, oraz % eksplantatów formujący korzenie i liczba korzeni na 1 eksplantat. Na tym etapie można było spróbować odróżnić pędy przybyszowe od pędów bocznych. Bowiem kiedy eksplantat zawiera tkankę merystematyczną, jak to miało miejsce w przypadku jednowęzłowych fragmentów pędów obserwowano prawdopodobnie rozwój pędów bocznych, podczas gdy dla pozostałych eksplantatów różnicowały się wyłącznie pędy przybyszowe bezpośrednio na eksplantacie, albo pośrednio przez fazę kalusa. W tej części pracy przedstawione są wyniki bardzo żmudnych i pracochłonnych obserwacji, których wyniki poddano analizom statystycznym. Zachęcałabym Autorkę (zwłaszcza przy przygotowywaniu publikacji) o bardziej syntetyczne zestawienie otrzymanych wyników oraz (na ile to możliwe) statystyczne ujęcie wpływu rodzaju eksplantatu na regenerację. Idealne byłoby wskazanie najlepszego rodzaju eksplantatu i pożywki. Proszę też o wytłumaczenie dlaczego, zdaniem Autorki, w wielu przypadkach regeneracja na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu statystycznie nie różni się od regeneracji na pożywkach zawierających PGR i prawie

zawsze zachodzi na pożywcę MS0.

Dokumentacja opisanej regeneracji wykonana z użyciem mikroskopii świetlnej jak i skaningowej została przedstawiona w kolejnym rozdziale wyników. Rzetelnie wykonane preparaty, dobre zdjęcia i precyzyjny opis to mocna strona pracy. Zdjęcia spod mikroskopu skaningowego pokazują formowanie pąków przybyszowych (zawiązków pędu) w tkance kalusowej, ale także bezpośrednio na eksplantatach. Szkoda, że nie udało się wychwycić przekroju anatomicznego takiego pąka, mielibyśmy wówczas pewność, że to organogeneza, a nie somatyczna embriogeneza. I tu mam kolejne pytanie do Doktorantki, jak można odróżnić pąki przybyszowe od zarodków somatycznych?

W dalszej części pracy Doktorantka wykazała się znajomością analiz cytometrycznych i interpretacji otrzymanych wyników. W niniejszej pracy po raz pierwszy na świecie określono zawartość DNA w jądrach komórek liści *Sida hermaphrodita* i oszacowano wielkość genomu dla tego gatunku. Zbadano również ploidalność 62 regenerantów, wykazując w dwóch przypadkach niższą niż u roślin kontrolnych zawartość DNA oraz w dwóch przypadkach występowanie miksploidów.

Kolejny podrozdział dotyczy analiz z wykorzystaniem markerów molekularnych, które są precyzyjną metodą oceny zróżnicowania genetycznego i wychwycenia zmienności somaklonalnej u roślin pochodzących z kultury in vitro. Przeprowadzono je z zastosowaniem 17 starterów ISSR i 6 par selektywnych starterów AFLP. Na 4 tablicach pokazano przykładowe rozdziały elektroforetyczne na żelach agarozowych i poliakrylamidowych. Łącznie uzyskano 97 prążków polimorficznych, w tym 7 unikatowych, więcej przy użyciu markerów ISSR (ok. 33%), w porównaniu do markerów AFLP (ok. 19%). W większości przypadków nie odnotowano znaczącego zróżnicowania genetycznego pomiędzy osobnikami kontrolnymi i regenerantami otrzymanymi in vitro (maksymalnie 9,8% w jednym przypadku dla ISSR, i 7,4% w jednym przypadku dla AFLP). Bardzo pozytywnie oceniam zastosowany do analiz molekularnych układ. Ze względu na pochodzenie eksplantatów (z nasion) zastosowano do analiz zawsze zestaw par: roślina donorowa-potomek, który pozwolił uniknąć błędów w interpretacji wyników. Chciałabym również podkreślić korzystnie dobrany zestaw markerów molekularnych (ISSR i AFLP), co potwierdza duża liczba produktów uzyskanych w pracy, a zwłaszcza stosunkowo wysoki udział prążków polimorficznych.

W ostatniej części prezentowane są wyniki nad ukorzeniem pędów i ich aklimatyzacją. W obecności zastosowanej w pożywcę auksyny NAA otrzymano słabsze wyniki w ukorzenianiu pędów, w porównaniu do pożywki, która nie zawierała regulatorów wzrostu. Istotność tych różnic warto byłoby potwierdzić analizą statystyczną. Proszę także o wyjaśnienie, czy były prowadzone obserwacje morfologii regenerantów po aklimatyzacji? zdanie "...nie obserwowano wyraźnych zmian fenotypowych regenerantów".... sugeruje, że takie obserwacje prowadzono.

Na koniec chciałabym zasugerować zaprojektowanie w przyszłych badaniach doświadczeń nad opracowaniem pożywki do namnażania pędów. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki pozwoliły na ustabilizowanie kultur in vitro i otrzymanie pędów, które z powodzeniem można byłoby namnażać, jak sędzę, z dużą wydajnością. Etap ukorzeniania i aklimatyzacji jest już opracowany, zatem cały cykl rozmnażania klonalnego byłby zamknięty,

a procedura mikrorozmnażania gotową receptą na namnażanie *Sida hermaphrodita* gatunku techniką in vitro.

DYSKUSJA napisana jest ładnym, opisowym językiem, z odpowiednią narracją, jest obszerna i dobrze, że została podzielona na rozdziały, bo dzięki temu pozwala czytelnikowi na łatwiejszą ocenę przedstawionych problemów. Dotyka podejmowanych wątków badawczych, konfrontuje je z literaturą, i jest poprowadzona swobodnie, co świadczy o szerokim spojrzeniu Doktorantki na omawiane problemy. Znalazłam w tej części kilka drobnych niedoskonałości, np. jest oczywistym, że kluczowy wpływ na procesy wzrostu i rozwoju w kulturze in vitro ma stosunek auksyn i cytokinin, a publikacja Ikeuch i in. 2013 roku, tylko to potwierdza. Przejęzyczeniem jest też sformułowanie, że TDZ charakteryzuje działanie podobne do auksyn, co prawdopodobnie miało oznaczać w szerszym ujęciu - że działa jak regulator wzrostu. Proponuję nie nazywać ukorzenionych pędów roślinkami lecz roślinami. W podrozdziale dotyczącym aklimatyzacji informacje na temat wyników badań Kadecek i in. 2001 są bardzo ogólne i nie wnoszą do dyskusji ciekawych treści, powinny być uściślone.

Na koniec rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła 9 **WNIOSKÓW**. Osiem z nich dotyczy regeneracji, jeden jakości uzyskanych roślin. W pierwszym wniosku brakuje w ostatniej linijce sformułowania: i pozwala na kiełkowanie w warunkach in vitro. Ósmy wniosek odnosi się do fenotypu roślin, a wyników takich obserwacji nie przedstawiono.

P o d s u m o w u j ą c chciałabym podkreślić, że przeprowadzone badania poruszają aktualne i dotychczas niezbadane problemy, wymagały opanowania licznych technik badawczych, obejmują doświadczenia in vitro oraz różnorodne analizy laboratoryjne, wyniki są właściwie udokumentowane, zostały dobrze przeanalizowane i prawidłowo przedstawione.

Wniosek końcowy

Przedstawione w pracy wyniki badań oraz dokumentacja naukowa są wartościowe. Metody, które poznała i którymi posłużyła się mgr inż. Anna Kasprzyk-Pawelec są właściwe do zrealizowania postawionego celu. Szczególnie analizy cytometryczne, molekularne i mikroskopowe, stanowią dobry warsztat i mogą być pomocne w rozwijaniu dalszych badań eksperymentalnych. Ponadto Doktorantka wykazała się zadowalającym poziomem wiedzy teoretycznej, na której oparła swoje eksperymenty.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymagane kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Anna Kasprzyk-Pawelec do publicznej obrony.

