

Prof. dr hab. Danuta Kozak
Katedra Roślin Ozdobnych
i Architektury Krajobrazu
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Kasprzyk-Pawelec

**pt.: "Regeneracja ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* L. Rusby
(Malvaceae) w kulturze *in vitro*"**

wykonanej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin Wydziału Biologii i Biotechnologii
UMCS, pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. nadzw. UMCS
oraz dr Karoliny Tomiczak

Temat i cel pracy

Ślazuwec pensylwański (*Sida hermaphrodita* (L.) Rusby), nazywany malwą pensylwańską lub sidą jest byliną o dużym znaczeniu gospodarczym. Osiąga wysokość od 1-3 m i z tego względu może służyć do nasadzeń w pasach przydrożnych, w celu izolowania terenów mieszkalnych, pól uprawnych czy ogrodów od szkodliwego wpływu pojazdów mechanicznych. Duże zdolności adaptacyjne do różnych warunków klimatyczno-glebowych, wskazują na potencjalne możliwości uprawy ślazuwca na terenach zdegradowanych, wysypiskach komunalnych, generalnie na gruntach wyłączonych z rolniczego użytkowania. Stosunkowo długi okres kwitnienia, od lipca aż do przymrozków, sprawia, że roślina ta dostarcza pokarmu dla pszczół. Inną, bardzo ważną zaletą tej rośliny jest możliwość wykorzystania jej biomasy do celów energetycznych, jako odtwarzalnego źródła energii. Obserwuje się ogromny wzrost zainteresowania uprawą ślazuwca pensylwańskiego, jednak duży problem w założeniu plantacji stanowi jakość materiału siewnego, związana z niską siłą kiełkowania nasion oraz ograniczona możliwość rozmnażania wegetatywnego poprzez sadzonki korzeniowe i fragmenty pędów nadziemnych. Opracowanie wydajnej metody rozmnażania w kulturze *in vitro* umożliwiłoby szybką produkcję materiału nasadzeniowego i wzrost powierzchni uprawy tej rośliny.

Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitne zadanie opracowania warunków regeneracji ślazuwca pensylwańskiego w kulturze *in vitro*. Zakres badań, mgr Anna Kasprzyk-Pawelec potraktowała szeroko, wykazując dużą dojrzałość w zakresie posługiwania się nowoczesnym narzędziem biotechnologii, jakim są bez wątpienia kultury *in vitro*.

Szczegółowe uwagi dotyczące pracy

Przedstawiona do recenzji praca licząca 170 stron oprócz tekstu zawiera bogaty materiał dokumentalny w postaci 27 tabel, 11 rycin i 119 fotografii, wykaz skrótów, spis odczynników, spis rycin i tabel oraz streszczenie w języku angielskim. Praca została podzielona na 8 rozdziałów: I. Wstęp, II. Cel pracy, III. Materiał i Metody, IV. Wyniki, V. Dyskusja, VI. Wnioski, VII. Summary, VIII. Literatura.

Tytuł rozprawy odpowiada treści pracy.

We „Wstępie” obejmującym 25 stron Pani mgr dokonała interesującego wprowadzenia do realizowanego tematu, wykorzystując dostępną, trafnie dobraną literaturę. W kolejnych podrozdziałach zaprezentowano: roślinne kultury *in vitro*, regenerację roślin *in vitro*, badania mikroskopowe, cytogenetyczne i molekularne w kulturach *in vitro* oraz rośliny energetyczne i ich zastosowanie. Starannie i jasno opracowany „Wstęp” wskazuje na bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa naukowego z zakresu prowadzonych badań. Autorka przytacza 257 pozycji literatury, w tym 76 % stanowi literatura anglojęzyczna. Nie jestem jednak zwolenniczką cytowania w pracach naukowych pozycji internetowych - w dodatku bez tytułów, nazwisk autorów i daty ich dostępności. Za jakiś czas, być może te strony już nie będą istnieć, zatem do nich nie dotrzemy.

W rozdziale „Cel pracy” Autorka jasno precyzuje kierunek badań i poprzez cele szczegółowe uściśla cel i zakres eksperymentów.

W rozdziale „Materiał i metody”, liczącym 18 stron Autorka przedstawiła materiał doświadczalny, wykaz substancji chemicznych i pożywek stosowanych w doświadczeniach i w sposób jasny i zrozumiały opisała kolejne etapy pracy i prowadzone doświadczenia. Zakradły się jednak pewne nieścisłości, np. w pkt. 3.2 podano, że „Doświadczenia przeprowadzono na pożywkach zawierających makro i mikroelementy oraz składniki organiczne pożywki Murashige i Skooga (1962)”. Nie była to jednak pożywka oryginalna, lecz zmodyfikowana. Oryginalna pożywka zawiera np.: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8 mg + Na_2EDTA $2\text{H}_2\text{O}$ - 37,2 mg. W pracy zastosowano FeNaEDTA w ilości 36,7 mgL^{-1} . Brak informacji, jaki rodzaj agaru zastosowano. W pkt. 3.3. niewłaściwe jest użycie słowa sterylizacja odnośnie wyjaławiania materiału badawczego. Nie jest ona równoznaczna z odkażaniem czy dezynfekcją, gdyż w wyniku sterylizacji ulegają zniszczeniu drobnoustroje i ich przetrwalniki (sterylizacja narzędzi, pożywki w autoklawie), natomiast dezynfekcja (odkażanie) jest to proces w wyniku, którego są zniszczone tylko formy wegetatywne drobnoustrojów. Wskazane byłoby podanie składu środka odkażającego – Domestosu. Jaką pojemność miały

słoiki w których umieszczano nasiona? Brak informacji o liczbie nasion w słoiku i przy każdej metodzie odkażania. Dopiero w 'Wynikach', na str. 53, w tab. 13 podano tą liczbę - 200. Po jakim czasie oceniano czystość kultur, skoro już po 7 dniach hodowli pobierano eksplantaty z siewek? Nie podano natężenia światła w pokoju wzrostowym. W pkt. 3.8. nie podano, ile pędów ukorzeniano na poszczególnych pożywkach (wartości te zawarte są dopiero w pkt. 4.6., w tab. 27, na str. 108), jaki skład miało podłoże (sterylna gleba) do którego wysadzano rośliny. Podano „% ukorzenionych roślin”, powinno być % ukorzenionych pędów. Zamiast „ukorzenione rośliny”, powinno być ukorzenione pędy.

Metody przyjęte do oceny stabilności genetycznej i różnicowania zostały dobrane prawidłowo, chociaż niepotrzebnie wykonano zarówno ISSR jak i AFLP, można było wykonać jedną metodę. Zabrakło natomiast podania liczebności chromosomów, które standardowo sprawdza się w tego typu badaniach, a które w 100% zapewniają o stabilności genetycznej.

„Wyniki” doświadczeń zawarte w 14 tabelach i szczegółowo opisane na 16 stronach oraz zilustrowane na wspinających 119 fotografiach są bardzo interesujące. Ogółem Autorka sprawdziła efektywność odkażania 6 metod, wykorzystując 200 nasion w każdej metodzie, czyli na 1200 nasionach. Ponadto oceniała wpływ 32 pożywek, różniących się zawartością regulatorów wzrostu, dla 8 rodzajów eksplantatów wykorzystując po 36 eksplantatów dla każdego rodzaju (12 w 1 powtórzeniu), co daje łącznie 9216 eksplantatów pobranych do kultur *in vitro*. W trakcie prowadzenia kultur materiał roślinny poddano obserwacjom mikroskopowym. Do badań cytologicznych pobierano i utrwalono kontrolne fragmenty materiału roślinnego (0 tyg. oraz po upływie 1, 7, 14, 21 i 28 dni kultury. Dokonano ponadto oceny jakości i stabilności uzyskanych w kulturze roślin na poziomie cytogenetycznym i molekularnym. Oceniając pracę chciałabym zwrócić uwagę na jej niebywałą pracowitość.

W nagłówkach większości tabel należało podać po jakim czasie oceniano wskaźnik zakażeń, indukcję tkanki kalusowej, regenerację pędów i korzeni z poszczególnych eksplantatów. Oczywiście większość informacji możemy znaleźć w rozdziale „Materiał i metody”, ale powinno to być podane również w nagłówku tabeli.

Na str. 53 czytamy, że „Stwierdzono, że mechaniczna skaryfikacja nasion połączona z ich sterylizacją za pomocą 50% roztworu Domestosu pozwala uzyskać najwyższy % skielkowanych nasion...”, gdy tymczasem brak obliczeń statystycznych dla wskaźnika zakażeń (Tab. 13).

Proponuję unikać zbyt dużych skrótów myślowych np. organogeneza pędowa otrzymana na pożywkach (str. 60), proces regeneracji pędów zaindukowano na podłożach (str. 63), tkankę kalusową uzyskano na podłożach (str. 73).

Opis wyników zawartych w tab. 14, na str. 57 nie jest precyzyjny. Pominęto kilka wariantów pożywek, na których 100% eksplantatów z 0,5 cm hypokotyli wytwarzało tkankę kalusową niewykazującą zdolności do regeneracji pędów (np. 1KIN/CW), jak również proces ryzogenezy był obserwowany na eksplantatach prowadzonych na pożywkach: 1BAP, 3BAP- na świetle oraz 1KIN/1NAA- w ciemności, natomiast brak ryzogenezy -0,5KIN.

Na str. 60 przy opisie wyników zawartych w tab. 15 podano, że „na podłożachKIN/BAP oraz ŻEA/IAA i KIN/NAA, 100% eksplantatów reagowało tylko wytwarzaniem tkanki kalusowej”. Również inne warianty pożywek miały podobny wpływ np. 1,5KIN, 1KIN/1NAA, 3BAP. Brak dokładności przy opisie procesu ryzogenezy. Autorka podaje: „Proces ryzogenezy obserwowano, gdy podłoże hodowlane uzupełniono dodatkiem cytokinin KIN lub BAP indywidualnie, bądź w kombinacjach z auksynami NAA i IAA”. Tymczasem w obecności BAP brak ryzogenezy w warunkach fotoperiodu 16/8 a w ciemności ryzogeneza ma miejsce w przypadku eksplantatów inkubowanych na pożywkach z dodatkiem 1 lub 3 BAP.

Na str. 70 przy opisie wyników zawartych w tab. 18 podano: „Tkankę kalusową uzyskanoaż po 100 % indukcję na pożywkach uzupełnionych KIN i BAP samodzielnie” . W tabeli znajdujemy - 75,00 i 77,78% tkanki kalusowej dla 0,5 i 1 KIN.

Str. 80, tab. 21, brak precyzji przy opisie wyników. W opisie czytamy:” Największą indukcję tkanki kalusowej, a zarazem największe zdolności odróżnicowania, obserwowano na podłożach z dodatkiem BAP samodzielnie lub w kombinacji z IAA”. W warunkach 7 dniowej inkubacji w ciemności fragmentów liści w obecności 3BAP – brak regeneracji kalusa, a w obecności 1 lub 2BAP regeneracja jest na poziomie 96,67% -100%, lecz brak eksplantatów reagujących ryzogenezą.

Str. 98: Eksperymentalnie ustalono temperaturę annealingu dla poszczególnych starterów, a wartości przedstawiono w tabeli 24. Analiza ta została wykonana w celu prowadzenia analiz molekularnych z wykorzystaniem opisanych starterów, nie jest natomiast celem prowadzonej pracy. Wyniki te, lub tylko informację o przeprowadzeniu tego typu badań, należało umieścić w rozdziale ‘Materiał i metody’. Temperatury annealingu dla

poszczególnych starterów mogą być różne dla różnych laboratoriów, zależą od warunków pracy i odczynników stosowanych do prowadzenia analiz molekularnych.

Str. 98, ostatni akapit: "Łącznie uzyskano 97 prążków polimorficznych, w tym 7 unikatowych (czyli prążków obserwowanych wyłącznie u pojedynczego osobnika) oraz 295 prążków monomorficznych". Powinna być podana informacja, że wartości te uzyskano przy obu metodach, ISSR i AFLP. Czytelnik musi się tego domyslić, na podstawie następnego zdania.

Tablice XXII - XXV: wskazane byłoby zaznaczenie innym kolorem prążków unikatowych.

Str. 104 i Ryc. 11: Przy opisie wykresów PCoA powinna być podana informacja, jaki poziom zróżnicowania wyjaśniają 1-sza i 2-ga współrzędna.

Ryc. 10: Szkoda, że nie zaznaczono skupień na dendrogramach, co znacznie ułatwiłoby ich odczyt.

Str. 104: Zastosowanie oznaczeń literowych poszczególnych typów regenerantów (B, D2, B4, FH) zamiast ich opisu, ułatwiłoby ich analizę, szczególnie rozróżnienie między osobnikami kontrolnymi i różnymi typami regenerantów.

Na szczególną uwagę zasługuje „Dyskusja”, obejmująca 18 stron, która znakomicie potwierdza dobrą znajomość wiedzy teoretycznej, wchodzącej w zakres badań Pani mgr oraz dojrzałe jej konfrontowanie z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych.

Wnioski sprecyzowane są jasno i w pełni odzwierciedlają przedstawiony materiał badawczy oraz przeprowadzone analizy. Część wniosków ma charakter aplikacyjny i może być z powodzeniem przekazana do zastosowania przez laboratoria kultur *in vitro*. Wniosek 9. „Pożywka MS bez dodatku roślinnych regulatorów wzrostu pozwala na ukorzenie wyższego odsetka regenerantów ślazuwca” jest sformułowany nieprawidłowo, gdyż nie może być ukorzeniany odsetek regenerantów.

Rozdział „Literatura” zawiera 257 pozycji. Autorka trafnie dobrała literaturę z bardzo licznych pozycji naukowych wybierając te najważniejsze, które umożliwiły przedstawienie problematyki dotyczącej przedmiotu Jej badań.

Wszystkie wymienione uwagi nie podważają faktycznej wartości naukowej rozprawy doktorskiej, ale proponuję wziąć je pod uwagę przy przygotowywaniu publikacji.

Podsumowanie

Pani mgr Anna Kasprzyk-Pawelec wykonała drobiazgowo, pracochłonne badania, na wysokim poziomie naukowym, których efektem było opracowanie skutecznej procedury odkażania nasion ślazuwca pensylwańskiego i stwierdzenie, że wszystkie testowane rodzaje eksplantatów są zdolne do wytwarzania tkanki kalusowej w warunkach kultury *in vitro*. Wykazano, że 1 – węzłowe fragmenty pędów pozwalają na uzyskanie najwyższej wydajności procesu organogenezy pędowej. Na pożywce z dodatkiem $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ kinetyny uzyskano najwięcej (3,81 szt.) pędów z 1 eksplantatu. Na ukorzenianie zaś mikrosadzonek ślazuwca pensylwańskiego korzystnie wpływa, zdaniem Autorki, pożywka MS bez dodatku regulatorów wzrostu. Na uznanie zasługuje przeprowadzenie szczegółowych obserwacji procesu regeneracji na poziomie mikroskopowym oraz ocena jakości i stabilności uzyskanych *in vitro* roślin na poziomie cytogenetycznym i molekularnym. Badania te znacznie wzbogacają pracę. Wykazano, że kultury *in vitro* mogą indukować u regeneratów ślazuwca nieznaczną zmienność na poziomie sekwencji DNA, ale nie znajduje ona odbicia w fenotypie zregenerowanych roślin.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że **rozprawa doktorska Pani mgr Anny Kasprzyk-Pawelec pt.: "Regeneracja ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* L. Rusby (Malvaceae) w kulturze *in vitro*"** jest wartościowa pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Praca zawiera prawidłowo udokumentowane wyniki i świadczy o tym, że Doktorantka bardzo dobrze zna techniki kultur *in vitro*, oraz najnowsze techniki biologii molekularnej i potrafi prawidłowo je wykorzystać w badaniach naukowych.

Reasumując, stwierdzam, że oceniana praca **spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim** przez Ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w art. 13 Ustawy (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Anny Kasprzyk-Pawelec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Lublin, dn. 22.08.2016r.

Prof. dr hab. Danuta Kozak