

Warszawa, 12 sierpnia 2022 r.

Dr hab. inż. Dariusz Ryszard Sochacki
Samodzielny Zakład Roślin Ozdobnych
Instytut Nauk Ogrodniczych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

**osiągnięcia naukowego, aktywności naukowej oraz dorobku dydaktycznego,
organizacyjnego i popularyzatorskiego dr inż. Dariusza Kulusa w związku
z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk
rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo**

wykonana na podstawie pisma z dnia 8 czerwca 2022 r. (WRiB.531.6.2022.105.2022) Rady Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. J.J. Śniadeckich, w związku z uchwałą nr 27/2021/2022 o powołaniu mnie na recenzenta w Komisji habilitacyjnej w postępowaniu habilitacyjnym dr. inż. Dariusza Kulusa.

1. Informacja o karierze zawodowej i naukowej dr. inż. Dariusza Kulusa

Dr inż. Dariusz Kulus jest absolwentem Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy (UTP) (obecnie Politechnika Bydgoska, PB), gdzie w 2011 r. ukończył jednolite studia magisterskie na kierunku biotechnologia. Studia doktoranckie ukończył na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii UTP w Bydgoszczy w dyscyplinie agronomii. Stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie biotechnologia uzyskał na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w 2016 roku. Rozprawę doktorską pt. „Wpływ krioprezerwacji metodą kapsułkowania-dehydratacji na stabilność genetyczną chryzantemy wielkokwiatowej (*Chrysanthemum* × *grandiflorum* /Ramat./Kitam.)” przygotował pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Mikuły, prof. PAN, a recenzentami pracy byli Prof. dr hab. Andrzej Wojciechowski (UP w Poznaniu), dr hab. inż. Bożena Pawłowska (UR w Krakowie). W latach 2014-2017 Habilitant był asystentem w Katedrze Roślin Ozdobnych i Warzywnych UTP w Bydgoszczy, następnie adiunktem w Katedrze Roślin Ozdobnych i Warzywnych UTP w Bydgoszczy (obecnie Pracownia Roślin Ozdobnych i Warzywnych), a od 1 stycznia 2021 r. do dzisiaj pełni funkcję jej kierownika.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 10 powiązanych tematycznie recenzowanych publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „Morfogeneza *in vitro*, krioprezerwacja i indukcja zmienności u serduszki okazałej (*Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara): aspekty fizjologiczne, biochemiczne, (cyto)genetyczne i fenotypowe”. Wszystkie prace, składające się na osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy

Journal Citation Reports (JCR). Łączna wartość prac dokumentujących osiągnięcie naukowe zgodnie z rokiem publikacji wynosi 870 punktów MEiN. Sumaryczny Impact Factor (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 32,911. Wkład dr. inż. Dariusza Kulusa w przygotowanie prac wykazanych jako osiągnięcie naukowe jest wiodący, co potwierdzają oświadczenia Habilitanta, jak i współautorów publikacji.

Obiektem badań przedstawionych przez Habilitanta jako osiągnięcie naukowe jest serduszką okazała (*Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara, znana też pod wcześniejszą nazwą *Dicentra spectabilis* (L.) Lem.) – popularna w Polsce i na świecie bylina ogrodowa o dużym znaczeniu dekoracyjnym w parkach, ogrodach, na balkonach i jako kwiat cięty oraz o dużym potencjale zastosowań medycznych, farmakologicznych i kosmetycznych. Pomimo szerokiej dostępności odmian uprawnych, tradycyjne metody rozmnażania wegetatywnego gwarantujące powtarzalność cech roślin matecznych są mało wydajne, a populacje endemiczne tego gatunku są nieliczne i w niedalekiej przyszłości może on zostać zaliczony do zagrożonych wyginięciem. Z powyższych względów wybór tego gatunku do badań należy uznać za w pełni uzasadniony. Zakres badań składających się na osiągnięcie naukowe również znajduje pełne uzasadnienie, gdyż *L. spectabilis* w obszarze zastosowania różnych systemów kultur *in vitro* kreuje liczne problemy badawcze, na które Habilitant usiłował znaleźć odpowiedzi. Nadrzędny cel badawczy został określony jako stworzenie podstaw wegetatywnego rozmnażania *in vitro* oraz długoterminowego przechowywania tkanek *L. spectabilis* w ciekłym azocie, a także poszerzenia zakresu zróżnicowania genetycznego u tego gatunku z wykorzystaniem klasycznych i nowoczesnych narzędzi biotechnologicznych.

Pierwszym zagadnieniem badawczym było opracowanie procedur umożliwiających regenerację i rozmnażanie *in vitro* *L. spectabilis* o wysokiej jakości. Temu celowi poświęcone jest 6 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (P1-P4, P8, P10). W artykułach P1 i P2 zbadano wpływ regulatorów wzrostu na rozwój, jakość i stan fizjologiczny dwóch odmian *L. spectabilis* ('Gold Heart' i 'White Gold') rozmnażanych *in vitro* na modyfikowanej pożywce Murashige i Skoog (MS) z jednowęzłowych fragmentów pędów. W badaniach wykazano, że użycie takich eksplantatów inicjalnych pozwala uzyskać kaulogenezę, ryzogenezę i embriogenezę somatyczną, ale odpowiedź morfogenetyczna eksplantatów na różne regulatory wzrostu dodawane do pożywki jest zależna od odmiany serduszkii. Suplementacja pożywki różnymi regulatorami wpływała także na zawartość pierwotnych i wtórnych metabolitów w pędach i kalusie. Dodatek IAA stymulował syntezę chlorofilu *a* w pędach 'Gold Heart', podczas gdy dodatek BA i KIN miał negatywny wpływ na zawartość chlorofilu *b* w pędach tej odmiany. Dodatek żadnego z regulatorów wzrostu nie wpływał na wzrost poziomu barwników w odmianie 'White Gold'. Zbadano także przeżywalność mikrosadzonek po przeniesieniu do warunków *ex vitro*, która zależała od składu pożywki użytej do namnażania pędów (P2). W artykule P2 przedstawione zostały wyniki analiz genetycznych (SCoT oraz RAPD), które potwierdziły stabilność genetyczną roślin rozmnożonych metodą *in vitro* na pożywkach dających najwyższy współczynnik rozmnażania (0,5 mg·L⁻¹ IBA i 2,0 mg·L⁻¹ BA dla 'White Gold' oraz pożywka bez suplementacji regulatorami wzrostu dla 'Gold Heart'), co jest niezwykle ważne dla możliwości wykorzystania opracowanych protokołów w komercyjnym mikrorozmnażaniu *L. spectabilis*.

W toku dalszych badań (P3) sprawdzono możliwość wykorzystania niemerystatycznych fragmentów pędów (całe liście, ogonki liściowe i międzywęzła) wykładanych na pożywki z dodatkiem BA, IAA, NAA, 2,4-D lub PIC w różnych stężeniach i kombinacjach do regeneracji *in vitro* *L. spectabilis* odmiany 'Alba'. Rodzaj eksplantatu i skład pożywki wpływał na masę otrzymanego kalusa, ale wydajność organogenezy przybyszowej była zaskakująco niska w porównaniu do danych literaturowych dla innych rodzin botanicznych. Może to świadczyć o tym, że serduszka jest gatunkiem tzw. trudnym w rozmnażaniu *in vitro*, bo podobne problemy ze stymulacją regeneracji *in vitro* opisano także u innych przedstawicieli z rodziny *Papaveraceae*. Wydajność embriogenezy somatycznej była zdecydowanie wyższa, ale uzależniona od typu eksplantatu i składu pożywki. Niezależnie od powyższego, pewne wątpliwości budzi fakt przeprowadzenia tych badań na innej odmianie niż we wcześniejszych eksperymentach dotyczących regeneracji na eksplantatach merystatycznych. A Habilitant sam wykazał w artykułach P1 i P2, że odpowiedź morfogenetyczna eksplantatów na różne regulatory wzrostu dodawane do pożywki jest zależna od odmiany.

Intersujące badania Habilitanta dotyczyły działania naturalnych ekstraktów roślinnych i nanocząsteczek w kulturach *in vitro* serduszki okazałej. W artykule P8 zaprezentowano wyniki eksperymentów nad porównaniem przydatności tradycyjnych regulatorów wzrostu i ekstraktów roślinnych (pulpy kokosowej, nasion owsa, ryżu i sezamu) w indukcji regeneracji i namnażania pędów bocznych dwóch odmian serduszki – 'Gold Heart' i 'White Gold'. Na podkreślenie zasługuje to, że ekstrakty z nasion wyżej wymienionych roślin użyte zostały po raz pierwszy w roślinnych kulturach *in vitro*. Reakcja kultur na ekstrakty roślinne zależna była od odmiany oraz badanej cechy roślin. Ważne jednak, że wykazano ich pozytywny wpływ, np. ekstrakt kokosowy stymulował proliferację pędów i podnosił współczynnik namnażania odmiany 'Gold Heart', a ekstrakt ryżowy stymulował kallogenezę odmiany 'White Gold' i pozwolił uzyskać dwukrotnie wyższy współczynnik namnażania niż tradycyjne regulatory wzrostu. Do tego wyciągi roślinne są znacznie tańsze niż komercyjne auksyny i cytokininy. Innym interesującym i ważnym wynikiem jest uzyskanie dwukrotnie wyższego współczynnika namnażania pędów dla odmiany 'Valentine' serduszki okazałej po dodaniu do pożywki nanocząsteczek złota w porównaniu do suplementacji pożywki tradycyjnymi regulatorami wzrostu (P10).

Ważnym wątkiem badań dotyczących opracowania procedur umożliwiających regenerację *in vitro* *L. spectabilis* o wysokiej jakości było sprawdzenie wpływu szeroko-spektralnych diod elektroluminescencyjnych (LED) na morfogenezę. Eksperymentami (P4) objęto jedną odmianę serduszki ('Gold Heart') i wykazano, że moduły LED o wysokiej zawartości światła czerwonego oraz dalekiej czerwieni są optymalne dla uzyskania współczynnika namnażania oraz parametrów biometrycznych roślin porównywalnych do tych obserwowanych pod lampami fluorescencyjnymi, ale przy dwukrotnie niższym poborze energii elektrycznej.

Cały powyższy wątek badań składający się na osiągnięcie naukowe Habilitanta należy uznać za niezwykle owocny i wnoszący szereg ciekawych i nowatorskich aspektów pozwalających na zaproponowanie efektywnych systemów rozmnażania *in vitro* serduszki okazałej, tym cenniejszych, bo gatunek ten należy uznać za tzw. „trudny” w kulturach *in vitro*. Pewien niedosyt budzi jedynie fakt, że nie wszystkimi eksperymentami objęto te same odmiany, a powszechnie wiadomo, a nawet wykazano

w badaniach własnych, że nie można pominąć cech odmianowych roślin przy sprawdzaniu wpływu różnych czynników na odpowiedź morfogenetyczną eksplantatów oraz dalszy wzrost i rozwój kultur *in vitro*.

Drugim zagadnieniem badawczym składającym się na osiągnięcie naukowe dr. inż. Dariusza Kulusa było porównanie skuteczności różnych strategii krioprezerwacji pąków wierzchołkowych serduszki okazałej. Wyniki badań z tego zakresu Habilitant zamieścił w pięciu artykułach naukowych (P5-P9). Ponieważ skuteczność techniki kapsułkowania-dehydratacji okazała się ograniczona w odniesieniu do badanej odmiany 'White Gold' *L. spectabilis* (artykuł P5), Habilitant zajął się badaniem możliwości zastosowania trzech innych metod krioprezerwacji: witrifikacji, kropli-witrifikacji oraz kapsułkowania-witrifikacji (publikacje P6 i P7). Przeprowadzone analizy pozwoliły wskazać roztwór witrifikacyjny 3 jako najbardziej skuteczny w zabezpieczeniu kriotraktowanych tkanek serduszki, zarówno pod względem przeżywalności jak i jakości zregenerowanych z nich roślin. Stwierdzono także, że tolerancja kapsułkowania eksplantatów serduszki na długotrwałe odwadnianie jest zdecydowanie wyższa niż nieotoczonych pąków wierzchołkowych, a dalej również, że technika kapsułkowania-witrifikacji zapewnia najwyższą przeżywalność materiału biologicznego (ponad 73%), jak również najbardziej intensywny rozwój roślin po rozmrożeniu eksplantatów. Najmniej efektywną okazała się metoda witrifikacji. Ostatecznym wyznacznikiem możliwości stosowania konkretnej procedury krioprezerwacji jest brak zmian genetycznych w przechowywanych tkankach. Dlatego Habilitant przeprowadził analizy molekularne ISSR, RAPD i SCoT, które wskazały metodę kapsułkowania, jako technikę w 100% zabezpieczającą stabilność genetyczną materiału biologicznego.

Bardzo ciekawym i nowatorskim eksperymentem w odniesieniu do badań nad krioprezerwacją serduszki okazałej było sprawdzenie użyteczności ekstraktów roślinnych dodawanych do pożywki na etapie prekultury (P8), które wcześniej zbadano w systemach rozmnażania *in vitro* tego gatunku. Zastosowanie ekstraktów roślinnych nie poprawiło – co prawda – przeżywalności pąków wierzchołkowych przechowywanych w ciekłym azocie, ale ekstrakt kokosowy stymulował proliferację i rozwój pędów po odmrożeniu eksplantatów, co wskazuje na potrzebę dalszych badań w tym zakresie. Innym niezwykle ciekawym wątkiem badań było sprawdzenie wpływu nanocząsteczek złota na efektywność krioprezerwacji metodą kapsułkowania-witrifikacji. Nanocząsteczki te w różnych stężeniach były dodawane zarówno do pożywki do prekultury, do alginianowej otoczki lub do *post*-mrożeniowej pożywki wzrostowej. Udało się wykazać pozytywny wpływ nanocząsteczek złota dodawanych do otoczki alginianowej na przeżywalność eksplantatów, w przypadku dodawania AuNPs do pożywek do prekultury wyniki były niejednoznaczne, a dodatek nanocząsteczek do *post*-mrożeniowej pożywki wzrostowej wpływał negatywnie na przeżywalność eksplantatów i zwiększał się wraz ze wzrostem stężenia.

Podsumowując to zadanie badawcze, należy podkreślić, że po raz pierwszy opracowano efektywną i bezpieczną pod względem stabilności genetycznej metodę krioprezerwacji serduszki okazałej. Po raz pierwszy też w badaniach nad krioprezerwacją merystemów wykorzystano nanocząsteczki, które w niskich stężeniach spowodowały podniesienie efektywności technik kriogenicznych nawet o 20%. Wynik ten uznaję za niezwykle ważny dla dalszego rozwoju technik długoterminowego przechowywania materiału biologicznego w ciekłym azocie.

Podobnie jak w pierwszym zadaniu badawczym, także tutaj pewne wątpliwości budzi fakt przeprowadzania różnego zakresu eksperymentów na pojedynczych, ale innych odmianach serduszki okazałej. Wyniki prezentowane w pracy P5 dotyczą odmiany 'White Gold', w pracy P6 – odmiany 'Gold Heart', podczas gdy w pracach P7 i P9 obiektem badań była odmiana 'Valentine', a w pracy P8 już dwie odmiany: 'Gold Heart' i 'White Gold'. Nie umniejsza to jednak ważności, oryginalności, a nawet w pewnych aspektach zupełnej innowacyjności badań i uzyskanych wyników.

Trzecim zadaniem badawczym składającym się na osiągnięcie naukowe dr. inż. Dariusza Kulusa była identyfikacja enzymatycznej i nieenzymatycznej odpowiedzi komórek na warunki kultur *in vitro* *L. spectabilis*. Pędy i kalus serduszki uzyskane w badaniach przedstawionych w publikacjach P1-P3 oraz P10 analizowano pod kątem zawartości barwników kluczowych dla procesu fotosyntezy oraz nieenzymatycznych przeciwutleniaczy. Ponadto w roślinach serduszki 'Valentine' (publikacje P9 i P10) określono aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych. Interesującym wynikiem przeprowadzonych badań jest wykazanie, że dodatek do pożywki auksyny NAA wpływa na zwiększenie zawartości wybranych metabolitów (barwników fotosyntetycznych i polifenoli) w kalusie, co pozwala na symultaniczną nadprodukcję tych substancji. Kolejne badania pozwoliły poznać enzymatyczną odpowiedź komórek serduszki okazałej poddanych działaniu różnych stresorów. To ważne osiągnięcie, gdyż niewiele wiadomo było dotychczas na temat systemu antyoksydacyjnego tego gatunku. W eksperymentach dotyczących krioprezerwacji oraz indukowanej mutagenyzy, największy wzrost aktywności zaobserwowano u peroksydazy gwajakolowej, co sugeruje że jest najczulszym markerem stresu oksydacyjnego serduszki uczestniczącym w mechanizmach obronnych rośliny. Natomiast najbardziej stabilnym spośród przebadanych białek katalitycznych w warunkach stresu okazała się reduktaza glutanonowa. W badaniach wykazano ponadto, że nawet długotrwały stres wywołany działaniem nanocząsteczek złota, nie powodował wyraźnych zmian aktywności badanych enzymów, co podkreśla dodatkowo zasadność stosowania nanocząsteczek złota w kulturach *in vitro* serduszki okazałej.

Czwartym zadaniem badawczym składającym się na osiągnięcie naukowe dr. inż. Dariusza Kulusa było wykorzystanie zmienności somaklonalnej i indukowanej mutagenyzy w poszerzaniu zakresu zmienności genetycznej. Zmienność somaklonalną serduszki (P2) została stwierdzona na poziomie sekwencji DNA, gdy eksplantaty regenerowały w obecności auksyn i cytokinin w pożywce. Zmienność ta została wykryta przez markery RAPD (na poziomie 69,1%) oraz markery SCoT (na poziomie 36,8%). Jednak większość tej zmienności zostało uznane za nieistotną po wykonaniu analizy skupień i obliczeniu dystansu genetycznego. Jedynie cztery genotypy różniły się istotnie od roślin kontrolnych, ale nie wykazywały różnic fenotypowych. Dlatego Habilitant zdecydował się na zastosowanie kilku czynników mutagennych celem zaindukowania większej zmienności (P10). Sprawdzone wpływ nanocząsteczek złota, mikrofal oraz promieniowania X, w różnych dawkach. Zweryfikowano także użyteczność różnych metod do wykrywania zmienności – cytometrii przepływowej oraz markerów SPAR – DAMP, RAPD, SCoT oraz ISSR. Interesującym wynikiem jest wysoka przeżywalność eksplantatów *in vitro* po zastosowaniu mutagenów wynosząca od 86 do 100%, co świadczy o dużej odporności tego gatunku na stres wywołany czynnikami mutagennymi. Daje to szansę wykorzystania serduszki okazałej w programach hodowlanych opartych zarówno na tradycyjnym krzyżowaniu, jak i na hybrydyzacji czy transformacji. Po raz pierwszy określono wielkość genomu serduszki

okazałej, która na podstawie analizy cytometrycznej okazała się bardzo mała (1281 Mbp oraz 1,314 pg jądrowego DNA). Gatunek o tak małym genomie może być wykorzystany jako organizm modelowy w badaniach z zakresu biologii eksperymentalnej. Analizy SPAR potwierdziły użyteczność tej grupy markerów dla badania zmienności serduszki okazałej. Mutacje zostały wykryte u 7,5% roślin przy zastosowaniu markerów DAMP, RAPD i SCoT, ale nie przez ISSR. W dalszym etapie zaobserwowano także zmiany fenotypowe dotyczące kształtu liści u roślin naświetlanych promieniowaniem X lub u roślin traktowanych nanocząsteczkami złota, choć w tym pierwszym przypadku częściej. Zmiany te są na tyle interesujące, że Habilitant ma nadzieję na uzyskanie nowych odmian serduszki okazałej.

Na podkreślenie wagi wyników tej części osiągnięcia naukowego zasługuje nowość badań zmierzających do zwiększenia zmienności badanego gatunku na drodze indukowanej mutagenezy oraz zastosowanie po raz pierwszy w tym celu nanocząsteczek złota w wysokich stężeniach. Innowacyjne jest także wykorzystanie mikrofal jako taniego i powszechnie dostępnego źródła promieniowania mutagennego. Pionierskie było ponadto określenie wielkości genomu serduszki okazałej.

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr. inż. Dariusza Kulusa, stwierdzam, iż przedstawiony cykl powiązanych ze sobą publikacji składających się na osiągnięcie naukowe jest oryginalnym i spójnym opracowaniem naukowym o wartości poznawczej i aplikacyjnej i stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

3. Ocena pozostałego dorobku naukowego dr. inż. Dariusza Kulusa

Dorobek naukowy dr. inż. Dariusza Kulusa, poza 10 publikacjami stanowiącymi cykl składający się na osiągnięcie naukowe, obejmuje 30 publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych i 11 rozdziałów w monografiach z list punktowanych MEiN oraz - dodatkowo - 3 publikacje naukowe w materiałach konferencyjnych niepunktowanych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że aż 10 publikacji oryginalnych (poza cyklem składającym się na osiągnięcie), a które ukazały się po doktoracie, to artykuły z IF. W przypadku 20 publikacji (poza cyklem stanowiącym osiągnięcie naukowe) dr inż. Dariusz Kulus jest jedynym autorem, a w zdecydowanej większości jest pierwszym i/lub korespondencyjnym autorem. Sumaryczny IF Habilitanta wynosi 66,918, co po odliczeniu sumarycznego IF z cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, daje 33,007. Łączny dorobek punktowy dr inż. Dariusza Kulusa to 2216 punktów MEiN (zgodnie z rokiem wydania), z czego 2027 punkty stanowią dorobek punktowy po uzyskaniu stopnia doktora, a 870 punktów obejmuje cykl publikacji stanowiących osiągnięcie. Z liczby 2216 punktów, 396 stanowiły punkty uzyskane przed 2019 rokiem). Liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science wynosi 325 (230 bez autocytowań), a indeks Hirsha 10, wg bazy Scopus 341 (233 bez autocytowań) i indeks Hirsha także 10.

Dorobek naukowy Habilitanta obejmuje także 37 referatów i 28 posterów przedstawianych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, z czego 14 referatów i 23 postery prezentowane były w języku angielskim.

Poza tematyką badawczą przedstawioną jako osiągnięcie naukowe, dr inż. Dariusz Kulus zajmował się innymi zagadnieniami dotyczącymi nie tylko roślin ozdobnych, ale także gatunków rolniczych, leczniczych, owocowych i warzywnych.

Najszerzym zagadnieniem były badania nad krioprezerwacją materiału roślinnego. Habilitant rozpoczął je wkrótce po ukończeniu studiów magisterskich we współpracy z dr hab. Anną Mikułą, prof. PAN, z Ogródu Botanicznego w Powsinie, która później została promotorem Jego pracy doktorskiej. Badania wstępne zaowocowały kilkoma artykułami przeglądowymi, rozdziałami w monografiach i publikacjami, a najważniejsze na tym etapie wydaje się zoptymalizowanie procedury krioprezerwacji, która może być wykorzystana do utworzenia kriobanku polskich odmian chryzantem uzyskanych na drodze radiomutacji.

Rozprawa doktorska Dariusza Kulusa dotyczyła krioprezerwacji chimer roślinnych oraz analizy ich stabilności po przechowywaniu w ciekłym azocie, na przykładzie trzech odmian chryzantemy wielkokwiatowej. W trakcie prac przebadano wpływ kilku procedur krioprezerwacji na odpowiedź morfogenetyczną eksplantatów, (II.4.12 i II.4.15) uzyskując wysoką przeżywalność pąków wierzchołkowych. Następnie zweryfikowano stabilność genetyczną materiału roślinnego. Analizy histologiczne oraz ultrastrukturalne (TEM) pozwoliły zrozumieć w jaki sposób uszkodzenia poszczególnych warstw histogenowych merystemu, primordiów oraz młodych liści pąków wierzchołkowych w trakcie krioprezerwacji wpływają na różne typy odpowiedzi morfogenetycznej eksplantatów po ich odmrożeniu (II.4.14). Przeprowadzone analizy genetyczne, cytometryczne oraz biochemiczne i biometryczne potwierdziły zachowanie cech odmianowych roślin wyjściowych. Stwierdzono jednak wpływ krioprezerwacji metodą kapsułkowania-dehydratacji na rozwój organów wegetatywnych (częściowo niższe i bardziej zwarte rośliny) oraz przebieg kwitnienia jednej z odmian chryzantem. W publikacji II.4.18 stwierdzono, że krioprezerwacja „nie wpłynęła na termin kwitnienia chryzantem”, natomiast w przypadku odmiany ‘Lady Salmon’ kwiatostany otwierały się wolniej, ale szybciej blakły. W autoreferacie, który nie podlega ocenie, Habilitant napisał (Załącznik nr 3, str. 32): „Stwierdzono natomiast wpływ krioprezerwacji na rozwój organów wegetatywnych oraz termin kwitnienia chryzantem.” Jest tu zatem pewna nieścisłość w odniesieniu do tekstu publikacji.

Powyższe badania z zakresu krioprezerwacji chryzantem oceniam bardzo wysoko, gdyż po raz pierwszy udowodniono możliwość bezpiecznego przechowywania chimer roślinnych w ciekłym azocie, bez oddzielania ich komponentów.

Z tego obszaru badań na podkreślenie zasługuje także pionierska praca dotycząca krioprezerwacji ajanii spokojnej (*Ajania pacifica*), gatunku blisko spokrewnionego z chryzantemą (II.4.11). Ponadto Habilitant wykazał się dużą aktywnością publikacyjną z tego obszaru w pracach przeglądowych, rozdziale w monografii oraz doniesieniach konferencyjnych krajowych i zagranicznych.

Z wykorzystaniem technik krioprezerwacji materiału roślinnego kojarzone są bez wątpienia banki genów. Zagadnienia badawcze związane z roślinnymi zasobami genowymi znalazły się także w obszarze zainteresowań dr. inż. Dariusza Kulusa. Owocem szczegółowego studium literaturowego oraz własnych doświadczeń nad zasobami genowymi pomidora (*Solanum lycopersicum*) były 3 publikacje przeglądowe oraz rozdział proszony w monografii.

Kolejnym wątkiem badań Habilitanta, które dotyczyły chryzantemy wielkokwiatowej, było wykorzystanie nanocząsteczek srebra oraz mikrofal do indukowania zmienności oraz zastosowania cytometrii przepływowej do wykrywania

zmian w roślinach. Wyniki i doświadczenia Habilitanta w tym obszarze wpłynęło na kierunki jego dalszych prac badawczych, w tym te składające się na przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr. Dariusza Kulusa.

Po raz pierwszy w odniesieniu do chryzantemy przeprowadzone zostały badania nad wpływem mikrofal generowanych przez klasyczną kuchenkę mikrofalową na efektywność regeneracji *in vitro* eksplantatów liściowych, aklimatyzację oraz stabilność genetyczną i fenotypową roślin. Wykazano, że napromienienie eksplantatów przez dłuższy czas ogranicza ich regenerację, ale wpływa negatywnie na ukorzenianie i aklimatyzację. Dodatkowo okazało się, że ten typ napromienienia wywoływał zmiany fenotypowe kwiatostanów chryzantem, które zostały potwierdzone analizami RAPD. Kolejny etap badań dotyczył możliwości zastosowania po raz pierwszy nanocząsteczek srebra do zaindukowania zmienności u chryzantemy, co okazało się sukcesem. Wyniki zostały opublikowane, a dodatkowym efektem badań było uzyskanie dwóch nowych odmian chryzantem. Innym rodzajem zmienności u chryzantem, którą Habilitant badał, a która była wcześniej obiektem naukowych i hodowlanych zainteresowań Profesora Marka Jerzego oraz Profesor Małgorzaty Zalewskiej, był chimeryzm. Ważnym osiągnięciem Habilitanta wraz ze współautorkami było pozytywne zweryfikowanie możliwości zastosowania analizy zawartości jądrowego DNA techniką cytometrii przepływowej do wykrycia somaklonów i/lub zjawiska separacji komponentów chimery już na etapie namnażania roślin *in vitro* (II.4.20).

Jeszcze innym zakresem badań Habilitanta była embriogeneza somatyczna i mikrorozmnażanie roślin ogrodniczych. Od tych badań Dariusz Kulus rozpoczynał swoją karierę naukową, bo były to badania jeszcze ramach jego pracy magisterskiej, a potem kontynuowane w trakcie doktoratu. Te pierwsze badania obejmowały sprawdzenie wpływu warunków świetlnych oraz stężenia 2,4-D na przebieg embriogenezy somatycznej zagrożonego gatunku meksykańskiego kaktusa *Astrophytum asterias* (II.2.7 i II.4.1). Interesujący był wątek badań dotyczący możliwości wykorzystania technologii sztucznych nasion w propagacji kilku odmian chryzantemy (II.4.2) i innych gatunków z rodziny astrowatych (II.2.10).

W latach 2015-2018) ramach polsko-portugalskiej grupy badawczej, Habilitant prowadził prace nad wyselekcjonowaniem nowych linii jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), zasobnych w metabolity wtórne cenne dla przemysłu fitofarmaceutycznego. W toku badań wytypowano 3 linie jeżówki o zwiększonej zawartości kwasu cychorynowego i wskazano markery genetyczne najbardziej efektywne w wykrywaniu zmienności genetycznej jeżówki (II.4.19 i II.7.56). Z ważniejszych prac z tego zakresu należy wymienić opracowanie po raz pierwszy kompletnej procedury mikrorozmnażania serduszki mieszańcowej (*Dicentra × hybrida*) 'Amore Rose' (II.7.53, II.4.33 i III.3.1), spokrewnionej z serduszką okazałą, na której Habilitant prowadził badania wykazane jako osiągnięcie naukowe.

Ostatnim zakresem tematycznym Habilitanta była fizjologiczna, biochemiczna i molekularna kontrola roślin ogrodniczych (truskawki, poziomki, bazylii) oraz rolniczych (pszenicy i pszenżyta) uprawianych w warunkach *in vivo*. Tak więc w dorobku naukowym dr. inż. Dariusza Kulusa pojawia się także obszar badawczy, który nie wykorzystuje technik *in vitro*, wokół których skupia się większość badań Habilitanta, a dodatkowo obejmuje inne grupy roślin uprawnych, poza ozdobnymi. Świadczy to szerokich horyzontach badawczych Habilitanta, przy zachowaniu

pogłębionej specjalizacji biotechnologicznej. Prace z tego zakresu związane były przede wszystkim ze współpracą z innymi ośrodkami lub innymi zespołami badawczymi rodzimej Uczelni (Katedra Agronomii Politechniki Bydgoskiej, Politechnika Gdańska i przedsiębiorstwo NIVISS w Gdynia, Katedra Biologii i Ochrony Roślin Politechniki Bydgoskiej).

Wysoko należy ocenić także aktywność Habilitanta w pozyskiwaniu, grantów i projektów oraz uczestnictwo w projektach kierowanych przez innych badaczy. Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitant kierował projektem badawczym MNiSW „Iuventus Plus” (2015-2017), aktualnie kieruje projektem badawczy NCN „Sonata 16”, pt. W drodze do wieczności: Wieloaspektowa analiza wpływu nanocząstek na właściwości krioprzechowywanego materiału roślinnego (2021-2024) oraz jest wykonawcą projektu badawczego MRiRW, pt. Występowanie *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie, jego zróżnicowanie oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych i metabolicznych markerów odporności na rdzę żdźbłową (2021-2025). Habilitant był także jedynym wykonawcą lub kierownikiem 7 projektów finansowanych w ramach wydziałowego funduszu grantowego WRiB dla młodych naukowców.

Współpracę Habilitanta z sektorem gospodarczym należy ocenić wysoko. Jego aktywność na tym polu przejawiała się w realizacji trzech projektów (z VITROFLORA Grupa Producentów Sp. z o.o. w Trzemeszcu, Jackiem Moritz z Kolonii Domaszewnica oraz firmą NIVISS Leszek Łosin Sp. J. w Gdyni).

Habilitant zgłosił także do Urzędu Patentowego RP w 2020 roku 5 wynalazków z zakresu roślinnych kultur in vitro, w tym 4 dotyczące krioprezerwacji pąków wierzchołkowych serduszki okazałej (Zał. 4, III.3, str. 32), ale wszystkie znajdują się jeszcze na etapie weryfikacji merytorycznej.

Istotna była także aktywność Habilitanta we współpracy z innymi ośrodkami krajowymi i zagranicznymi. Współpraca badawcza w Polsce obejmowała Laboratorium Kriobiologii, Pracowni Biotechnologii PAN w Warszawie, Ogród Botaniczny Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Powsinie, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Katedra Onkologii i Brachyterapii Centrum Medycznego UMK w Toruniu oraz Zakład Fizyki Medycznej Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Współpraca z ośrodkami zagranicznymi – oprócz wspomnianego już zespołu polsko-portugalskiego – obejmowała czterokrotne uczestnictwo Habilitanta w programie Erasmus+ Mobility for Training (Czechy, Chorwacja, Grecja i Hiszpania) oraz Erasmus+ Partner Country (Gruzja). Wymieniona w Autoreferacie opieka nad czterema studentami w Delaware State University, USA, w latach 2017-2018, wykazana została również jako działalność dydaktyczna (punkt 6.1 Autoreferatu, str. 44) i w mojej ocenie winna być uznana głównie za aktywność dydaktyczną. Habilitant jest aktualnie kierownikiem projektu naukowego NCN Sonata 16, który jest realizowany we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Pradze, Republika Czeska, oraz Uniwersytetem Warszawskim.

Na ogromne uznanie zasługuje też wykonanie przez Habilitanta łącznie 130 recenzji artykułów naukowych (Zał. 4, II.12, Tabela 3), z czego 85 w czasopismach z listy JCR.

Podsumowując pozostały dorobek naukowy dr. inż. Dariusza Kulusa i jego aktywność naukową stwierdzam, że dorobek jest bardzo obszerny, wyniki badań interesujące i znaczące dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, publikowane w większości w renomowanych czasopismach z wysokim IF oraz prezentowane na wielu konferencjach krajowych i zagranicznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że poza pracami oryginalnymi Habilitant opublikował liczne prace przeglądowe i rozdziały w monografiach, także zapraszanych, wykonał też imponującą liczbę recenzji prac naukowych, co świadczy o głębokiej dojrzałości naukowej i uznaniu międzynarodowym. W związku z powyższym uważam, że dr inż. Dariusz Kulus spełnia wymagania w tym zakresie kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

4. Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego

Dorobek dydaktyczny Dr. inż. Dariusza Kulusa obejmuje m.in. prowadzenie zajęć dydaktycznych z kilku przedmiotów („Biotechnologia w produkcji roślinnej” - ćwiczenia laboratoryjne, seminaria dyplomowe w języku polskim i angielskim, „Agrobiotechnologia” – wykłady i ćwiczenia w języku angielskim), przygotowanie sylabusów z przedmiotu „Kriobiologia” w języku polskim i angielskim, opiekę naukową nad studentami krajowymi i zagranicznymi w trakcie doświadczeń do prac dyplomowych oraz promotorstwo jednej pracy inżynierskiej i dwóch magisterskich. Oceniam ten dorobek jako znaczący w odniesieniu do specjalizacji naukowej Habilitanta, niemniej nie można uznać go za imponujący, a obciążenie godzinami dydaktycznymi wydaje się niezbyt wysokie.

Działalność organizacyjną Habilitanta oceniam bardzo wysoko. Obejmuje ona zarówno działalność na rzecz Uczelni i Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii PBŚ, środowiska studenckiego, a także uczniów szkół rolniczych (punkt 6.2 Autoreferatu, str. 45 i 46). Jako ważniejsze przykłady takiej działalności na rzecz Uczelni i Wydziału można wymienić: siedmiokrotną współorganizację „Drzwi Otwartych” w UTP w Bydgoszczy (2014-2020) wraz z wygłoszeniem 4 prelekcji, członkostwo w Wydziałowym Zespole ds. Jakości Kształcenia (2014-2016), redakcja oficjalnej strony Wydziału na Facebook (2017-) oraz strony internetowej Pracowni Roślin Ozdobnych i Warzywnych, członkostwo w Radzie Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogródnictwo (2020-2024), pełnienie funkcji wydziałowego Koordynatora Międzynarodowych Programów Badawczych oraz prace w wydziałowych zespołach ds. optymalizacji wykorzystania aparatury badawczej, ds. Strategii WRiB. Habilitant pełni funkcję kierownika Pracowni Roślin Ozdobnych i Warzywnych WRiB PBŚ w kadencji 2021-2024.

Na rzecz środowiska studenckiego Habilitant działał w Samorządzie Doktorantów Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii (2013-2016). Aktywność dr. Dariusza Kulusa na rzecz szkół rolniczych, która przejawiała się w kilkukrotnej prezentacji uczniom laboratoriów i szklarni wydziałowych, najczęściej w połączeniu z prelekcjami oraz w przewodniczeniu bloku Ogródnictwo, Komitetu Okręgowego Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych (2021). Dr Dariusz Kulus był też członkiem Komitetów Naukowych 3 konferencji naukowych (w tym jednej zagranicznej), sekretarzem Komitetu Organizacyjnego jednej konferencji, a także prowadził sesję referatową podczas międzynarodowej konferencji dla doktorantów (zał. 4, II.8, str. 22). W latach 2018-2021 Habilitant był redaktorem sekcyjnym kwartalnika

BioTechnologia wydawanego przez PAN (Załącznik 4, II.12., str. 24), a w ramach pełnienia tej funkcji dokonał redakcji 42 manuskryptów i wykonał zdjęcia prezentowane na 4 okładkach czasopisma.

W odniesieniu do popularyzowania nauki, zasługi Habilitanta należy uznać za znaczące. Dr inż. Dariusz Kulus jest m.in. autorem 3 artykułów popularno-naukowych, wygłosił 7 wykładów oraz przeprowadził 2 warsztaty w ramach Bydgoskiego Festiwalu Nauki, uczestniczył w 3 edycjach Biennale Fotograficznego Uniwersytetu Śląskiego „Nauka w obiektywie” (2012, 2014 oraz 2017 r.), wygłosił 10 wykładów w ramach Uniwersytetu Dziecięcego UTP, 6 wykładów dla zewnętrznych instytucji kultury i zdrowia, przeprowadził zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla uczniów szkół średnich. Udzielał także wywiadów prasowych i telewizyjnych. Ponadto był lub jest członkiem towarzystw naukowych (Koła Naukowego BioX, Polskiego Towarzystwa Agronomicznego oraz Society for Cryobiology) (Załącznik 4, II.10, str. 23).

Dodatkowo, Habilitant uzyskał 7 wyróżnień, 11 nagród (w tym 7 Rektora UTP lub PBS) i 8 stypendiów naukowych lub konferencyjnych (Załącznik 3, 6.4, str. 50). W ciągu ostatnich 10 lat Habilitant niezwykle głęboko rozwijał swoje kompetencje zawodowe, biorąc udział w 56 szkoleniach (13 międzynarodowych), webinarium i warsztatach, w tym 30 z zakresu biologii, chemii, biotechnologii i nauk rolniczych, 22 z zakresu biznesu, finansowania nauki i ochrony własności intelektualnej oraz 4 z zakresu pedagogiki.

Podsumowując, dr inż. Dariusz Kulus jest bardzo zaangażowanym pracownikiem akademickim, aktywnie włącza się w działalność dydaktyczną i organizacyjną swojej Uczelni i Wydziału i stale podnosi swoje kwalifikacje zawodowe. Aktywny jest także udział Habilitanta w popularyzowanie nauki. W związku z tym oceniam pozytywnie Jego dorobek dydaktyczny, organizacyjny i popularyzatorski.

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z przedłożonym przez dr. inż. Dariusza Kulusa osiągnięciem naukowym (w formie jednego cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych) oraz pozostałym dorobkiem naukowym, dydaktycznym, organizacyjnym i popularyzatorskim stwierdzam, że spełnia on wymogi stawiane kandydatom do nadania stopnia doktora habilitowanego określonego w art. 219 ust. 1 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.). Uznaję, że osiągnięcia naukowe dr. inż. Dariusza Kulusa stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Tym samym pozytywnie opiniuję wniosek dr. inż. Dariusza Kulusa o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

dr hab. inż. Dariusz Sochnacki