



INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN
im. Franciszka Górskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
POLISH ACADEMY OF SCIENCES
The Francisek Górski
INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY

prof. dr hab. inż. Edyta Skrzypek
Zakład Biotechnologii
Instytut Fizjologii Roślin im. *F. Górskiego*
Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 21
30-239 Kraków

Kraków, 11.08.2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Licznarskiego pt. „Wpływ promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów” wykonanej na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, pod kierunkiem dr hab. Justyny Lemy-Rumińskiej, prof. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego

Podstawa formalno-prawna przygotowania recenzji

Podstawą prawną wykonania recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Licznarskiego pt. „Wpływ promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów” jest Uchwała nr 23/2022/2023 Rady Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 16 czerwca 2023 roku o powołaniu mnie na recenzenta.

Ocena problematyki badawczej

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Piotra Licznarskiego dotyczy określenia roli promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów.

Kaktusy powszechnie rozmnażane są poprzez ukorzenianie sadzonek. Jednak niektóre gatunki mają trudności w rozmnażaniu wegetatywnym oraz mały rozmiar nasion i ich niską żywotność uniemożliwiająca uzyskanie pożądanej liczby roślin. Zarówno rozmnażanie wegetatywne kaktusów jak i rozmnażanie z nasion, ze względu na ich ograniczoną produkcję i dostępność, jest niewystarczające aby pokryć zapotrzebowanie rynku na kaktusy czy wykorzystać je w programach reintrodukcji. W związku z tym techniki *in vitro* są

dotychczasowymi narzędziami wykorzystywanymi w celu zaspokajania popytu. Ponieważ wiele gatunków kaktusów jest zagrożonych wyginięciem i chronionych, mikrorozmnażanie *in vitro* stało się, od czasu pracy Mausetha w 1976 r., podstawowym narzędziem służącym do zachowania zasobów genetycznych.

Opisywane w literaturze metody mikrorozmnażania kaktusów w kulturach *in vitro* skupiają się głównie na doborze odpowiednich regulatorów wzrostu roślin, ich kombinacji i stężeń, głównie cytokinin i auksyn w podłożu hodowlanym oraz doborze rodzaju eksplantatu w celu pobudzenia ich wzrostu i rozwoju. Większość procedur jest wysoce specyficzna i niepozwalająca na szerokie zastosowanie do wszystkich członków rodziny Cactaceae. W związku z tym prowadzone obecnie badania koncentrują się przede wszystkim na opracowaniu protokołów mikrorozmnażania dla dużej liczby gatunków kaktusów, rozmnażanych w celach komercyjnych. Techniki kultur tkankowych powinny mieć również dużą wartość dla ochrony i zachowania zasobów genetycznych kaktusów.

W celu rozmnażania wymagających roślin kaktusowych włączenie mutantów do hodowli może również przyczynić się do wytworzenia nowych odmian i zwiększenia ich różnorodności. Mutacje są bowiem obok zmienności somaklonalnej źródłem większości zmienności genetycznej. Hodowla mutacyjna roślin, zwana także hodowlą odmianową, wykorzystuje promieniowanie fizyczne lub środki chemiczne do wywołania spontanicznej zmienności genetycznej roślin w celu opracowania nowych odmian roślin. Mutageneza jest ważnym narzędziem w wytwarzaniu odmian roślin ozdobnych. Do chwili obecnej w bazie danych odmian zmutowanych, administrowanej wspólnie przez Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa oraz Międzynarodową Agencję Energii Atomowej, zarejestrowano ponad 3200 odmian.

W związku z tym uważam, że podjęcie badań mających na celu określenie wpływu promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów jest wysoce uzasadnione.

Ocena poszczególnych rozdziałów

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich oraz spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Obejmuje ona 136 stron druku, z czego tekst uzupełniają 43 ryciny i 13 tabel, które rzetelnie obrazują wykonane doświadczenia. Autor cytuje w pracy 310 pozycji literatury, co świadczy o dociekliwości i zaangażowaniu w pracę naukową. Recenzowana dysertacja została napisana starannie i przejrzysto.

Rozprawę doktorską otwiera „**Spis treści**”, po którym Autor umieścił krótki „**Wstęp**”, a następnie „**Analizę literatury**”. W przeglądzie literatury liczącym 49 stron Autor wprowadził czytelnika w zagadnienia związane z przeprowadzonymi badaniami. Przegląd

literatury został opracowany starannie i wnikliwie, począwszy od charakterystyki roślin z rodziny Cactaceae, poprzez tradycyjne i obecnie stosowane metody hodowlane, omówienie czynników mutagennych, możliwości zmiany barwy, po wykrywanie mutacji na poziomie biochemicznym i genetycznym.

W dalszej części Autor przedstawił **hipotezę badawczą** oraz **cel i zakres pracy**. Korespondują one z tematem pracy, założeniami metodycznymi oraz wnioskami. Szczegółowe cele pracy sformułowano logicznie i przejrzysto oraz znalazły one odzwierciedlenie w kolejnych podrozdziałach rozdziału „Wyniki”. Przedstawiony przez Doktoranta cel pracy jest ambitny i wskazuje na wykonanie pomiarów, obserwacji i analiz przy użyciu różnorodnych technik biochemicznych, molekularnych i statystycznych.

„**Materiał i metody**” badań wykorzystywane w pracy zostały właściwie dobrane do celu pracy i przedstawione w logicznym porządku. Doktorant, jako materiał do badań wybrał nasiona trzech gatunków kaktusów: *Astrophytum* spp. ‘Purple’, *Copiapoa tenuissima* Ritt. oraz *Uebelmannia pectinifera* Buining, uzyskane z hodowli własnej (*Astrophytum* spp. ‘Purple’, *Copiapoa tenuissima* Ritt.) oraz zakupione w niemieckiej firmie Kakteen Koheres (*Uebelmannia pectinifera* Buining.). Na początku Autor opisuje technikę napromieniowania nasion promieniowaniem X, procedurę dezynfekcji nasion oraz metodę ich kiełkowania i sposób oceny dynamiki kiełkowania. Następnie Autor przedstawia metody biochemiczne, sposób ekstrakcji barwników, analizy molekularne i statystyczne.

Rozdział „**Wyniki**” jest podzielony na 3 części: dynamika kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* poddanych działaniu promieniowania X, ocena barwy siewek i stężenia barwników roślinnych poddanych działaniu promieniowania X oraz analiza molekularna siewek kaktusów uzyskanych w warunkach *in vitro* z nasion poddanych działaniu promieniowania X.

Uzyskane wyniki, obejmujące 30 stron, przedstawione są w sposób uporządkowany i przejrzysty, wykazując zrealizowanie założonego celu. W pierwszej części Autor omówił dynamikę kiełkowania badanych gatunków kaktusów w zależności od zastosowanej dawki promieniowania X w ciągu 57 dni prowadzenia kultury. Doktorant wykazał zróżnicowaną reakcję badanych gatunków na dawki napromieniowania. W przypadku nasion *Astrophytum* spp. ‘Purple’ promieniowanie X w dawce 25 i 50 Gy przyspieszało kiełkowanie o 3-4 dni w porównaniu z nienapromieniowanymi nasionami, ale zmniejszało liczbę kiełkujących nasion o ok. 22%. Natomiast nasiona kaktusów z gatunków *Copiapoa tenuissima* Ritt. i *Uebelmannia pectinifera* Buining kiełkowały jeden dzień wcześniej niż nienapromieniowane, jednakże wyższe dawki promieniowania (25 i 50 Gy) stymulowały kiełkowanie nawet powyżej 17% w porównaniu do nasion nienapromieniowanych.

W kolejnej części rozdziału „Wyniki” Doktorant przedstawia ocenę barwy za pomocą katalogu barw RHSCC oraz analizę zawartości barwników (chlorofili, karotenoidów

i antocyjanów) metodą spektrofotometryczną w kaktusach uzyskanych po napromieniowaniu nasion. Doktorant udowodnił, że liczba siewek bezchlorofilowych gatunków *Astrophytum* spp. 'Purple' i *Copiapoa tenuissima* Ritt. wzrastała wraz z większymi dawkami promieniowania X. Wśród siewek bezchlorofilowych przeważały siewki o barwie pomarańczowej, a pozostałe miały barwę kremowo-białą i czerwoną. Natomiast wśród siewek chlorofilowych dominowały siewki o barwie brunatnej. Wykazał także, że zawartość barwników w tych siewkach malała wraz ze wzrostem dawki promieniowania X. Natomiast w przypadku *Uebelmannia pectinifera* Buining większość siewek miała barwę brunatną, a wraz ze wzrostem promieniowania X odnotowano spadek siewek zielonych.

W dalszej części Doktorant zaprezentował wyniki analiz molekularnych opierających się na markerach SCoT, wykazując bardzo wysoki polimorfizm w siewkach badanych gatunków kaktusów poddanych promieniowaniu X, warunkujący zróżnicowanie siewek w obrębie populacji. Wyniki te potwierdziły obserwacje morfologiczne, dotyczące występowania w obrębie jednego gatunku odmiennych form różniących się kolorem. Również za pomocą analizy danych metodą średnich połączeń – UPGMA Doktorant wykazał duży dystans genetyczny form uzyskanych po zastosowaniu promieniowania X w obrębie wszystkich badanych gatunków kaktusów.

W rozdziale „Dyskusja”, liczącym 12 stron, Doktorant przedstawił umiejętną i wyczerpującą analizę własnych wyników na tle cytowanej literatury, co świadczy o wnikliwym zapoznaniu się z podjętą tematyką badań. Autor poruszył zagadnienia dotyczące indukowania mutacji za pomocą promieniowania jonizującego i wpływu jego dawki na kiełkowanie nasion. Zwrócił uwagę na zaburzenia procesu syntez barwników pod wpływem promieniowania X. Autor poruszył również zagadnienie wykorzystania markerów molekularnych w ocenie zróżnicowania roślin uzyskanych w wyniku hodowli mutacyjnej.

Pan mgr inż. Piotr Licznarski podsumował wyniki badań w rozdziale „Podsumowanie i wnioski” formie 5 punktów. Doktorant wykazał, że promieniowanie X w znacznym stopniu zwiększyło liczbę kiełkujących nasion i nieznacznie przyspieszyło proces kiełkowania nasion badanych gatunków kaktusów oraz spowodowało powstanie bezchlorofilowych siewek. Zastosowanie promieniowania X spowodowało powstanie czerwonej barwy siewek u *Astrophytum* spp. 'Purple' i pomarańczowo-brunatnej u *Copiapoa tenuissima*, które dotąd nie występowały. Doktorant udowodnił również istotny wpływ promieniowania X na barwę siewek, zróżnicowane stężenie barwników i zmiany morfologiczne siewek kaktusów. Wykazał także zróżnicowanie genetyczne siewek badanych gatunków kaktusów przy pomocy markera SCoT i analizy UPGMA. Rozdział zamyka stwierdzenie, iż promieniowanie jonizujące może być wykorzystane w hodowli mutacyjnej w celu uzyskiwania nowych odmian kaktusów. W mojej opinii, wyprowadzone wnioski są w pełni uzasadnione i adekwatne do uzyskanych wyników.

Rozprawę zamykają streszczenia w języku polskim i angielskim zawierające główne informacje na temat zrealizowanego problemu badawczego.

Wartość przedstawionej do oceny dysertacji oceniam wysoko. Rozprawa doktorska obejmuje obszerny zakres badań w pełni oryginalny i nowatorski. Jest on opracowany i zaprezentowany w sposób usystematyzowany i przejrzysty. Rozprawa stanowi oryginalny wkład Autora w ciągle jeszcze nierozpoznany zakres hodowli mutacyjnej i w mojej opinii jest wynikiem realizowanej od lat pasji do hodowli kaktusów. Wyniki badań mogą mieć charakter aplikacyjny z uwagi na powstanie w wyniku zastosowania promieniowania X barwnych form kaktusów. Badania te stwarzają również szanse na zaproponowanie nowych strategii hodowli kaktusów przy wykorzystaniu technik *in vitro* i biologii molekularnej.

Z osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej, według mnie, na szczególne podkreślenie zasługuje:

- wskazanie dawek promieniowania X, które stymulują kiełkowanie nasion badanych gatunków kaktusów
- uzyskanie siewek o zróżnicowanych barwach badanych gatunków kaktusów
- potwierdzenie zróżnicowania genetycznego siewek badanych gatunków kaktusów
- wykazanie, że promieniowanie jonizujące może być wykorzystane w hodowli mutacyjnej w celu uzyskiwania nowych odmian kaktusów.

Uwagi i pytania

1. W pracy przedstawiono charakterystykę morfologiczną *Copiapoa tenuissima* Ritt. i *Uebelmannia pectinifera* Buining, dlaczego w opisie zabrakło takiej charakterystyki dla *Astrophytum* spp. 'Purple'? Czy wszystkie siewki przeznaczono do analiz biochemicznych bez określenia ich masy i długości?
2. Na jakiej podstawie dobrano dawki promieniowania X? Czy anomalie rozwojowe obserwowano tylko u dwóch siewek *Uebelmannia pectinifera* Buining poddanych promieniowaniu X w dawce 25 Gy?
3. W dysertacji brakuje informacji na temat dalszych etapów regeneracji roślin, co stało się z siewkami kaktusów, czy zostały zaaklimatyzowane do warunków naturalnych i prowadzone są dalsze prace hodowlane?
4. W rozdziale „Dyskusja” można było bardziej rozwinąć wątek dotyczący polimorfizmu i markerów molekularnych wykorzystywanych do ceny uzyskanych form roślin w hodowli mutacyjnej. Wiemy, iż odmiany roślin wyróżniają się swoistymi cechami, odrębnymi od innych, tak zwanymi markerami np. morfologicznymi, cytologicznymi, biochemicznymi czy genetycznymi. W związku z tym wykorzystując swoje doświadczenie w twórczej hodowli kaktusów, które z markerów uważa Pan za

najbardziej miarodajne oraz czy dysponując odpowiednim zapleczem badawczym i środkami opierałby Pan proces selekcji wyłącznie na markerach genetycznych?

5. W związku z tym, iż użyteczność markerów zależy m.in. od typu prowadzonych badań, czym obecnie kierowałby się Pan przy doborze najdogodniejszego markera genetycznego do swoich badań?
6. Przy publikowaniu wyników pracy proszę zwrócić uwagę na cytowania literatury oraz opracowanie statystyczne wyników. W opracowaniu wyników dotyczących dynamiki kiełkowania nasion brakuje analizy statystycznej, co uniemożliwia stwierdzenie istotnych różnic w kiełkowaniu nasion poddanych promieniowaniu X (Ryc. 27-29). Zarówno w metodyce jak i w wynikach brakuje informacji według jakiego testu statystycznego oceniano istotność różnic pomiędzy badanymi obiektami, a zaznaczone tymi samymi literami grupy jednorodnie wymagają weryfikacji, np. tabela 4, 6.

Wniosek końcowy

W oparciu o przeprowadzoną ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Licznarskiego pt. „Wpływ promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów” wykonanej na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, pod kierunkiem dr hab. Justyny Lemy-Rumińskiej, prof. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, stwierdzam, że praca stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo nowe aspekty naukowe. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Piotra Licznarskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Edyta Skunypelz