



Dr hab. Alina Trejgell, prof. UMK

Toruń, 1.08.2023

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. (56) 6112509, e-mail:trejgell@umk.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt: Wpływ promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów.

Autor: mgr inż. Piotr Licznerski

Promotor: dr hab. Justyna Lema-Rumińska, prof. UKW

Rodzina *Cactaceae* to niezwykle interesująca grupa roślin, zarówno pod względem ich biologii, a szczególnie przystosowania do skrajnie suchego środowiska, ale także z uwagi na walory dekoracyjne wielu gatunków. Znaczenie ekonomiczne tych roślin jest także niebagatelne, ponieważ produkcja kaktusów stanowi ważną gałąź produkcji ogrodniczej. To sprawia, że tematyka rozprawy doktorskiej jest interesująca nie tylko z powodu zastosowania biotechnologicznych metod uzyskiwania nowych odmian i ich rozmnażania, ale wpisuje się w potrzeby rynku, gdzie odmiany o nowych dotąd niespotykanych cechach są szczególnie pożądane przez hodowców i kolekcjonerów. Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania są nowatorskie, ponieważ promieniowanie jonizujące nie było do tej pory wykorzystywane w celu wywołania mutagenyzy u kaktusów z rodzaju *Astrophytum*, *Uebelmannia* oraz *Copiapoa* i wprowadzają nowy wątek do reprodukcji tej grupy roślin, wpisując się także w zapotrzebowania rynku.

Rozprawa doktorska to monografia licząca 136 stron o typowym układzie, na którą składają się: jednostronicowy wstęp, przegląd literatury liczący 51 stron, hipoteza badawcza, cel oraz zakres eksperymentów opisany na 1 stronie, materiały i metody przedstawione na 5 stronach, wyniki (30 stron), dyskusja (13 stron), podsumowanie i wnioski ujęte na 3 stronach oraz spis literatury (24 strony). Napisana została w języku polskim oraz



uzupełniona streszczeniem w języku angielskim. Jej opracowanie, sposób prezentacji oraz analiza wyników zostały zrealizowane przez doktoranta w sposób prawidłowy.

Część pierwsza (teoretyczna) obejmuje zagadnienia z zakresu morfologii kaktusów oraz hodowli roślin zarówno metodami tradycyjnych (hybrydyzacja i selekcja), jak i możliwości wykorzystania nowoczesnych narzędzi jakimi są transgeneza i mutageneza. Szczególnie obszerna jest część dotycząca mutagenezy, rodzajów i możliwych konsekwencji mutacji, co jest zrozumiałe z uwagi na tematykę dysertacji. Kolejny wątek opisany w części teoretycznej dotyczy regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. W tej części przeglądu literatury, omówione zostały zagadnienia dotyczące regeneracji z pojedynczej komórki, co jest niezwykle istotne w kontekście mutagenezy i odtworzenia całego osobnika z komórki, w której nastąpiła zmiana materiału genetycznego. Omówiona została zarówno droga regeneracji poprzez organogenezę jak i somatyczną embriogenezę. Kolejny rozdział to fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne, gdzie opisano bezpośrednie, jak i pośrednie skutki oddziaływania różnego typu promieniowania, a także chemicznych czynniki alkilujące komórkę roślinną i jej materiał genetyczny. W tej części scharakteryzowano strukturę chemiczną, lokalizację subkomórkową oraz funkcję różnych typów barwników występujących w roślinach. Jednak ten opis umieszczono w pracy jako podrozdział do czynników mutacyjnych, powinien być on oddzielnym rozdziałem. W kolejnym rozdziale wstępu doktorant przedstawia możliwości zmiany barwy u roślin, opisane zostały szlaki metaboliczne flawonoidów oraz karotenoidów. W tym rozdziale zostały zamieszczone podpunkty dotyczące wykrywania mutacji na poziomie genetycznym i biochemicznym. Niewątpliwie nastąpiła pomyłka i te treści powinno być zamieszczone bezpośrednio po opisie mutacji. Traktuję to jako błąd edytorski.

Uwagi merytoryczne do tej części pracy:

W części dotyczącej charakterystyki rodziny *Cactaceae* w opisie kwiatu u *Astrophytum* znalazło się określenie owalne i mięsiste co raczej dotyczy owocu. Dookreślenie krzyżowania międzygatunkowego jako wewnątrzgatunkowego to niewątpliwie pomyłka powinno być wewnątrzrodzajowego. Podczas wymieniania sposobów omięcia naturalnych barier



niezgodności jako jedną z nich doktorant wymienia hybrydyzację somatyczną czyli fuzję protoplastów, ale także łączenie fragmentów komórek, to wymaga doprecyzowania. **Proszę podczas obrony o rozwinięcie tego wątku.** Kolejne nieprecyzyjne określenie pojawiające się we wstępie to merystem kątowy, takiego określenia nie ma. Autorowi zapewne chodziło o merystem apikalny, ale zlokalizowany w pąku pachwinowym, czyli kątowym. Trudno mi się zgodzić także z nazwaniem warstwy L1 w merystemie apikalnym naskórkiem to praskórka lub protoderma. Błędnie został także podany czynnik fizyczny wykorzystywany podczas bezwektorowej transformacji. Elekroporacja to metoda, a nie czynnik. **Czy doktorant mógłby podać w jaki sposób podczas tej metody generowane są pory w błonie komórkowej umożliwiające transfer T-DNA?** W rozdziale Rodzaje mutacji charakterystyka inwersji jest nieprecyzyjna. Proszę o doprecyzowanie **na czym polega inwersja i jakie niesie za sobą konsekwencje?** W rozdziale dotyczącym regeneracji z pojedynczej komórki także wkraść się błąd, komórki zróżnicowane to tkanki stałe i nie mają zdolności do podziałów, natomiast merystemy wtórne powstają w wyniku ich odróżnicowania. W części dotyczącej somatycznej embriogenezy błędnie użyto określenia wtórna SE, jako pośrednia SE. **Proszę o zdefiniowanie obu procesów.** Zdanie „Chlorofile stanowią część składową białka roślinnego, który tworzy chloroplasty” to zbyt duży skrót myślowy, bo co prawda chlorofil wchodzi w skład większych kompleksów barwnikowo-białkowych (fotosystemów) jednak to nie jedyny element budujący chloroplasty. Mam także wątpliwości co do określenia barwy jaką nadaje likopen owocom, wg mnie pomarańczowo-czerwona, a nie różowo-czerwona jak podano w rozprawie doktorskiej.

Hipoteza badawcza zakładała, że promieniowanie X wpływa na kiełkowanie nasion, zmiany na poziomie morfologicznym, biochemicznym (zawartości barwników) i na poziomie molekularnym u wybranych gatunków z rodziny *Cactaceae*. Cel pracy przedstawiono podając cel nadrzędny, a następnie uszczegółowiono go w postaci powiązanych w spójną całość celów cząstkowych. Zaplanowany ciąg eksperymentów miał prowadzić do kompleksowej oceny zmian osobników u wybranych gatunku kaktusów.

W rozdziale Materiały i metody precyzyjnie opisano procedurę sterylizacji nasion oraz warunki prowadzenia kultury, analizy biochemiczne dotyczące oceny barwników,



izolację DNA z siewek oraz analizę SCoT. Na podkreślenie zasługuje fakt, że do badań użyto aż 2,5 tys. nasion z każdego gatunku, uzyskując łącznie ponad 4300 siewek do dalszych badań. **W tym miejscu nasuwa się pytanie czy gdyby podzielono materiał wyjściowego na 2 niezależne eksperymenty to uzyskane osobniki miałyby podobne fenotypy w każdym z nich? Jaka jest opinia doktoranta na ten temat.**

Zasadniczą częścią rozprawy jest opis i analiza uzyskanych wyników oraz dyskusja. Wyniki przedstawiono w formie 13 rycin, 11 tabel oraz 4 plansz ze zdjęciami. Opis wyników jest bardzo precyzyjny i dobrze koreluje z danymi zamieszczonymi w tabelach i na wykresach. Wyniki dynamiki kiełkowania wskazują, że promieniowanie X ma różny wpływ w zależności od gatunku i tak w przypadku *Astrophytum* początkowo nasiona napromieniowane dawką 15 i 20 Gy kiełkowały szybciej, jednak w efekcie końcowym to z nasiona kontrolnych uzyskano więcej siewek. Natomiast w przypadku 2 pozostałych gatunków wyższy odsetek siewek uzyskano z nasion napromieniowanych dawkami 25 i 50 Gy dla *Copiapoa tenuissima* oraz 15 i 20 Gy w przypadku *Uebelmannia pectinifera*. W dyskusji podanych jest szereg przykładów hamującego wpływu promieniowania X u innych gatunków oraz przyczyn takiego oddziaływania. **Proszę podczas obrony o przedstawienie swoich przemyśleń na temat przypuszczalnych przyczyn stymulacji tego procesu po zastosowaniu promieniowania.**

Ocena barwy siewek została wykonana wg katalogu barw RHSCC i poparta analizą stężenia barwników roślinnych tj. antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a i b. Doktorant stwierdził, że wzrost dawki promieniowania przyczynia się do pojawienia się siewek pozbawionych chlorofilu, co skutkuje pojawieniem się nie tylko osobników kremowo-białych, ale ujawnia czerwone zabarwienie u *Astrophytum* (nie obserwowane w kontroli). Jednak brak wykonania analiz biochemicznych dla tych siewek uniemożliwiło ocenę czy doszło do wzrostu stężenia karotenoidów, co byłoby w moim odczuciu bardzo interesujące. Szkoda, że nie posłużono się zmodyfikowaną metodą Lichtenthalera (Nair and Chung, 2015), która pozwala na 5-krotne zmniejszenie masy próbki do analiz w porównaniu do zastosowanych w pracy. Na uwagę zwraca także fakt, że w siewkach barwy brunatnej stwierdzono wyższe stężenie chlorofilu i karotenoidów po napromieniowaniu nasion dawką 15 Gy. **Czym można to wytłumaczyć?** Podczas analizowania cech morfologicznych siewek uzyskanych z nasion poddanych



promieniowaniu jedynie w przypadku siewek *Copiapoa* stwierdzono istotny wzrost świeżej masy, długości pędu i korzenia po napromieniowaniu nasion dawką 25 Gy. Wynika to najprawdopodobniej ze zwiększonej zawartości wody w tkankach (choć brak analizy suchej masy uniemożliwia pełne wnioski), **czy doktorant mógłby podać przypuszczalne przyczyny wzrostu pobierania wody przez te siewki.** W przypadku charakterystyki morfologicznej siewek *Astrophytum* zamieszczono w pracy jedynie ocenę zabarwienia, brakuje danych dotyczących wielkości siewek. **Czy zostały wykonane?** Wyniki zawartości barwników jak i cech morfologicznych powinny być podane wraz z odchyleniem standardowym, co pozwoliłoby ocenić zróżnicowanie w obrębie grup o tej samej barwie. Analiza statystyczna wymaga weryfikacji, szczególnie wyników zawartych w Tab. 4 dla karotenoidów i chlorofilu a oraz w Tab. 9 dla długości korzenia.

Bardzo istotnym elementem przeprowadzonych badań jest analiza molekularna. Przy pomocy markerów SCoT, doktorant stwierdził bardzo wysoki poziom polimorfizmu, a analiza skupień pozwoliła ustalić duży dystans genetyczny pomiędzy uzyskanymi genotypami. To pozwoliło na postawienie przez doktoranta wniosku, że promieniowanie jonizujące może być wykorzystane w hodowli radiomutacyjnej do uzyskiwania nowych odmian kaktusów. W przedłożonej rozprawie doktorskiej brak jednak informacji **czy prowadzono dalszą hodowlę uzyskanych osobników, szczególnie interesujące wydaje się jak rozwijały się siewki pozbawione chlorofilu, czy ich hodowla ograniczyła się jedynie do kultury *in vitro*, czy dokonano próby aklimatyzacji i szczepienia takich osobników na podkładki?**

W rozdziale Dyskusja uzyskane wyniki doktorant skonfrontował z danymi opublikowanymi przez innych badaczy dotyczących wpływu promieniowania jonizującego dla różnych gatunków należących do rodziny *Cactaceae* jak i innych.

Dobór literatury uważam za bardzo dobry, w przygotowaniu wstępu i dyskusji wyników wykorzystano aż 310 pozycji literatury i 2 netografie. Jednak odnotowałam kilkanaście błędnie cytowanych pozycji literatury, dotyczy to zarówno braków pozycji w spisie, a cytowanych w tekście i odwrotnie.

Na koniec uwaga edytorska, dotycząca ryc. 4, brakuje wyjaśnienia do nr 5 umieszczonego na schemacie. Zauważyłam także kilka błędów stylistycznych i gramatycznych np. określenie ilość gatunków, powinno być liczba gatunków, ciężko jest



wizualnie odróżnić, zamiast trudno odróżnić, czy stałe zmiany w odniesieniu do mutacji a powinno być trwałe, a markery SCoT mają wiele zastosowań, a nie zainteresowań.

Podsumowanie

Recenzowaną rozprawę doktorską pod kątem merytorycznym oceniam pozytywnie. Uwagi, które nasunęły mi się podczas analizy pracy, nie umniejszają wartości zaprezentowanych wyników. Doktorant wykazał się dobrą znajomością literatury oraz bogatym warsztatem badawczym (techniki *in vitro*, analizy biochemiczne i molekularne). W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska pana mgr inż. Piotra Licznarskiego spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Artykule 14 rozdz. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) oraz Art. 179.2. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku Rozdział 1. Szczegółowy tryb przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim. Wniosuję do Rady Naukowej Politechniki Bydgoskiej Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii o przyjęcie dysertacji i dopuszczenie pana mgr inż. Piotra Licznarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

A. Tejgall