

Prof. dr hab. Bożena Pawłowska
Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

Kraków, 31.08.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
M. Eng. Bairam Solomon Ismael
pt. STUDIES ON *Carex muskingumensis* Schwein. MICROPROPAGATION AND
RESPONSE TO DROUGHT AND SALINITY STRESS IN TISSUE CULTURES

BADANIA NAD MIKROROZMNAŻANIEM *Carex muskingumensis* Schwein. ORAZ
REAKCJA NA STRES SUSZY I ZASOLENIA W KULTURACH TKANKOWYCH

Charakterystyka formalna rozprawy

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kozak w Zakładzie Roślin Ozdobnych i Dendrologii Instytutu Produkcji Ogrodniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Promotorem pomocniczym była dr inż. Marzena Parzymies. Rozprawa wpisuje się w nurt badawczy Jednostki, gdzie prowadzone są badania nad rozmnażania roślin ozdobnych, m. in. z zastosowaniem technik in vitro.

Rozprawa jest oryginalnym opracowaniem, napisana została w języku angielskim. Liczy 180 stron, ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, utrzymany we właściwym porządku. Praca składa się z dziesięciu rozdziałów, trzy z nich: LITERATURE REVIEW, MATERIALS AND METHODS oraz RESULTS są podzielone na podrozdziały. Proporcje ilościowe pomiędzy rozdziałami dedykowanymi przeglądowi literatury (43 strony), celowi pracy (niecała strona), metodyce (19 stron), wynikom (43 strony) i dyskusji (15 stron) są prawidłowe. W tekst wkomponowano 35 tabel i 42 ryciny, przedstawione czytelnie i właściwie, a ich spis zamieszczono jako dodatek w dwóch ostatnich rozdziałach dysertacji. Pracę podsumowuje 10 wniosków. Na bardzo obszerne zestawienie cytowanej literatury składają się 533 pozycje bibliograficzne i 8 źródeł internetowych. Ponad połowa z nich, to prace najnowsze opublikowane w ostatniej dekadzie, publikacje z poprzedniego stulecia stanowią zaledwie 17%, a ich cytowanie ma uzasadnienie. Na początku rozprawy doktorskiej załączone są streszczenia pracy w języku angielskim i polskim.

Tematyka i znaczenie naukowe przeprowadzonych badań

Przedmiotem pracy doktorskiej jest *Carex muskingumensis*, turzyca muskegońska, zwana też turzycą palmową ze względu na charakterystyczny pokrój rośliny i układ liści na pędach. Turzyca ta charakteryzuje się silnym wzrostem, ale nie jest nadmiernie ekspansywna, nie "wędruje" na rabacie jak wydmuchrzyca czy mozga. Gatunek ma ładny żywo- i jasnozielony kolor liści, zwłaszcza na stanowiskach słonecznych. Jesienią liście brązowieją. Wytwarza niepozorne kwiatostany, nie są one spektakularnie dekoracyjne, ale podkreślają charakter naturalny, co jest obecnie modne w sztuce ogrodowej. Duże zainteresowanie tym gatunkiem sprawiło, że chociaż wykorzystywana jest w ogrodach od niedawna, doczekała się kilku odmian. Uważna jest za turzycę szczególnie cenną do terenów zieleni, nie jest wymagająca, znosi okresy bezdeszczowej pogody, dobrze rośnie także w półcieniu i prawie zawsze wygrywa konkurencję z chwastami. To cenny gatunek do dużych kompozycji, stanowiący neutralne i naturalne tło dla innych roślin, wykorzystywany też na kwiaty i zieleń ciętą we florystyce. Nie jest zimozielona, ale

oszronione suche pędy pozostawione na zimę, stanowią atrakcyjny akcent i w tej porze roku. Wszystkie te cechy sprawiają, że roślina posiada duży potencjał do szerokiego stosowania w ogrodach i publicznych terenach zieleni.

Gatunek może być rozmnażany generatywnie. W przypadku odmian możliwe jest tylko mnożenie wegetatywne, najczęściej przez podział roślin matecznych, który charakteryzuje się niskim współczynnikiem rozmnażania. Kultury *in vitro* są szansą na popularyzację turzycy muskegońskiej i jej odmian, ale rozwinięciu efektywnego systemu mnożenia nie poświęcono dotychczas zbyt wiele uwagi. Mikrorozmnażanie *Carex* przysparza wciąż trudności na wszystkich etapach rozmnażania klonalnego. Dodatkowo wprowadzenie gatunku do kultury *in vitro* pozwoli na zrealizowanie badań, które przyczyną się do wzbogacenia wiedzy na temat mechanizmów związanych ze stresem, np. suszy i zasolenia, co w przypadku roślin rekomendowanych do nasadzeń w miastach ma niemałe znaczenie. Z tych względów uważam wybór tematu pracy za interesujący i poznawczo ważny.

Ocena merytoryczna rozprawy

Po krótkim **wstępie** wprowadzającym w temat rozprawy został przedstawiony **cel podjętych badań**. Wyłania się hipoteza badawcza, która zakłada, że kultury *in vitro* będą wydajną metodą rozmnażania turzycy palmowej, a technika *in vitro* przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw tolerancji roślin na stres suszy i zasolenia. Za cele rozprawy Doktorant przyjął: ustalenie skutecznego protokołu dezynfekcji powierzchniowej i wytypowanie eksplantatu do stabilizacji kultury *in vitro*, opracowanie optymalnego składu regulatorów wzrostu w pożywkach dla każdego z trzech etapów rozmnażania klonalnego, ocenę aklimatyzacji ukorzenionych pędów. Ponadto badał reakcję pędów turzycy na stres suszy wywołany glikolem polietylenowym i na stres zasolenia indukowany chlorkiem sodu oraz analizował ekspresję genów biorących udział w odpowiedzi roślin na te stresy.

Przegląd literatury, przygotowany na podstawie bogatej literatury, zawarty na 43 stronach, został przedstawiony w czterech grupach tematycznych. Odnosi się kolejno do charakterystyki obiektu badawczego, mikrorozmnażania, odpowiedzi roślin na stres w warunkach *in vitro*, w ostatniej części dotyczy ekspresji genów. W mojej ocenie, zaprezentowana wiedza jest związana z podjętymi badaniami, dotyka wszystkich aspektów pracy i wystarcza do podjęcia zaplanowanych eksperymentów.

Nasuwa mi się w tym miejscu kilka pytań, chciałabym prosić Doktoranta o ustosunkowanie się do nich.

- *Wiele publikacji, które Pan przywołuje dotyczy, jak najbardziej słusznie, gatunków z rodziny Poaceae. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego trawy, sity i turzyce zaliczane są przez ogrodników i kompozytorów zieleni dla jednej grupy użytkowej, tzw. „traw rabatowych”. Co różni rośliny z tych rodzin botanicznych, jakie mają cechy wspólne? Gdzie w tej grupie znajduje się miejsce dla bambusów, o których także wspomina Pan w przeglądzie literatury?*
- *Zazwyczaj łatwiej zainicjować kulturę *in vitro* z eksplantatów, które zawierają tkankę merystematyczną. Czy mógłby Pan scharakteryzować merystem wstawowy (interkalarny) i wyjaśnić jego rolę w tym etapie rozmnażania klonalnego, biorąc pod uwagę rośliny z rodzin botanicznych, wspomnianych w przeglądzie literatury.*
- *Podczas eksperymentowania *in vitro* nad stresem suszy używany jest glikol polietylenowy (PEG). Czy zetknął się Pan z zastosowaniem tej substancji podczas krioprezerwacji tkanek roślinnych, która jest najnowszą metodą ochrony biologicznej różnorodności? Kiedy jest używana i jak działa?*

W rozdziale **materiały i metody** wskazano szczegółowo miejsca prowadzenia badań: w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie, w latach 2016-2020. Eksperymenty wykonano w Instytucie Produkcji Ogrodniczej (w Zespole Roślin Ozdobnych i Dendrologii), a badania analityczne przeprowadzono w Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin oraz w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin. Materiał roślinny do inicjacji kultury in vitro był przechowywany w Gospodarstwie Doświadczalnym UP w Felinie, pochodził z Gospodarstwa „U Rysia” z Ksawerowa. W rozdziale tym jasno przedstawiono zakres i sposób wykonania eksperymentów. Doktorant opisał wykorzystane w pracy metody zakładania kultur (rodzaj eksplantatu wyjściowego, sposoby dezynfekcji powierzchniowej, warunki utrzymywania kultury i jej stabilizacji), wyjaśniają te pracochłonne działania bardzo przejrzyste schematy. Dalej opisano doświadczenia nad wpływem cytokinin na wzrost i rozwój turzycy podczas namnażania pędów i ich ukorzeniania, a także przedstawiono warunki aklimatyzacji. Na zakończenie każdego doświadczenia scharakteryzowano parametry biometryczne, które poddawano analizom. Zawsze zaplanowana była próba kontrolna, a liczba powtórzeń i obiektów w powtórzeniach była wystarczająca do przeprowadzenia analiz statystycznych. Dalsza część metodyki skupia się na przedstawieniu doświadczeń nad stresem suszy wywołanych dodatkiem do pożywki PEG oraz nad stresem zasolenia indukowanym NaCl. Prócz obserwacji biometrycznych przeprowadzono w tych eksperymentach analizy fizjologiczno-biochemiczne materiału roślinnego, tj. poziom H_2O_2 , peroksydacji lipidów membran komórkowych, oznaczono aktywność peroksydaz: askorbinianowej (APX) i glutationowej (GPX) oraz katalazy (CAT), a także poziom barwników fotosyntetycznych. W ostatniej części metodyki opisano szczegółowo procedury badań nad ekspresją genów kodujących główne enzymy antyoksydacyjne: APX, CAT i GPX.

Etap inicjacji kultur to rozbudowana część pracy, ze względu na poszukiwanie skutecznego sposobu dezynfekcji powierzchniowej i zastosowanych czterech rodzajów eksplantatów. Proszę doktoranta o przypomnienie jaka była łączna liczba eksplantatów wyjściowych.

Czy z pokazanych na zdjęciach 13 B-E fragmentów roślin matecznych pobieranych do dezynfekcji powierzchniowej, były izolowane tkanki, przed wyłożeniem na pożywkę, czy wykładano całe zdezynfekowane fragmenty?

Proszę też o wyjaśnienie jakie były przesłanki do wyboru pożywki do stabilizacji kultur pędowych, na której były one namnażane do dalszych doświadczeń, pomiędzy etapem inicjacji, a namnażania pędów.

Wyniki otrzymane w pracy są opisane z dużą dokładnością i starannością. Tabele i wykresy są czytelne, a fotografie dobrej jakości, gdzie potrzeba opatrzone podziałką. W pierwszym etapie badań mgr inż. Bairam Solomon Ismael zajmował się ustabilizowaniem kultur in vitro turzycy palmowej, co było zadaniem niełatwym. Do zainicjowania kultury nieprzydatne okazały się części kwiatostanów, które się nie odkaziły. Analiza otrzymanych wyników dotycząca pozostałych eksplantatów wyjściowych pokazała, że najlepiej do dezynfekcji powierzchniowej zastosować w 0,25% roztwór $AgNO_3$ przez 15-20 minut, co pozwala na otrzymanie średniej skuteczności na poziomie 50%. Korzystnie działał też dodatek do pożywki cząstek nanosrebra, które znacząco zwiększyło liczbę eksplantatów wolnych od zanieczyszczeń. Spośród eksplantatów wegetatywnych najskuteczniej zdezynfekowano eksplantaty węzłowe (prawie 80%), a najslabiej pąki pobierane z podstawy pędu (niecałe 20%). Traktowanie roślin donorowych preparatem grzybobójczym Amistar poprawiało skuteczność odkażania powierzchniowego. Najlepsze wyniki dezynfekcji powierzchniowej nie były tożsame z potencjałem regeneracyjnym

eksplantatów. Najlepiej regenerowały wierzchołki wzrostu pędów, które dezynfekowano 0,1% chlorkiem rtęci lub AgNO_3 przez 20 minut, gdy w pożywce były nanosrebro (regeneracja na poziomie ok. 30-37%). Wzbogacenie pożywki węglem aktywnym hamowała regenerację eksplantatów.

Kolejny rozdział prezentacji wyników poświęcono przedstawieniu rezultatów doświadczeń nad namnażaniem pędów, analizując % regenerujących, liczbę nowopowstałych pędów (czyli wydajność namnażania pędów) i ich wysokość, liczbę liści, wysokość pędu głównego oraz jego masę, wysokość nowopowstałych pędów i ich masę oraz liczbę liści. W pierwszym doświadczeniu, badano odpowiedź pędów na działanie trzech cytokinin (BA, kinetyka lub 2iP), każdej w 4 stężeniach, plus kontrola bez PGR. Wykazano, że obecność cytokininy w pożywce jest niezbędna do namnażania pędów turzycy palmowej. U podstawy wszystkich wyłożonych pędów wyrastały nowe pędy, z największą wydajnością na pożywkach z BA i kinetyką, gdy stężenie tych cytokinin wynosiło od 2,5 do 5 mg dm^{-3} . BA w pożywce hamowała wydłużanie pędów, szczególnie stosowana w wyższych stężeniach, ale rozwinięte pędy miały najwięcej liści, a także największą świeżą masę. Podczas tego eksperymentu zaobserwowano formowanie korzeni przybyszowych, najintensywniej na pożywkach wzbogaconych w kinetynę lub 2iP w stężeniu 2,5 do 5 mg dm^{-3} . Pędy na pożywkach zawierających BA nie formowały korzeni przybyszowych.

W kolejnym doświadczeniu badano namnażanie pędów turzycy, w pożywkach z BA lub kinetyką (1; 2,5 lub 5 mg dm^{-3}), wzbogaconych w auksynę w stężeniu 10-ci krotnie mniejszym (odpowiednio IBA lub IAA). Największą wydajność otrzymano na pożywce zawierającej 2,5 mg dm^{-3} kinetyny i 0,25 mg dm^{-3} IAA. Jednocześnie na tej pożywce powstawało najwięcej korzeni przybyszowych u podstawy pędów, było one najdłuższe. Na pożywkach z BA, podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, ryzogenezy nie obserwowano.

Proszę Doktoranta o wyjaśnienie, czy formowanie korzeni przybyszowych podczas namnażanie pędów, na pożywkach cytokininowych w jest zjawiskiem pożądanym, czy nie odbywa się ono kosztem efektywności namnażania?

Obserwacja ukorzenia pędów wyłożonych na pożywki z auksynami IBA lub IAA w stężeniach 0 - 5 mg dm^{-3} wykazała prawie 100% ukorzenionych pędów (z wyjątkiem pożywek z 5 mg dm^{-3} IBA i 1 mg dm^{-3} IAA (73 i 94% ukorzenionych). Najwięcej korzeni przybyszowych formowało się na pożywkach wzbogaconych w IBA. Podczas ukorzenia obserwowano też namnażanie pędów, na niższym poziomie, niż miało to miejsce na pożywkach cytokininowych, przy czym IAA stymulowała wydłużanie pędów i formowanie liści oraz namnażanie pędów, z wyjątkiem z najwyższego stężenia.

Podczas aklimatyzacji badano następczy wpływ pożywki ukorzeniającej na skuteczność tego procesu. Z przedstawionych danych wynika, że wszystkie ukorzenione pędy zaadaptowały się do warunków *ex vitro*, a pożywka ukorzeniająca nie miała wpływu na większość badanych cech, z wyjątkiem długości korzeni, które była stymulowana obecnością IAA w pożywce.

Druga część prezentacji wyników odnosi się do pokazania wpływu warunków stresowych na rozwój pędów turzycy w kulturach *in vitro*. Odpowiedź morfogenetyczna przedstawiona jest w identycznym układzie jak wcześniejsze wyniki. Starannie przygotowane tabele oraz tablice ze zdjęciami dokumentują wpływ stresu suszy i zasolenia na badane parametry morfometryczne. Glikol polietylenowy dodany do pożywek hamował rozwój pędów bocznych u 5-12% eksplantatów i zawsze zmniejszał liczbę nowopowstałych pędów. W najniższym stężeniu (0,5%) stymulował ryzogenezę: wszystkie pędy formowały korzenie,

było ich najwięcej i były najdłuższe, w porównaniu do pozostałych kombinacji, gdzie także ten proces był obserwowany, ale z mniejszą intensywnością

Rycina 23 ilustruje regenerację pędów we wszystkich stężeniach PEG, i wizualnie sugeruje, że ze wzrostem stężenia PEG obniża się ich jakość mierzona parametrami morfologicznymi. Nie znajduje to potwierdzenia w wynikach liczbowych przedstawionych w tabelach (np. wysokość pędów). Prawdopodobnie materiał do zdjęć został wybrany subiektywnie, podczas przygotowywania materiałów do druku sugeruję wybrać inną rycinę.

Identyczne analizy zostały przeprowadzone dla doświadczenia nad wpływem zasolenia pożywki na proliferację pędów. Reakcja roślin jest zilustrowana na rycinie 24. Rozwój pędów zanotowano tylko przy stężeniach NaCl 0,5 i 1%, jednocześnie rośliny na tych pożywkach miały więcej liści oraz wyższą masę pędu głównego, w porównaniu do kontroli. W analizach nowopowstałych pędów taką reakcję dawało tylko 0,5% NaCl. W niższych stężeniach chlorku sodu obserwowano formowanie korzeni.

Zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach oraz nagromadzenie nadtlenu wodoru wskazują, że roślina jest pod wpływem stresu. W prezentowanych eksperymentach zaobserwowano zmiany aktywności enzymów stresu oksydacyjnego u roślin namnażanych na pożywkach zawierających glikol polietylenowy. Powodował on zwiększenie zawartości nadtlenu wodoru w liściach, zwiększał aktywność GPX, obniżał aktywność APX, natomiast nie zmieniał aktywności katalazy. W przypadku działania soli NaCl dodawanej do pożywek nie stwierdzono jej wpływu na poziom H_2O_2 , aktywność APX, natomiast ze wzrostem stężenia NaCl zwiększała się aktywność CAT, a zmniejszała aktywność GPX.

Wyższa zawartość chlorofilu i karotenoidu wiąże się zazwyczaj z wyższą tolerancją roślin na stres. W prezentowanych badaniach obserwowano, że dodany do pożywek PEG wpływał na obniżenie poziomu chlorofilu *a* oraz karotenoidów w liściach, podobnie na pożywkach z NaCl obserwowano zmniejszony poziom karotenoidów i chlorofilu *a*, co miało miejsce przy stężeniach NaCl 1% i wyższych.

Ostatnia część prezentacji wyników dotyczy badań nad ekspresją genów kodujących główne enzymy antyoksydacyjne. Pomimo tego, że *Carex* jest jednym z najliczniejszych rodzajów w rodzinie Cyperaceae, obecna wiedza na temat jego transkryptomu ogranicza się do kilku badań. W pracy wybrano 9 genów referencyjnych, a ich stabilność zbadano za pomocą dwóch różnych algorytmów - NormFinder i genom, co pozwoliło na wybranie do badań 3 najbardziej stabilnych genów TBP, ADP oraz eIF4A. Po przeprowadzeniu analizy ekspresji genów kodujących katalazę (CAT), peroksydazę glutationową (GPX) i peroksydazę askorbinianową (APX), zaobserwowano indukcję ekspresji genu GPX jako reakcję na stres suszy. Traktowanie roślin PEG nie spowodowało istotnych zmian na poziomie transkryptów genów APX i CAT, a traktowanie roślin NaCl zahamowało ekspresję genów CAT lub GPX.

W rozdziale **Dyskusja**, na 15 stronach Doktorant konfrontuje wszystkie otrzymane wyniki odwołując się do rezultatów uzyskanych przez innych naukowców i opublikowanych w prawie 160 pracach naukowych. Interpretacja wyników jest prawidłowa, wszystkie są skrupulatnie omówione i odniesione do literatury. Dyskusja jest napisana w dobrym stylu, zrozumiałym językiem.

Na koniec rozprawy doktorskiej Autor przedstawił 10 **Wniosków**, które wypływają z kolejnych etapów badań.

Drobne literówki czy niedociągnięcia edytorskie, które zdarzają się w pracy rzadko, nie mają wpływu na jej wartość merytoryczną. Warto jedynie, podczas przygotowywania materiałów do publikacji ujednolicić stężenia regulatorów wzrostu (przeliczyć μM na mg dm^{-3}), wówczas porównania staną się bardziej realne.

Na koniec chciałabym prosić Doktoranta, aby podczas publicznej obrony zaproponował konkretną procedurę rozmnażania klonalnego turzycy palmowej - do wykorzystania w laboratoriach komercyjnych - od inicjacji kultury do otrzymania zaaklimatyzowanej „mikrosadzonki” i odniósł się do praktycznego aspektu badań stresu suszy i zasolenia.

Podsumowując, uważam, że ważnym osiągnięciem przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jest opracowanie efektywnej metody mikrorozmnażania *Carex muskingumensis*, wskazanie najlepszych warunków zewnętrznych do inicjacji kultury, namnażania i ukorzenia pędów oraz aklimatyzacji. Jest to cenne osiągnięcie, które będzie wykorzystane w popularyzacji tego gatunku i jego odmian. Na podkreślenie zasługuje też zdobyta wiedza dotycząca reakcji turzycy palmowej na stres suszy i zasolenia, która została znacząco poszerzona, dzięki wykonanym badaniom.

W mojej opinii, przedstawione przez M. Eng. Bairam Solomon Ismael wyniki badań oraz dokumentacja naukowa są wartościowe, a postawiony w pracy cel został zrealizowany. Doktorant wykazał się doskonałym przygotowaniem teoretycznym, a także wieloma umiejętnościami prowadzenia analiz fizjologiczno-biochemicznych i badań genetycznych.

Wniosek końcowy

Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej mgr inż. Bairam Solomon Ismael stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789). W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Autora pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzących do nadania stopnia doktora nauk rolniczych.

