

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Poniewozik
pt. Rozmnażanie *Paphiopedilum insigne* (Wall. ex Lind.) Pfitzer w kulturach in vitro,

wykonanej w Zakładzie Roślin Ozdobnych i Dendrologii Instytutu Produkcji Ogrodniczej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem naukowym dr hab. Pawła Szota
oraz promotora pomocniczego dr inż. Marzeny Parzymies

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną jest pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, prof. dr hab. Barbary Kołodziej, z dnia 29 października 2021 roku, z prośbą o wykonanie recenzji rozprawy i stwierdzenie czy odpowiada ona wymogom stawianym rozprawom doktorskim (ustawa z dnia 14.03.2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Poniewozik składa się z 4 spójnych tematycznie, anglojęzycznych publikacji, które ukazały się w latach 2020 i 2021, w czasopiśmie notowanych w bazie JCR. Dwie z nich opublikowano w Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, jedna została przyjęta do druku w Horticultural Science, czwartą opublikowano w czasopiśmie mdpi Plants. Sumaryczny współczynnik Impact Factor za przedstawione prace wynosi 6,114, a łączna liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na dzień opublikowania prac kształtuje się na poziomie 280. Artykuły stanowiące rozprawę są 3-4 autorskie, a udział Doktorantki w ich powstaniu wynosi 55-60% i jest potwierdzony deklaracjami współautorów, które przygotowano oddzielnie dla każdej pracy. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, uczestniczyła we wszystkich etapach ich powstawania, od opracowania koncepcji i hipotezy badawczej, poprzez prowadzenie doświadczeń i obserwacji oraz analiz chemicznych, po opracowanie wyników i tworzenie manuskryptu. Zatem Jej znaczący udział w przedstawionych pracach nie budzi zastrzeżeń.

Obok kopii opublikowanych artykułów do niniejszego opracowania dołączono dwustronicowe streszczenie pracy (w języku polskim i angielskim) oraz zamieszczony na 38 stronach opis badań. Obejmuje on następujące rozdziały: wprowadzenie, cel badań, materiał i metody, wyniki wraz z dyskusją oraz wnioski, a na koniec spis literatury. Jest poprowadzony właściwie i napisany jasnym, zwięzłym językiem. Odwołuje się do wyników badań opublikowanych w czterech pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, stanowiąc przejrzystą i zrozumiałą całość.

Na zakończenie opracowania Doktorantka przedstawia własny dorobek naukowy, poza rozprawą doktorską, tj. współautorstwo w 2 pracach z 2019 roku zamieszczonych w Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, oraz w 4 artykułach naukowych w czasopiśmie wymienianych w części B wykazu MNiSW (w latach 2015-2020), a także w 9 rozdziałach w monografiach (w 4 jest samodzielnym autorem). Znajduje się w tej części spis 16 konferencji (w tym jedna zagraniczna), na których Doktorantka prezentowała wyniki badań w latach 2015-2019. W grudniu 2015 roku złożyła do NCN projekt badawczy w ramach konkursu Preludium 10, który nie uzyskał finansowania.

Przedstawione dane wskazują, że mgr Monika Poniewozik jest obiecującym młodym naukowcem, który chętnie publikuje i prezentuje wyniki badań na konferencjach. Łącznie liczba zgromadzonych punktów MNiSW (wraz z cyklem publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej) wynosi 403, a IF 7,16.

W ostatniej części przedstawionego opracowania Doktorantka wykazuje swoje zaangażowanie w popularyzację nauki (artykuły popularnonaukowe, wykłady), w działalność dydaktyczną (prowadziła 11 przedmiotów dla studentów Ogrodnictwa, Zielaństwa i Terapii Roślinnych, Architektury Krajobrazu) oraz w działalność organizacyjną i promocję Uczelni.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedmiot badań i jego znaczenie

Paphiopedilum insigne (Wall. ex Lind.) Pfitzer jest storczykiem rosnącym na stanowiskach naturalnych w Indiach, ze względu na wyjątkową dekoracyjność kwiatów i sposób wzrostu może być wykorzystany w ogrodnictwie ozdobnym na całym świecie. Najlepiej sprawdzi się jako roślina doniczkowa charakteryzująca się bardzo długim zimowym kwitnieniem trwającym nawet 3 miesiące. Oryginalne duże kwiaty z labellum w kształcie sabotka, o trwałości do 2 miesięcy, pretendują też ten gatunek do uprawy na kwiat cięty. W ostatnich latach pośród roślin kwitnących uprawianych w pojemnikach do zastosowania we wnętrzach, bardzo popularne są storczyki. Ale *Paphiopedilum insigne* jest wciąż mało znane, na co wpływa wysoka cena roślin i niewielka ich dostępność na rynku, związana głównie z niską efektywnością rozmnażania. Z tego względu tematyka podjęta w przedstawionej rozprawie doktorskiej jest jak najbardziej aktualna, a uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji naukowych o wszystkich etapach rozmnażania klonalnego tego gatunku. Mają też duże znaczenie praktyczne i mogą być wykorzystane w laboratoriach komercyjnych, przyczyniając się do rozpowszechnienia *Paphiopedilum* na rynku kwaciarskim. Ten naziemny, niewymagający i łatwy w uprawie w warunkach domowych storczyk ma szansę dołączyć do epifitycznych falenopsisów zalewających ostatnio rynek doniczkowych roślin kwitnących. Drugim ważnym aspektem aplikacyjnym przeprowadzonych badań jest wykorzystanie osiągnięć tej pracy w ochronie zagrożonego w naturze rodzaju *Paphiopedilum insigne*. Badania z tego zakresu prowadzą naukowcy z zespołu prof. Deb z Nagaland University w Indiach, których kilka prac zostało tu zacytowanych.

Cel rozprawy i zastosowane metody badawcze

Postawiona przez Autorkę pracy hipoteza badawcza zakłada że zastosowanie technik in vitro przyczyni się do zwiększenia współczynnika rozmnażania *Paphiopedilum insigne*. Będzie to możliwe poprzez dobór pożywek odpowiednich dla wzrostu i rozwoju podczas kolejnych etapów rozmnażania klonalnego tego storczyka, a także zaproponowanie podłoża do skutecznej aklimatyzacji roślin.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie technologii rozmnażania *Paphiopedilum insigne*, z zastosowaniem techniki in vitro, pozwalającej na uzyskanie dużej liczby roślin potomnych, dobrej jakości. W pierwszej opublikowanej pracy zaproponowano materiał roślinny do inicjacji kultur in vitro i testowano metody dezynfekcji powierzchniowej skutkujące uzyskaniem jałowych kultur oraz wysokiej wydajności kiełkowania nasion. Analizowano też wpływ wybranych substancji dodawanych do pożywki na cechy morfologiczne protokormów.

W drugiej pracy badano działanie regulatorów wzrostu, szczególnie cytokinin oraz substancji naturalnych w pożywkach na współczynnik namnażania i parametry morfometryczne pędów. Kolejny problem badawczy (3 publikacja) dotyczył określenia wpływu związków antyoksydacyjnych dodawanych do pożywek (kwasu askorbinowego oraz węgla aktywnego) na wzrost i rozwój pędów, przy czym dodatkowo analizowano w tym etapie zawartość związków fenolowych w liściach *P. insigne*, posługując się metodą spektrofotometryczną. Ostatnią pracę poświęcono finalnym etapom rozmnażania klonalnego, tj. ukorzenianiu pędów i badaniu wpływu następczego auksyn podczas ukorzeniania oraz rodzaju podłoża podczas adaptacji roślin do warunków ex vitro na wydajność tych procesów. Przeprowadzono też analizę stanu fizjologicznego zaaklimatyzowanych roślin, wykonano analizę fluorescencji chlorofilu (fluorymetr Opti-Sciences OS 30p+), oznaczono względną zawartość wody w tkankach (Barrs 1968), deficyt wysycenia wodą (Stocker 1929), aktywność enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy (Nakano i Asady 1981) i katalazy (Wiloch i in. 1999) w liściach aklimatyzowanych roślin.

Analizy statystyczne uzyskanych wyników przeprowadzono z użyciem programu Statistica (13.1, 2017).

Dobór materiału roślinnego i zastosowanie metod badawczych uważam za odpowiedni, pozwalający zrealizować postawione cele. Doświadczenia zaplanowano starannie, z odpowiednią ilością powtórzeń. Doktorantka wykazała się znajomością technik in vitro i rozmaitych metod analitycznych, których wykorzystanie znacząco podniosło wartość uzyskanych wyników.

Osiągnięcia badawcze

W publikacji pierwszej Doktorantka wykazała, że podczas inicjacji, zastosowanie do odkażania zamkniętych torebek nasiennych pozwala na uzyskanie sterylnej kultury in vitro nasion sabotka. Czystość kultur nie zależy od sposobu odkażania torebek, ale sposób ten ma wpływ na efektywność kiełkowania nasion. Najlepiej rozwijają się protokormy, gdy nasiona pochodzą z torebek zdezynfekowanych powierzchniowo w 96% alkoholu etylowym, potem opalanych w ogniu. Kiełkowaniu nasion sprzyja też zastosowanie pożywki dwufazowej z fazą ciekłą z wody sterylnej albo płynnej pożywki 25% Murashige i Skooga albo roztworu GA₃ (400 mg·dm⁻³). Rozwój protokormów w rozety jest stymulowany poprzez umieszczenie ich na pożywkach 50% MS z 1 mg·dm⁻³ BA + 5 mg·dm⁻³ kinetyny lub 2 mg·dm⁻³ tidiazuronu. W drugiej publikacji dotyczącej opracowania pożywki do namnażania pędów rozetowych sabotka, jako najwydajniejszą i ekonomiczną wskazano pożywkę ze zredukowanym do połowy składem makro- i mikroelementów wg MS. Otrzymanie wysokiego współczynnika gwarantuje wzbogacenie tej pożywki w cytokininę BA w stężeniu 0,5 mg·dm⁻³. Co więcej udowodniono, że na etapie namnażania pędów cytokinina ta może być zastąpiona 1 g·dm⁻³ hydrolizatu kazeiny. Natomiast obecność 1 mg kinetyny w pożywce wpływa na polepszenie jakości roślin, co może być korzystne w ostatniej fazie namnażania pędów, przed ukorzenianiem.

W trzeciej pracy podjęto próbę ograniczenia syntezy związków fenolowych przez namnażanie rośliny, bowiem substancje te często ograniczają wydajność mikrorozmnażanie in vitro storczyków. Badano wpływ węgla aktywnego i kwasu askorbinowego dodawanego do

pożywek na parametry morfometryczne i zawartość o-dihydroksyfenoli w liściach *Paphiopedilum insigne*. Udowodniono, że kwas askorbinowy w stężeniu $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ lub 1 i 2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ węgla aktywnego w pożywce w największym stopniu redukuje zawartości o-dihydroksyfenoli w liściach storczyka. Jeśli chodzi o morfologię pędów, stwierdzono, że kwas askorbinowy w stężeniu $20 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ pozwala na uzyskanie dobrej jakości rozet liściowych. Natomiast dodatnie do pożywki $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ węgla aktywnego pozwala na uzyskanie najwyższego współczynnika namnażania, a $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ tej substancji w pożywce stymuluje formowanie korzeni przybyszowych sabotka.

Badania prowadzone w ramach publikacji 4 dedykowane były etapowi ukorzenia pędów i aklimatyzacji uzyskanych *in vitro* roślin. Do ukorzenia *in vitro* wskazano pożywkę z $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA, gwarantującą 100% ukorzenie, co więcej wysoki procent roślin zaaklimatyzowanych (które na tej pożywce ukorzeniano). Badania wykazały, że aklimatyzacja roślin zależy od rodzaju zastosowanego podłoża, najlepsze jest gotowe podłoże do storczyków (Compo Sana), ewentualnie z dodatkiem torfu. Rośliny aklimatyzowane w podłożu do storczyków wykazują najlepsze parametry fizjologiczne, o czym świadczą otrzymane wyniki fotochemicznej wydajności kwantowej fotosystemu II (F_v/F_m), względnej zawartości wody (RWC) i deficytu wysycenia wodą (WSD). Zastosowane podłoża wpływały też na zmiany aktywności enzymów stresu oksydacyjnego.

W przedstawionej pracy doktorskiej Autorka uzyskała szereg interesujących wyników, które poszerzają wiedzę podstawową oraz mogą posłużyć do formułowania wniosków ważnych dla praktyki ogrodniczej.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki w ocenianej rozprawie uważam

1. wykazanie przydatności torebki nasiennej *Paphiopedilum insigne* do inicjacji kultur, wskazanie sposobu dezynfekcji powierzchniowej i pożywki do efektywnego rozwoju nasion,
2. opracowanie pożywki cytokininowej do namnażania pędów tego storczyka, z możliwością zastąpienia cytokininy przez naturalny hydrolizat kazeiny,
3. poszerzenie wiedzy na temat niekorzystnego zjawiska w kulturach storczyków, tj. wydzielania przez eksplantaty związków fenolowych ograniczających wzrost i rozwój tkanek,
4. wskazanie pożywki do ukorzenia pędów i podłoża do aklimatyzacji roślin oraz ocenę stanu fizjologicznego regenerantów z wykorzystaniem różnych metod,
5. w efekcie zaproponowanie protokołu rozmnażania klonalnego *Paphiopedilum insigne* do wykorzystania w praktyce.

Artykuły naukowe wchodzące w skład pracy doktorskiej nie mogą budzić zastrzeżeń, wyniki tych eksperymentów i sposób ich przedstawienia podlegały wcześniejszej ocenie specjalistów, recenzentów i wydawców. Jednak z obowiązku recenzenta, biorąc pod uwagę całość opracowania pozwałam sobie wskazać na niektóre kwestie zauważone w trakcie czytania tekstu

- w polskim opisie badań nazwisko Murashige kilkakrotnie jest napisane błędnie (przez ch),
- ciśnienie podczas autoklawowania pożywki lepiej podać w jednostce SI, a nie jak podano w atmosferach ($1 \text{ atm} = 0,101325 \text{ MPa}$).
- podana wartość natężenia światła (w $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) to precyzyjniej PPFD (photosynthetic photon flux density),
- współczynnik multiplikacji eksplantatów to dokładniej współczynnik namnażania pędów,
- nie jestem przekonana do poprawności nazywania mikrosadzonkami namnażanych i ukorzenianych pędów, pomimo, że ten termin jest ostanie spotykany w publikacjach naukowych. Myślę, że wywodzi się bezpośrednio z rynku produkcji ogrodniczej, gdzie

mikrosadzonką określa się pochodzącą z in vitro zaaklimatyzowaną roślinę (w odróżnieniu od ukorzonej tradycyjnie sadzonki, czy siewki, która też sprzedawana jest jako materiał wyjściowy do produkcji ogrodniczej). W mojej opinii trzeba wrócić do poprawnego nazewnictwa. Korzysta Pani w pracy z eksplantatów wyjściowych, które zawierają merystemy, rozmnażanie przebiega zatem przez pobudzanie do rozwoju merystemów/pąków kątowych/bocznych, specyficznie u storczyków po drodze rozwijają się protokormy.

Na koniec proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących pytań podczas obrony:

1. W jakim stanie fizjologicznym była torebka nasienna, którą poddawano dezynfekcji powierzchniowej. Na jakiej podstawie oceniono jej dojrzałość. Czy na kiełkowanie będzie miał wpływ wiek nasion? Proszę też wyjaśnić w jaki sposób (technicznie) liczono nasiona przy zakładaniu doświadczenia.
2. Czy nie myślała Pani o umieszczeniu protokormów na pożywkach płynnych z zakłóconym geotropizmem, jak to ma miejsce w namnażaniu wielu storczyków epifitycznych, np. cymbidium, gdzie wprowadzenie tego etapu znacznie zwiększa wydajność rozmnażania.
3. Proszę, aby podczas obrony Doktorantka porównała swoje wyniki z osiągnięciami opublikowanymi w pracy Deb i Jakha 2020, dotyczącymi tego samego gatunku sabotka rozmnażanego w kulturze in vitro.
4. Czy mogłaby Pani wyjaśnić działanie węgla aktywnego dodawanego do pożywek w kulturach in vitro?
5. W przypadku rozmnażania odmian storczyków w kulturach in vitro materiałem wyjściowym nie mogą być nasiona. Jak wówczas inicjuje się kulturę?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Poniewozik to interesujące opracowanie naukowe promujące możliwość wykorzystania na rynku kwaciarskim oryginalnego, mało znanego storczyka *Phaphiopedilum insigne*. Doktorantka podjęła ważny pod względem naukowym problem badawczy, zaplanowała i wykonała pracochłonne doświadczenia, wykazując dobre opanowanie warsztatu badawczego. Udowodniła umiejętność wnikliwego i rzetelnego realizowania zadań badawczych, wykazała się umiejętnością właściwego wnioskowania i dyskusowania otrzymanych wyników w oparciu o aktualną wiedzę literaturową.

Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Poniewozik stwierdzam, że spełnia ona wymagane kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami. Wobec powyższego stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Poniewozik, ubiegającej się o stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

