

Warszawa, 3.07. 2017 r.

dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska, prof. nadzw. SGGW w Warszawie  
Katedra Fizjologii Roślin  
Wydział Rolnictwa i Biologii  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Adamczuk**  
**pt.: Modyfikacje morfogenezy lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) typu oleistego i**  
**włóknistego w kulturach *in vitro***

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Anety Adamczuk została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Iwony Ciereszko prof. nadzw. UwB i była częściowo finansowana w ramach stypendiów dla doktorantów województwa podlaskiego Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013. Praca jest bardzo obszernym opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 261 stronach maszynopisu, zawiera 71 rycin, 13 fotografii oraz 27 tabel. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje istotne części składowe: przegląd literatury (zatytułowany jako Wstęp), założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, podsumowanie i wnioski, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, oraz spis literatury (Bibliografia) obejmujący 312 pozycji. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów, spis rycin, fotografii i tabel oraz 18 stronicowy aneks, na który składają się dwie tabele.

Zagadnienie poruszone w pracy doktorskiej dotyczy procesu regeneracji organów (pędów, korzeni) na drodze bezpośredniej z wyłożonych na pożywce fragmentów hipokotyli (eksplantatów) lnu (*Linum usitatissimum* L.) oleistego (odmiany Szafir) i lnu włóknistego (odmiany Selena). **Nadrzednym celem recenzowanej rozprawy było** określenie wpływu różnych czynników (typ pożywki, jakość i ilość hormonów roślinnych, obecność cukrów, lub zastosowanie donora tlenu azotu) na proces morfogenezy *in vitro* prowadzący do formowania pędów (**kaulogeneza**) lub korzeni (**ryzogeneza**).

W dalszej części pracy autorka poświęciła wiele uwagi charakterystyce systemu antyoksydacyjnego otrzymanej kultury *in vitro*. Oznaczyła zawartość ROS w tkankach, aktywność podstawowych enzymów systemu antyoksydacyjnego, a także zdolność przeciwutleniającą tkanki. Ponadto, zbadała związek pomiędzy potencjałem morfogenetycznym tkanki, a emisją lotnych związków organicznych i zawartością związków fenolowych w analizowanych kulturach.

Część teoretyczna pracy - **wstęp literaturowy, zajmujący 42 strony** - jest napisana jasnym, zwięzłym językiem (z niewielkimi wyjątkami), co świadczy o dobrej znajomości literatury. Na podkreślenie zasługuje dobre wyważenie proporcji ilości informacji zawartych w poszczególnych

podrozdziałach, wystarczające do dalszego śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągnięcia odpowiednich wniosków. W pierwszej kolejności Doktorantka opisała drogi organorenezy w kulturach *in vitro*, a następnie omówiła czynniki wpływające na ten proces. Stosunkowo dużo miejsca poświęciła przedstawieniu roli reaktywnych form tlenu (ROS) i tlenku azotu (NO) w regulacji regeneracji roślin w warunkach *in vitro*. Zaprezentowane we wstępie dane stanowią dobry punkt wyjścia dla przedstawionego w dysertacji celu pracy, chociaż zabrakło mi informacji dotyczących zależności pomiędzy zdolnością do organogenezy *in vitro*, a zawartością niektórych związków chemicznych w tkankach eksplantatów.

Po przeczytaniu, tej części rozprawy nasuwają mi się jeszcze pewne drobne uwagi. We wstępie nie ma informacji o materiale badawczym - lnie jako roślinie użytkowej oraz nie przedstawiono stanu wiedzy na temat kultur *in vitro* tej rośliny, ze szczególnym uwypukleniem danych dotyczących lnu oleistego i włóknistego. Część z tych informacji została umieszczona w rozdziale "Materiał i metody", co moim zdaniem nie jest zupełnie słuszne, gdyż materiałem doświadczalnym nie były rośliny lnu (jako takie), a eksplantaty w postaci fragmentów hipokotyli 7 dniowych siewek. W rozdziale 1.4.2. "Sygnalna rola ROS w morfogenezie w warunkach *in vitro*" omówione zostały ogólne elementy sygnalizacji ROS, natomiast zabrakło bezpośrednich odniesień do kultur tkankowych. Co prawda te zagadnienia poruszono w rozdziale poprzedzającym, jednak z pominięciem sygnalnej funkcji ROS.

Rycina 2 prawdopodobnie została skomponowana ze zdjęć własnych mgr Adamczuk obrazujących organogenezę w kulturach *in vitro*. Szkoda, że nie ma informacji jaki materiał przedstawiono na fotografiach i czy faktycznie doktorantka jest ich autorką.

W rozdziale **założenia i cel pracy** sformułowano 10 zadań badawczych postawionych w formie pytań, które posłużyły do realizacji dwóch zasadniczych celów pracy dotyczących:

- 1) porównania zdolności morfogenetycznych dwóch odmian lnu zwyczajnego: odmiany Szafir reprezentującej typ lnu oleistego i odmiany Selena - typ lnu włóknistego;
- 2) określenia modyfikacji zdolności morfogenetycznych tych odmian przez zastosowanie wybranych czynników/związków takich jak: zróżnicowany skład pożywki, hormony roślinne, donor NO, stres osmotyczny.

Szkoda, że nie postawiono hipotezy badawczej, która podlegałaby weryfikacji po analizie wyników przeprowadzonych badań.

W rozdziale **Materiały i Metody** (liczącym 22 strony) opisano stosowane w trakcie badań metody: cytologiczne, morfologiczne, fizjologiczne, biochemiczne. Szeroki zakres użytych metod (od obserwacji mikroskopowych po oznaczenia GC-MS) jest niewątpliwym atutem dysertacji, a ich dobór jest zasadny. Opis poszczególnych metod jest prawidłowy i umożliwia łatwe powtórzenie doświadczeń, stanowi zatem cenne źródło informacji, na którym można będzie bazować prowadząc dalsze prace dotyczące podjętej tematyki.

W tym miejscu mam kilka pytań dotyczących metodyki:

Dlaczego sterylizacja nasion lnu odmiany Szafir prowadzona była przez 15 minut, a sterylizacji nasion lnu odmiany Selena tylko 5 minut?

Czy próbowano stosowania donorów NO innych niż nitroprusydek sodu?

Czy rozważano oznaczenie w analizowanym materiale także zawartości anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^{\cdot-}$ ? Wiedza na ten temat mogłaby ułatwić dyskusję dotyczącą aktywności SOD?

Rozdział **Wyniki** to najobszerniejsza część dysertacji, mieszcząca się na ponad 100 stronach i obejmująca 16 podrozdziałów, w których opisano uzyskane rezultaty badań. W pierwszej części Doktorantka dokumentuje, najkorzystniejszy skład pożywki dla uzyskania kultury pędowej lub korzeniowej dla obu odmian lnu. Ten fragment pracy doktorskiej wymagał wykonania wielu czasochłonnych kultur, w których oprócz zbadania wpływu rodzaju pożywki (MS, B5, MS+B5) analizowano efektywność organogenezy w zależności od rodzaju stosowanej cytokininy (BA, KIN, TDZ), auksyny (2,4-D, NAA, IBA) oraz stosunku stężeń związków należących do tych dwóch grup hormonów roślinnych. Był to etap badań konieczny dla dokonania wyboru podłoży, które stosowane były w dalszych eksperymentach.

Doktorantka wykazała, że wybrane odmiany lnu odznaczają się odmiennymi wymaganiami co do składu i rodzaju pożywki wykorzystywanej do wzrostu kultur, mają natomiast podobne wymagania co do rodzaju stosowanych auksyn oraz cytokinin. W optymalnych warunkach wzrostu kultur, efektywniejszą organogenezą odznaczała się odmiana Szafir (len oleisty), w porównaniu do odmiany Selena (len włóknisty). Formowanie pędów i korzeni w kulturach lnu oleistego obserwowano wcześniej i było ono efektywniejsze, w porównaniu z organogenezą u lnu włóknistego.

Kolejne analizy dotyczyły zmian cytologiczno-anatomicznych zachodzących w początkowym okresie inicjowania organów (dni kultury 1-7 oraz dzień 12 lub 11). Doktorantka zaprezentowała bardzo interesującą dokumentację fotograficzną organogenezy pędowej i korzeniowej obu odmian lnu. Szkoda tylko, że umieszczone w pracy zdjęcia są tak małe. Jako dokument fotograficzny zdecydowanie zyskałyby na wartości poznawczej, gdyby były umieszczone jako oddzielne tablice o formacie A4, trudno jest zauważyć na małych fotografiach różnice opisywane w tekście.

Ciekawym aspektem recenzowanej dysertacji jest analiza lotnych związków organicznych produkowanych przez siewki, z których pozyskiwano eksplantaty oraz kultury pędowe obu odmian lnu po 5, 14 i 28 dniach wzrostu. Materiał pochodzący z odmiany Selena charakteryzował się bogatszym składem chemicznym (zidentyfikowano 24 związki) w porównaniu do odmiany Szafir (zidentyfikowano 15 związków). Także analiza jakościowa i ilościowa związków organicznych w ekstraktach metanolowych z siewek i kultur pędowych obu odmian lnu wskazała na znaczne różnice, które mogą mieć decydujący wpływ na potencjał morfogenetyczny stosowanego materiału badawczego. Z pewnością recenzenta, w rozdziale 4.8.2 sugerowałabym umieszczenie wartości %

na prezentowanych diagramach kołowych, oraz zablokowanie tych diagramów na jednej stronie, co znacznie ułatwiłoby analizę otrzymanych wyników.

Dalsze eksperymenty wskazują, że w kulturach odmiany Szafir obserwowano mniejszą zawartość metabolitów wtórnych (polifenoli, tanin, fenylopropanoidów i flawonoidów) w porównaniu do kultur odmiany Selena, wykazujących obniżony potencjał regeneracyjny. Stanowi to wartościowe potwierdzenie dostępnych danych literaturowych. Kultury łatwo regenerującej odmiany Szafir charakteryzowała także wyższa aktywność metaboliczna, mierzona w kulturach pędowych jako intensywność fotosyntezy i oddychania ciemniowego.

Biorąc pod uwagę fakt, że kultury tkankowe są szczególnie narażone na wpływ czynników stresogennych i z uwagi na to, że sama hodowla *in vitro* jest stresująca Doktorantka przeanalizowała dane mogące wskazywać na indukcję stresu oksydacyjnego w badanych kulturach lnu zwyczajnego. Wykazała, że kultury lnu włóknistego, w odróżnieniu od oleistego, charakteryzują się wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych SOD i CAT, co może być jedną z przyczyn niskiego potencjału regeneracyjnego lnu włóknistego, gdyż ROS uważa się za konieczne dla prawidłowego przebiegu procesu regeneracji. W kolejnym etapie doświadczeń, wychodząc z założenia, że pomimo wielu negatywnych skutków, stres może mieć także charakter pozytywny - indukujący procesy rozwojowe, Doktorantka przeanalizowała wpływ stresu osmotycznego (stosowanego jako podwyższona zawartość sacharozy w pożywce) na organogenezę obu odmian lnu. Jednak zwiększenie stężenia sacharozy w podłożu nie wpływało korzystnie na proces morfogenezy, nieznaczną stymulację kaulogenezy obserwowano tylko dla odmiany Szafir, przy 3-krotnym zwiększeniu stężenia cukru.

Znaczną część dysertacji stanowią doświadczenia, których celem było określenie roli tlenku azotu (NO) w procesie morfogenezy lnu. Z literatury wiadomo, że fumigacja eksplantatów NO w niskim stężeniu sprzyja regeneracji korzeni, a nawet, w przypadku niektórych roślin zastępuje działanie auksyny. W recenzowanej dysertacji jako donora NO użyto nitroprusydku sodu (SNP). Dodanie tego związku do pożywki nie miało wpływu na regenerację. Natomiast zastosowanie par SNP, zawierających zarówno NO<sub>x</sub> jak i CN<sup>-</sup> miało korzystny efekt w przypadku trudno regenerującej odmiany Selena (lnu włóknisty), szczególnie wówczas gdy w pożywce nie było auksyny. Doświadczenia z użyciem zmiatacza NO (cPTIO) potwierdziły udział NO w regulacji organogenezy w kulturach lnu włóknistego. Traktowanie kultur lnu włóknistego oparami SNP spowodowało podwyższenie ich zdolności antyutleniającej. Jednocześnie, fumigacja SNP nie wpływała na podwyższenie aktywności SOD i CAT, jedynie w późniejszym etapie wzrostu kultur odmiany Selena odnotowano podwyższoną aktywność MnSOD. Ten fragment rozprawy doktorskiej jest szczególnie wartościowy ze względu na znaczenie NO w regulacji procesów fizjologicznych roślin i uważam go za najważniejsze osiągnięcie.

**Dyskusja** uzyskanych wyników jest przeprowadzona logicznie, co wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu. Szkoda, że zawiera tylko jeden schemat pogładowy. Z uwagi na porównanie dwóch różnych odmian lnu, różniących się zasadniczo zdolnością regeneracji korzystne byłoby wzbogacenie dyskusji o tabele lub ryciny podsumowujące uzyskane wyniki badań, co znacznie ułatwiłoby wyciągnięcie ogólnych wniosków.

Analizując całość dysertacji, nasuwa się kilka pytań, na które nie można uzyskać odpowiedzi w treści rozdziałów Wyniki i Dyskusja, dlatego proszę o ustosunkowanie się do nich:

1. Dlaczego analizując wpływ różnych związków stosowanych w podłożach do prowadzenia kultur podawano zawsze zawartość H<sub>2</sub>O w suchej masie tkanki. Proszę o wytłumaczenie tego sposobu przedstawiania wyniku, gdyż z fizjologicznego punktu widzenia wydaje się on mało przydatny.
2. Dlaczego analiza anatomiczna organogenezy została zakończona po 12 lub 11 dniach wzrostu eksplantatów na pożywkach?

**W podsumowaniu stwierdzam**, iż przedstawiona do oceny praca dobrze wpisuje się we współczesne, wieloaspektowe rozważania dotyczące możliwości regeneracji tkanek roślinnych. Pani mgr Aneta Adamczuk wykazała umiejętności w zakresie posługiwania się różnorodnymi metodami badawczymi, a sposób opracowania rozprawy i swoboda poruszania się w omawianym temacie świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Z powinności recenzenta przytaczam niektóre z zauważonych błędów edytorskich i niedociągnięć językowych:

Po wprowadzeniu skrótu lub symbolu powinien być on konsekwentnie używany w dalszej części pracy. Uwaga ta dotyczy np. brasinosteroidy str. 30 i 31, oraz symbole ROS i enzymów antyoksydacyjnych w rozdziale 1.4 i kolejnych.

str. 14 - sformułowanie „równe poziomy obu hormonów.. można byłoby zastąpić równoważne stężenia obu hormonów.

str. 21 - "... światło niebieskie powoduje spadek zdolności regeneracyjnej..." powinno brzmieć "... światło niebieskie powoduje obniżenie zdolności regeneracyjnej...".

na str. 25 i w innych miejscach dysertacji Doktorantka pisze o najwyższym procencie reagujących eksplantatów, zdecydowanie poprawniej należałoby mówić o liczbie eksplantatów, która wyrażona jest w %.

str. 25 - w odniesieniu do tidiazuronu użyto kolokwialnego wyrażenia "potężny regulator".

str. 36 - zdanie "Efekt działania warunków stresowych na procesy morfogenetyczne wiąże się z wytwarzaniem ROS..." jest niefortunne i na tej samej stronie zdanie "W wyniku działania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stwierdzono, iż..". powinno brzmieć: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> użyty w niskim stężeniu miał wpływ na organogenezę pędową mieczyka ...".

str. 36 - nieprawidłowo podano nazwisko autorki pracy Szechyńska-Hebda, powinno być Szechyńska-Hebda.

Autorka używa słowa poziom, zamiennie z wyrażeniem stężenie czy zawartość, jest to czasami rażące, gdyż stanowi dosłowne tłumaczenie z j. angielskiego.

str. 40 - w zdaniu "... w trakcie rozwoju siewki istotną drogą biosyntezy NO wydaje się być...", pominięto słowo reakcja.

str. 41 - powinno być poliamin zamiast poliamid

str. 55 i 57 - zamiast słowa "pojemnością" powinno być "objętością"

str. 82 i 83, 85 - w podpisie do rycin jest błąd, zamiast wyrażenia "...z dodatkiem wybranej cytokininy: 2,4-D, NAA..." powinno być "...z dodatkiem wybranej auksyny 2,4-D, NAA..."

str. 87 i str. 90, sformułowanie o wzajemnych stężeniach hormonów jest niefortunne, należałoby pisać raczej o stosunku stężenia auksyny do stężenia cytokininy.

W spisie literatury znalazłam drobne błędy literowe.

Inne uwagi edytorskie zaznaczono w tekście rozprawy.

### **Wniosek końcowy**

Pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Anety Adamczuk. Uważam, że jest ona opracowaniem naukowym, które wnosi istotne wiadomości pozwalające lepiej poznać uwarunkowania biochemiczne i fizjologiczne procesu organogenezy *in vitro* u roślin wyższych. Eksperymentalna część badań została prawidłowo zaplanowana i wykonana odpowiednio metodycznie. Godna uznania jest różnorodność przeprowadzonych analiz, które dają podstawy do wnioskowania o roli ROS i NO podczas kaulogenezy i ryzogenezy lnu zwyczajnego. Postawione przez Doktorantkę cele badawcze zostały w całości zrealizowane. Umieszczone w niniejszej recenzji uwagi krytyczne nie umniejszają znaczenia rozprawy doktorskiej mgr Anety Adamczuk. Należy je traktować jako podstawę do dyskusji oraz wyraz troski o lepszą formę opracowania wyników do przyszłych publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „Modyfikacje morfogenezy lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) typu oleistego i włóknistego w kulturach *in vitro*” w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2004 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. 2003r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), w związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie jej Autorki mgr Anety Adamczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska

