

Prof. dr hab. Elżbieta Zenkteler
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
w Poznaniu

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR PIOTRA ŻABICKIEGO

„*EX SITU* PRESERVATION OF ENDANGERED VIOLET (*VIOLA STAGNINA* KIT.)

WITH THE USE OF *IN VITRO* MICROPROPAGATION AND TISSUE CRYOPRESERVATION”

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy kompleksu zagadnień nowoczesnej formy ochrony *ex situ* rzadkich i zagrożonych ekstynkcją populacji roślin bazującej na kulturach *in vitro* oraz krioprotekcji zregenerowanego materiału. Obie te, specjalistyczne metody, reprezentujące wysoki stopień zaawansowania technologicznego, stały się nieodzownym narzędziem czynnej ochrony przyrody, a ich skuteczność potwierdzają coraz liczniejsze doniesienia o kolejnych gatunkach objętych programem krótko- lub długo-terminowego przechowywania w banku genów. Mikrorozmnażanie, szybko zwiększające pulę osobników zagrożonego wyginięciem gatunku, jest efektywną i stosunkowo szybką metodą dostarczania roślin do reintrodukcji na stanowiska naturalne. Również długoterminowe przechowywanie materiału roślinnego, w oparciu o techniki głębokiego mrożenia, uwarunkowanego dehydratacją tkanek, służy uzupełnieniu, a nawet odtworzeniu zagrożonych populacji. Materiał roślinny otrzymany tymi metodami wymaga oceny stabilności genetycznej, tak aby bez ograniczeń mógł zostać włączony w pulę genetyczną chronionej populacji. Wynika stąd teza, że stabilność genetyczna regenerantów, winna być ewaluowana w kontekście statusu genetycznego roślin matecznych pochodzących z zagrożonej populacji. Niewielu autorów podjęło dotychczas tak potrzebną, lecz trudną problematykę. Dlatego też, ocena stabilności genetycznej regenerantów *Viola stagnina*, przy zastosowaniu wyselekcjonowanych markerów molekularnych oraz bogatego zestawu metod statystycznych, stała się centralną osią recenzowanej pracy. Z powyższego względu problematykę pracy uważam za bardzo aktualną i poznawczo istotną, zarówno dla nauk podstawowych, jak i praktyki przydatnej w ochronie gatunkowej roślin.

OCENA FORMALNA

Rozprawa doktorska mgr Piotra Żabickiego została wykonana w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Elżbieta Kuta, a promotorem pomocniczym dr Monika Tuleja. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie wpisują się w kontekst prowadzonych przez zespół badawczy Pani prof. Elżbiety Kuty wieloletnich studiów cytotaksonomicznych i filogenetycznych rodzaju *Viola*; w aspekcie różnorodności mechanizmów ewolucyjnych jego przedstawicieli, wywołanych wysoką frekwencją hybrydyzacji i poliploidyzacji, znacząco modyfikujących genetyczną strukturę populacji tej grupy roślin.

Rozprawa mgr Żabickiego, jest typową pracą eksperymentalną, liczy 100 stron łącznie ze spisem literatury (144 pozycje), zawiera 8 tabel (i 5 o charakterze suplementów), 23 pozycje ilustracyjne (w tym wykresy i fotografie czarno-białe i kolorowe). Tytuł pracy nie w pełni oddaje treść osiągnięcia naukowego, w znacznej mierze zdeterminowanego oceną stabilności

genetycznej badanych populacji rodzicielskich i ich potomstwa uzyskanego *in vitro* i poddanego stresowi krioprezerwacji.

W obszernym WSTĘPIE (poprzedzonym wykazem skrótów i streszczeniami w j. polskim i angielskim) scharakteryzowano pochodzenie, zasięg występowania i stopień zagrożenia *Viola stagnina*; przybliżono kwestię chasmogamicznych i kleistogamicznych kwiatów fiołka oraz reprodukcyjne konsekwencje tego zjawiska. W oparciu o literaturę przedmiotu (powołano się na 91 prac) naświetlono tło zagadnień dotyczących mikrorozmnażania i krioprezerwacji namnożonego materiału oraz możliwości testowania zgodności genotypowej regenerantów i roślin matecznych.

CELEM badań, ukierunkowanych na ochronę populacji *V. stagnina* zagrożonych wyginięciem na stanowiskach naturalnych, był wybór i optymalizacja metody mikrorozmnażania, wybór technik krioprezerwacji; przetestowanie konsekwencji stresu zamrożenia i odmrożenia przechowywanego w LN materiału oraz stwierdzenie czy i jakiego rodzaju zmiany zaszły na poziomie genomu regenerantów w porównaniu do roślin matecznych. Obiektem badań były dwie populacje *V. stagnina*, z których pobrano dwa typy eksplantatów do cytometrycznej oceny poziomu endoploidalności, frekwencji komórek o ilości DNA 2, 4 i 8C, a po zakończeniu eksperymentu oceniono wielkość genomu u potomstwa.

METODYKA obejmująca 34 str. oprócz podstawowych technik *in vitro* (pożywki, dobór PGR oraz warunków fizycznych mikrorozmnażania) omawia procedury odwadniania, jako czynnika warunkującego efektywność krioprezerwacji oraz późniejszej przeżywalności regenerantów. Interesujący graficznie schemat stosowanych metod, przybliży trzy szlaki przebiegu krioprezechowywania. Ocenę zgodności genetycznej regenerantów i eksplantatów które przeszły pełną procedurę krioprezerwacji, z roślinami matecznymi, oparto na analizie markerów molekularnych ISSR, których wybór uzasadniono w dyskusji. Analizę zmienności genetycznej wsparto bogatym zestawem narzędzi statystycznych, w tym PCoA (Principal Coordinate Analysis), na bazie której dokonano analizy porównawczej rodzicielskiej i potomnej puli materiału roślinnego.

WYNIKI opracowano bardzo starannie. Przedstawione tabele są czytelne i dobrej jakości. Zwłaszcza dane zawarte w suplementach oraz analizy oparte na matrycy genetycznych dystansów odznaczają się wysoką wartością naukową oraz dokumentują wkład pracy w uzyskanie tak szerokiego spektrum wyników. Testowanie pożywek zawierających 10 kombinacji regulatorów wzrostu dostarczyło wiedzy o indukcji i przebiegu organogenezy u *Viola*, ukazując możliwość aplikacyjnego wykorzystania regenerantów z *in vitro* w ochronie bioróżnorodności. Barwne i czarno-białe fotografie opatrzone podziałką, ułożone w tablice dokumentujące przebieg mikrorozmnażania włączono w obręb tekstu, co podniosło jego walor informacyjny. Przebieg pierwszej części eksperymentów miał charakter standardowy, nie odbiegający od przykładów mikrorozmnażania i krioprezerwacji u innych gatunków. Opracowano protokół organogenezy bezpośredniej u *Viola*, a z pąków przybyszowych po ukorzenieniu i aklimatyzacji otrzymano rośliny zdolne do osiągnięcia fazy generatywnej, kwitnienia i wydania żywotnego pyłku. Zabieg krio poprowadzono trzema szlakami: kapsułkowania; dehydratacji osmotycznej oraz dehydratacji z użyciem PVS₂ i PVS₃. Po mrożeniu w LN i kontrolowanym rozmrożeniu wykazano, że pąki przybyszowe chociaż uległy odbarwieniu i nie kontynuowały wzrostu, to po ok 28 – 30 dniach proliferowały kalus, w którym rozwijały się centra merystematyczne, a z nich pąki przybyszowe. Tylko na drodze pośredniej regenerowały rośliny przeznaczone do analizy obrazującej ich stan genetyczny oraz ewentualne następstwa szkodliwości stosowanych preparatów chemicznych i stresowego działania procedury odwadniania.

Wyczerpująca DYSKUSJA wyników obejmuje 9 stron i nawiązuje do wszystkich pozycji literaturowych. Autor rzeczowo komentuje wyniki badań własnych, a szeroka znajomość literatury przedmiotu zapewnia wielostronną interpretację uzyskanych danych. W podsumowaniu dyskusji sformułowano 5 konkluzji.

Kończąc ocenę formalną rozprawy, należy podkreślić że uzyskane przez Doktoranta wyniki dobrze weryfikują postawioną przez niego hipotezę badawczą 'Czy namnożony *in vitro* oraz zamrożony i odmrożony materiał zachowuje stabilność genetyczną?' Otrzymane wyniki wnoszą istotny wkład w stwierdzenie ewentualnej szkodliwości zastosowanych metod *in vitro* oraz krioprezerwacji dla stabilności genetycznej otrzymanego materiału.

OCENA MERYTORYCZNA

Kompleksowe podejście do problemu zmienności somaklonalnej w kulturach *in vitro*, przedstawione w rozprawie mgr Piotra Żabickiego stanowi novum w tej dziedzinie i otwiera dalsze perspektywy badawcze służące konkretnym programom hodowlanym. Planując eksperyment ograniczenia zmienności w kulturach wykorzystał analizę FCM do oceny poziomu ploidalności roślin (wielkości genomu) w obydwu populacjach naturalnych, poziomu endoploidalności u wybranych eksplantatów z których inicjował regenerację, słusznie przewidując, że fragmenty blaszki liściowej, jako eksplantaty o niewielkim poziomie endoploidalności, będą słabiej generowały zmienność w kulturach.

Do oceny zmienności somaklonalnej indukowanej *in vitro* Autor zaproponował adaptację analizy sprawdzonej w analizach filogenetycznych, przy pomocy której zbadał zróżnicowanie genetyczne między *V. stagnina* z populacji naturalnych a potomstwem, uzyskując bardzo interesujące wyniki. Na podstawie wyselekcjonowanych markerów molekularnych ISSR utworzył sieci sąsiadów (Neighbor Net) w oparciu o matryce dystansów genetycznych Nei-Li. Ocena wiarygodności odgałęzień w sieci wykazała obecność dwu silnych grup, rozdzielających obydwie populacje i regenerujące z nich potomstwo, co potwierdziła zastosowana uprzednio analiza PCoA. Analiza ta wykazała wyższy poziom zróżnicowania genetycznego wewnątrz- i między-populacyjnego, przewyższający poziom zróżnicowania w puli potomstwa.

Oryginalnym podejściem do oceny zmienności somaklonalnej indukowanej krioprezerwacją było zastosowanie przez mgr Żabickiego regenerantów pochodzących z pojedynczej rośliny inicjalnej. Obraz elektroforetyczny wzorca ISSR okazał się w tym przypadku całkowicie zuniformalizowany, niezależnie od zastosowanej procedury odwadniania. Zdecydował się na użycie dendrogramu UPGMA bazującego na dystansach genetycznych Dice, które ukazały obecność dwóch, słabo wspartych kładów, obejmujących i roślinę mateczną i uzyskane z niej regeneranty, poddane trzem odrębnym krioprotokółom.

Należy podkreślić, że analizując zróżnicowanie genetyczne *V. stagnina* Doktorant w pełni wykorzystał dostępne możliwości oceny genetycznej (odrębności *versus* podobieństwa) między roślinami z populacji naturalnej a potomstwem zregenerowanym *in vitro*. Jedną z nich była analiza porównawcza fenotypu kwiatów, ich elementów generatywnych oraz żywotności i wielkości ziaren pyłku, która potwierdziła prawidłowe działanie mechanizmów reprodukcji płciowej u regenerantów, gwarantujące zdolność do eliminacji ewentualnych aberracji u zregenerowanego potomstwa. Dane dotyczące roślin rodzicielskich dostarczyły tła dla oceny porównawczej poziomu zróżnicowania genetycznego potomstwa.

Dociekliwość i wielopłaszczyznowość badań mgr Piotra Żabickiego umożliwiły osiągnięcie najważniejszego celu badań jakim było wykazanie, że potomstwo poddane licznym stresom

fizyko-chemicznym (rozmnażanie w kulturach *in vitro* i krioprezerwacja) zachowało wysoki stopień zgodności genetycznej z roślinami matecznymi.

PYTANIA I UWAGI

1. Niekiedy Autor zapominał podać w metodzie eksperymentu z jakiej populacji pochodziły rośliny inicjalne lub ich potomstwo, Dane te często były zawarte w odpowiedniej tabeli lub wykresie, ale trzeba było je wyszukiwać.

Str. 30 w metodyce dotyczącej krioprezerwacji nie podano z jakiej populacji pochodziły pąki przybyszowe otrzymane po organogenezie bezpośredniej z fragmentów liścia. (a tylko one były później zamrażane). Podobnie, w paragrafie 6.4.1. Autor analizował żywotność i wielkość pyłku r. matecznych z Garbas (5 okazów zielnikowych) a w paragrafie 7.3.1. regenerantów (nie podając populacji); to samo w suppl.5. Fig. 11, 12, 13 w podpisie brakuje informacji dotyczącej populacji. Również przy porównaniu budowy kwiatu (chasmogamia) ze stanowiska naturalnego z otrzymanym po regeneracji, brakuje wzmianki z jakiej populacji pochodziły okazy fig. 15 i 16.

2. Fig. 9, str.33, na schemacie pt. „Stosowane techniki krioprezerwacji.” pierwsze zdjęcie przedstawia pąki regenerujące z ogonka! - a nie z blaszki, o czym wzmiankuje metodyka. Może lepsze byłoby włączenie do schematu zdjęcia pojedynczego pąka (takiego jak na fot.8). Ponadto, na schemacie nie zaznaczono prekultur poprzedzających kapsułkowanie eksplantatów.

3. Terminologia ‘adventitious shoots’ - jest niekonsekwentna: w użyciu spotykamy określenia ‘small shoot buds’ ‘adventitious shoot buds’ str.49; ‘young shoot’? ‘shoot initials’ fig.12; a nawet ‘excision mature shoots from the explants’ str.45

4. Tab. 2.”Endoplidalność u eksplantatów *in vitro*...” Czy zostały spełnione założenia do analizy ANOVA, bo nie podano liczby pomiarów – n – w przypisach do tabeli.

5. Czy oceny endoploidalności eksplantatów (ogonek i blaszka) dokonano w obecności standardu zewnętrznego? fig. 10.

6. Podpis pod fig. 13. jest nieadekwatny do obrazu „*V. stagnina* leaf blades ...”, a zdjęcie przedstawia przekrój przez pąki przybyszowe.

7. Czy eksplantaty przebywały w ciekłym azocie tylko 1h? Dlaczego tak krótko, coiałoby się po dłuższym przechowywaniu?

8. Pąki przybyszowe niezależnie od wielkości pasażowano przez 7 dni na pożywce z NAA i BAP. Czy dopiero wówczas pąki kapsułkowano?

Autor nie ustrzegł się drobnych literówek: str.51 Garbas zamiast Garabas; str. 61. vitrification zamiast vitryfication; str.66 (+0.02) zamiast 0.72; str. 31 chyba źle zamknięto nawias u dołu strony?

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają rangi i znaczenia uzyskanych wyników; a ich wskazanie ma na celu pomoc Autorowi w przygotowaniu pracy do druku.

PODSUMOWANIE

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Autor wykazał się szeroką wiedzą obejmującą rozległą problematykę badawczą, a także umiejętnością realizacji zaplanowanych eksperymentów, śmiałym sięgnięciem po nowe narzędzia badań oraz trafną interpretacją otrzymanych wyników. Zawarte w pracy nowe dla nauki dane, oprócz znaczenia dla badań podstawowych, mają istotny walor praktyczny, wskazujący na możliwość bezpiecznej reintrodukcji regenerantów z kultur *in vitro* w obręb populacji zajmującej stanowiska naturalne. Cele postawione w pracy zostały w pełni zrealizowane, a analizowane hipotezy badawcze znalazły potwierdzenie w oryginalnym rozwiązaniu zagadnienia naukowego.

WNIOSEK KOŃCOWY

Na podstawie oceny rozprawy doktorskiej pt. "Ex situ preservation of endangered violet (*Viola stagnina* Kit.) with the use of *in vitro* micropropagation and tissue cryopreservation" Stwierdzam, że praca spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. Ustaw 65/03, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Piotra Żabickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na uzyskanie nowych dla nauki danych oraz wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej wnoszę o przyznanie mgr Piotrowi Żabickiemu stosownego wyróżnienia.

Poznań, 26 kwietnia 2017 roku



Prof. dr hab. Elżbieta Zenkteler