

RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr Piotra Żabickiego pt. **"Ex situ preservation of endangered violet (*Viola stagnina* Kit.) with the use of *in vitro* micropropagation and tissue cryopreservation"**

Następstwo gatunków w wyniku ewolucji oznacza z jednej strony powstawanie nowych gatunków, z drugiej zaś wymieranie innych. Gdyby nie obecność na Ziemi dominującej cywilizacji ludzi, których obecność wywiera przemożny wpływ na kształt całej biosfery i historię ogromnej liczby gatunków roślin i zwierząt na ogromnych połaciach Ziemi, można byłoby przyjąć, że sukcesja gatunków jest procesem naturalnym. Niestety zmiany w środowisku związane z obecnością i działalnością człowieka wzbudzają dobrze udokumentowane obawy, że to my, ludzie jesteśmy w dużej mierze odpowiedzialni za tą „gorszą” stronę sukcesji gatunków, czyli za wymieranie wielu gatunków roślin i zwierząt. Wymieranie może mieć wymiar dokonany, kiedy przestajemy obserwować obecność jakichkolwiek osobników w ich dotychczasowych siedliskach, lub niejako charakter *in statu nascendi*, kiedy liczba osobników zmniejsza się w kolejnych latach, co w przyszłości grozi temu gatunkowi wyginięciem.

Można wskazać wiele przyczyn wymierania gatunków, albo ich przejścia w stan zagrożenia, z których część, trudna do określenia, jest pochodzenia antropomorficznego. Nie wiemy zatem, za które przyczyny tego procesu odpowiedzialni są ludzie i ich działalność. Poczucie odpowiedzialności ludzi za stan środowiska ziemskiego i zachodzące w nim zmiany, powinno jednak indukować działania zmierzające do ich powstrzymania w myśl zasady, że złem i niepowetowaną stratą jest wyginięcie każdego gatunku zamieszkującego Ziemię, choćby tylko ze względu na zniknięcie bioróżnorodności z nim związanej.

Powyższe względy powodują, że popieram każdą działalność zmierzającą do ochrony „słabszych” gatunków, zarówno przed wyginięciem, jak i przed takim zmniejszeniem liczebności ich zbiorowisk, które będzie skutkowało umieszczeniem ich w Czerwonej Księdze gatunków ginących. Badania prowadzone przez pana mgr Piotra Żabickiego, zakończone przygotowaniem rozprawy doktorskiej, są poświęcone rozpoznaniu możliwości przyspieszenia reprodukcji gatunku fiołka mokrzałowego (*Viola stagnina* Kit.), zatem już na wstępie studiowania tej rozprawy jestem bardzo pozytywnie nastawiony do jej Autora. To nastawienie potęguje się jeszcze, jeśli uświadomię sobie, że rośliny tego gatunku nie są bardzo efektowne, nie słyszałem też o ich własnościach leczniczych, czy innych użytkowych, a do tego trzeba mieć bardzo silną pozytywną motywację, aby wędrować po mokradłach i bagnach w poszukiwaniu populacji lub poszczególnych osobników tego gatunku. Gdyby bowiem rośliny te charakteryzowały się którąkolwiek z powyższych cech użytkowych, przed wyginięciem mogłyby chronić je przydomowe ogródki, kolekcje roślin ozdobnych lub medycznych albo nawet kolekcje komercyjne.

Rozprawa doktorska pana mgr Piotra Żabickiego dotyczy zastosowania i porównania efektywności różnych metod mikrorozmnażania oraz krioprezerwacji fiołka mokradłowego (*Viola stagnina* Kit.), a także określenia, czy użyte przezeń metody laboratoryjne indukują zwiększone zmiany w genomie roślin. Cenne zwłaszcza jest i warto podkreślenia, molekularne „obudowanie” zastosowanych technik *in vitro*, co pozytywnie wyróżnia pracę Pana Żabickiego spośród innych rozpraw doktorskich, jakie było mi dane recenzować w ostatnich dziesięcioleciach. Wszystko to łącznie spowodowało, że chętnie i z dużym zaciekawieniem podjąłem się wykonania recenzji tej rozprawy doktorskiej.

Uwagi ogólne o pracy

Rozprawa przygotowana została w języku angielskim. Zaczyna się spisem treści, wykazem użytych skrótów, streszczeniem angielsko- i polskojęzycznym, wprowadzeniem w tematykę pracy, sformułowaniem celów pracy, opisem materiału roślinnego i zastosowanych metod badawczych. Dalej następuje prezentacja uzyskanych wyników i ich dyskusja. W skład końcowej części rozprawy wchodzi: podsumowanie, dodatkowa dokumentacja wybranych wyników w postaci suplementów oraz skany dokumentów wymienianych pomiędzy Uczelnią i Ministerstwem Ochrony Środowiska w sprawie sposobu i zakresu pozyskiwania do materiału roślinnego do badań. Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa ma strukturę klasyczną i kompletną.

Całość rozprawy obejmuje 23 ryciny (w tym zdjęcia), 8 tabel w części zasadniczej i 5 w suplementach, a spis piśmiennictwa zawiera 144 pozycje. Praca została napisana komunikatywnym językiem, niesprzysięgającym trudności w czytaniu, także dla mnie, choć jestem fizjologiem roślin.

W spisie treści nie doszukałem się ani jednej nieścisłości, co podkreślam z uznaniem, bo wcześniej rzadko napotykałem tak rozbudowany spis bez choćby jednej usterki. Nie zmienia to faktu, że spis treści wydaje mi się nazbyt „poszatkowany”, bo miejscami zastosowano 5- piętrowy podział i zdarza się (np. na stronach 26, 30, 64), że na jednej stronie występują cztery tytuły podrozdziałów.

Streszczenie, dobrze, że umieszczone na początku pracy, napisane zostało rzeczowo i z wyczuciem optymalnego stopnia szczegółowości. Ostatnie zdanie wstępu streszczenia zasługuje na uwagę, gdyż w tym jednym zdaniu opisano główne osiągnięcia pracy, pokazano, że są pionierskie dla gatunku fiołka mokradłowego, a przy tym kompletne i szerokie – od spraw ochrony środowiska, poprzez aktywne działania dla ochrony tego gatunku i wreszcie badania molekularne, dotyczące ewentualnych zmian w genomie badanych roślin jako skutków zastosowanych technik, głównie zaś metod *in vitro* i krioprezerwacji. Sądzę, że niewielki odsetek autorów rozpraw doktorskich mógłby zamieścić w streszczeniu podobne zdanie podsumowujące.

Wstęp (Przegląd literatury)

Pierwszą część wstępu stanowi opis systematyczny fiołka mokradłowego, na tle całego, liczego rodzaju *Viola*. Wynika z niego, że niektóre gatunki przynależne do tego rodzaju zamieszkują poszczególne kontynenty, a z kolei inne spotykane są na całej półkuli północnej. Do tych ostatnich zalicza się fiołek mokradłowy. Dalej następuje bliższa jego charakterystyka, zarówno morfologiczna, jak i sposobu rozmnażania. Autor podkreśla, że fiołek mokradłowy wykształca dwa rodzaje kwiatów: zamknięte – w których możliwe jest jedynie zapylanie własnym

pyłkiem, oraz kwiaty otwarte, które są zarówno samo- jak i obcopolne. Tu chciałbym zapytać autora, czy napotkał informacje na temat procentowego udziału jednych i drugich rodzajów kwiatów, czy jest on mniej więcej stały, czy może poszczególne osobniki różnią się między sobą pod tym względem. Problem ten jest interesujący, ponieważ rozumiem samo- i obcopolność, jako drastycznie różne „podejścia” do rekombinacji genetycznej w potomstwie. Samopolność zawęży pulę genów rośliny rodzicielskiej, bowiem jeżeli pewne geny nie znajdują się w żadnej z gamet, wówczas nie znajdują się także w organizmie potomnym i w dalszych kolejnych pokoleniach. Czy więc nie zachodzi obawa, że po pewnej liczbie pokoleń powstałych w wyniku samozapylenia ta linia organizmów może być znacznie zubożona genetycznie? Z drugiej strony rozumiem strategię, że samopolność daje przynajmniej pewność zapylenia, w wyniku którego powstaną nasiona, o co przy obcopolności kwiatów otwartych może być trudno, jeśli poszczególne rośliny są od siebie znacznie przestrzennie oddalone. Sytuację „ratują” kwiaty otwarte, w których dochodzi do obcopolności. Czy można byłoby określić, jak często w linii kolejnych generacji następuje samo- albo obcopolność?

I druga kwestia – czy stan zagrożenia fiołka mokrzałowego jest rezultatem zmian w jego środowisku, np. w wyniku osuszania mokradeł, pozyskiwania torfu, może zanieczyszczenia środowiska, czy zbyt często występującej samopolności, a może wreszcie z zupełnie innych przyczyn?

Dwie następne części przeglądu literatury poświęcone zostały dwóm „sztandarowym” metodom rozmnażania roślin w warunkach *in vitro*, najczęściej poprzez embrio- lub organogenezę (bezpośrednią lub pośrednią), na pożywkach stałych lub płynnych, albo poprzez przedłużenie żywotności tkanek lub organów w wyniku zamrożenia do temperatury przynajmniej ciekłego azotu (choć lepiej do temperatury ciekłego helu). Sądzę, że w ostatnich latach mikrorozmnażanie poprzez kultury protoplastów stało się trochę mniej popularne. Autor przedstawił obydwie kwestie, może nieco lakonicznie, ale i tak zamieścił wszystkie niezbędne informacje.

Zabrakło mi jednak informacji o skuteczności w przypadku fiołka mokrzałowego, najstarszej i najprostszej metody rozmnażania poprzez odrosty korzeniowe, ukorzenianie oddzielonych pędów bocznych, czy metodą pośrednią – poprzez hodowlę pąków bocznych na podłożach sterylnych. Rozumiem, że zastosowanie tylko takich metod mogłoby nie wystarczyć na przygotowanie rozprawy doktorskiej, ale na przykład już porównanie zmian genetycznych w roślinach uzyskanych w taki niewyszukany sposób oraz w roślinach z warunków *in vitro* i po krioprezerwacji mogłoby przynieść bardzo ciekawe wyniki.

Najwięcej uwagi poświęcił Autor zagadnieniom związanym ze stabilnością (niestabilnością?) genomu badanych roślin po przebyciu którejkolwiek z eksperymentalnych metod mikropropagacji bądź prezerwacji, ewentualnie w zestawieniu z naturalnymi procesami rearanżacji genomu (poszczególnych chromosomów lub ich części, aż do punktowych mutacji), zdarzających się w roślinach w trakcie ich rozwoju ontogenetycznego. Akceptuję takie podejście zwłaszcza, że jest ono zgodne z celem pracy, a ponadto jest zgodne z ogólnym trendem rozwoju metod badawczych w eksperymentalnej biologii, gdzie obserwujemy obecnie prawdziwy „boom” nowych, coraz skuteczniejszych metod biologii molekularnej, a właściwie to metod badania struktury DNA. Rosnąca skuteczność i możliwość automatyzacji, a także opracowanie bibliotek

wyników uzyskanych tymi metodami jest bowiem najskuteczniejszym czynnikiem ich propagacji.

Autor sformułował dwa główne **Cele** przeprowadzonych badań, zagrożonego wyginięciem gatunku fiołka mokrądkowego oraz trzeci cel, który uznałem za pomocniczy. Po pierwsze jest to opracowanie protokołu efektywnego mikrorozmnażania w warunkach *in vitro*, a po drugie zbadanie czy żywe tkanki i organy badanych roślin zdolne są przeżyć zamrożenie w temperaturze ciekłego azotu i następnie z sukcesem przeżyć powrót do temperatur pokojowej, co umożliwiłoby umieścić najcenniejsze okazy w banku tkanek. Przy okazji, czy Autor zbadął, albo wie, że krioprezervacja spoczynkowych nasion jest nieefektywna? Obydwa cele uznaję za klasyczne w pracach nad opracowywaniem technik ratowania zagrożonych genomów. Cel trzeci natomiast stanowi rodzaj weryfikacji „stopnia inwazyjności genetycznej” wcześniej zastosowanych metod, a więc zbadanie i porównanie wpływu tych metod na częstość i zasięg zmian w genomie badanych roślin, na wszystkich poziomach od zmian w całym genomie (ploidalność), poprzez zmiany w strukturze chromosomów, aż do zmian mutacyjnych. Wcześniej publikowane prace innych autorów skupiały się na celu pierwszym, czasami na obydwu, natomiast stabilność genomu zaczęto powszechnie badać dopiero w ostatnich latach, wraz z gwałtownym rozwojem metod molekularnych. Oczywiście z dużym uznaniem przyjmuję osiągnięcia Autora w kwestiach opanowania bogatego zestawu metod molekularnej analizy DNA. Zastanawiam się jednak nad konsekwencjami, w przypadku, gdyby okazało się, że metody mikrorozmnażania są skuteczne, czy nawet bardzo skuteczne, niestety jednak powodują liczne zmiany w genomie, a więc *de facto* zregenerowane rośliny są istotnie różne od roślin matecznych. W skrajnym przypadku mogłyby zostać uznane za nową jednostkę systematyczną. Czy w tej sytuacji uznalibyśmy, że należy raczej zrezygnować ze stosowania tych metod i pogodzić się z nieuchronnym wyginięciem gatunku. A może należy uznać, że ratujemy zmieniony genom i związaną z nim bioróżnorodność, jednak za cenę pogodzenia się z formalną utratą danego gatunku.

Oczywiście akceptuję wszystkie sformułowane cele i przyznaję, że sprowokowały mnie (a ja sam tej prowokacji chętnie się poddałem) do zastanowienia się nad tym problemem, za co Autorowi dziękuję.

Materiał i metody

Część pierwsza tego rozdziału dotyczy pochodzenia roślin matecznych. **Tu chciałem zapytać Autora o to, jakie mogą być jego zdaniem główne przyczyny stanu zagrożenia fiołka mokrądkowego? Czy chodzi tu może o melioracje i w konsekwencji kurczenie się powierzchni mokradeł, czy może o globalne zmiany klimatyczne, które w strefie umiarkowanej mogą skutkować stepowaniem. A może za ten stan jest odpowiedzialne zanieczyszczenie środowiska, albo zanieczyszczenie dopływających do mokradeł wód, może zabiegi chemiczne stosowane w rolnictwie, a może jeszcze inne czynniki.**

W części drugiej opisano sposób przygotowywania eksplantatów (segmentów młodych liści i ich ogonków). Wymienione eksplantaty były hodowane na pożywkach stałych przygotowanych na bazie wariantów pożywki MS, zmodyfikowanych pod względem składu głównych hormonów roślinnych. Regeneranty otrzymywano drogą bezpośredniej organogenezy lub za pośrednictwem kalusa. Ponieważ nie była to embriogeneza, regeneraty wymagały

ukorzenia. Dlatego dla porządku zapytam czy Autor wypróbował (a więc czy takie zjawisko jest możliwe dla fiołka mokradłowego) możliwość rozmnażania go z całych roślin, na przykład poprzez odrosty korzeniowe, czy rozwój pędów bocznych po dekapitacji, na przykład w celu porównania zmian genomowych w takich roślinach i w regenerantach, także tych po krioprezerwacji. Dalej Doktorant opisał metody badania wyjściowego materiału roślinnego, jako wzorca dla otrzymywanych z niego eksplantatów i roślin potomnych, a były to analizy histologiczne oraz cytometria przepływowa, dla oznaczenia wyjściowej ploidalności. Następny podrozdział dotyczył zastosowanych w pracy różnych technik krioprezerwacji materiału roślinnego. Jak domyśliłem się, Autor przyjął generalnie słuszne założenie, że dla krioprezerwacji krytycznymi momentami są: zamrażanie, a następnie roztopianie materiału. Napotkałem jednak publikacje, z których wynika, że czas przebywania materiału roślinnego w warunkach głębokiego zamrożenia, choć teoretycznie nie powinien, jednak niekiedy ma wpływ na procent przeżywających tkanek. Wygląda zatem tak, jakby szybkość procesów biochemicznych (a może biofizycznych) nie spadała do zera w temperaturze LN. Aby to sprawdzić, należałoby dla bezpieczeństwa wydłużyć czas mrożenia tkanek, na przykład do miesiąca, albo dłużej, gdyby to było możliwe. Stosuje się także zamrażanie do temperatury ciekłego helu, ale wiem, że pod względem technicznym jest to bez porównania trudniejsze aniżeli stosowanie temperatury LN. Ostatni rozdział „metodyczny” zawiera opisy zastosowanych przez autora metod cyto- i histochemicznych, a także molekularnych. W tymże podrozdziale Autor opisał kolejno: metodę otrzymywania preparatów ziaren pyłku, określanie ich wymiarów oraz ocenę żywotności, kolejne etapy analizy ISSR, z wykorzystaniem sześciu różnych starterów o powtarzalnych sekwencjach, dla roślin różnego pochodzenia, w celu porównania struktury ich DNA ze strukturą DNA z roślin wzorcowych, np. matecznych, wreszcie pomiar wielkości genomu w cytometrze przepływowym.

Wyniki

W trakcie badań pan mgr Piotr Żabicki uzyskał następujące ważniejsze wyniki:

1. Materiał mateczny różnego pochodzenia (liście i ogonki liściowe) wykazywał zróżnicowany udział komórek o różnej ploidalności: 2C i 4C w liściach i 2C do 8C w ogonkach liściowych, przy czym w liściach komórki o podstawowej ploidalności stanowiły od 75 do prawie 78%, zaś w ogonkach liściowych od 64 do 67%. Są to różnice niewielkie, ale ze względu na charakterystyczną dla tej metody dużą liczbę analizowanych jąder – statystycznie istotne. **Prosiłbym jedynie o wyjaśnienie, czy frakcje jąder 4C są to jądra komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego, gdzie nastąpiła już replikacja DNA, a komórka nie przystąpiła jeszcze do podziału mitotycznego. Rozumiem, że mówimy o organach budowanych w zasadzie przez komórki stałe, niezdolne do podziału mitotycznego, ale nawet w młodych liściach można znaleźć skupiska komórek o cechach merystematycznych. Czy więc są to komórki w fazie S, czy też są to komórki dojrzałe, nie dzielące się, ale zawierające podwójną ilość materiału genetycznego?**

2. Autor zbadał (tab. 1 i suppl. 1) i porównał efektywność regeneracji pędów na 10 pożywkach MS o różnych składach hormonalnych. Eksplantaty liściowe charakteryzowały się wyższą efektywnością bezpośredniej organogenezy (właściwie to pędogenezy) w porównaniu z ogonkami

liściowymi. Tidiazuron okazał się wyraźnym stymulatorem organogenezy. Wyniki te Autor udokumentował bardzo efektownymi fotografiami makro, a także zdjęciami preparatów histologicznych oraz tkanek obserwowanych w mikroskopii konfokalnej. Dopiero w suplemencie 2 Autor ujawnił szczegółowe, bardzo interesujące wyniki na temat przeżywalności pąków przybyszowych po odcięciu z eksplantów. Wynika z nich, że opracował skład hormonalny pożywki, na której pąki te przeżywają nawet w 90%.

3. Doktorant miał szczęście, że trafił na gatunek podatny na ukorzenianie pędów zregenerowanych w warunkach *in vitro*, a także na aklimatyzację do warunków naturalnych. Z doświadczenia mojego zespołu wiem, że na przykład pędy roślin bobowatych ukorzeniają się i aklimatyzują niezwykle trudno. W każdym razie, w recenzowanej pracy około 90% roślin wytworzyło korzenie i następnie zaaklimatyzowało się na poletkach doświadczalnych. Jest to imponujący wynik, który może mieć znaczenie dla pozytywnej weryfikacji miokrorozmnażania, jako metody ochrony gatunkowej fiołka mokrądlowego. Uprawa roślin z tak dobrym wynikiem na poletku doświadczalnym pozwala mi **zapytać, czy w trakcie jej trwania Autor doszedł do wniosku, że fiołek mokrądlowy faktycznie wymaga bardzo wilgotnego podłoża, czy tylko wymaga takich warunków, które przecież mogą oznaczać niedobór tlenu i wystąpienie w strefie korzeniowej stresy hipoksji. Czy zatem jest on „mokrądlowy”, bo wymaga takich warunków, czy też je wytrzymuje?**

4. Autor wykazał, że różne metody krioprezerwacji charakteryzują się skrajnie różną efektywnością, której miernikiem jest podejmowanie przez zamrożone i rozmrożone tkanki przejawów aktywności rozwojowej, np. regeneracji kalusa lub pędów. To jednak jest tylko część sukcesu, ponieważ określił On, że niektóre warianty zamrażania pozwalają uzyskiwać setki zregenerowanych pędów, co jak na metodę prowadzoną w ściśle laboratoryjnej skali jest świetnym wynikiem. Wyniki tabelaryczne zostały uzupełnione przez efektowne fotografie. Jednak przyznam się do cienia niepewności, związanej z krótkim czasem przebywania tkanek w stanie zamrożonym.

5. Doktorant uzyskał wynik wskazujący, że chasmogamiczne kwiaty rozwijające się na roślinach z naturalnego środowiska nie różnią się budową anatomiczną od kwiatów z roślin zregenerowanych w warunkach *in vitro*. Podobnie, kwiaty w obydwu grupach roślin zawierają ziarna pyłku nieróżniące się wielkością ani poziomem żywotności.

6. Rośliny uzyskane metodami *in vitro* wykazywały dobrą zgodność genetyczną z roślinami macierzystymi, co wykazano na podstawie analizy markerów ISSR. Zgodność ta była szczególnie duża u roślin poddanych krioprezerwacji, co wykazano zarówno metodami numerycznymi i analizą wyników tabelarycznych, metodami graficznymi, takimi jak analiza głównych współrzędnych, analiza dendrogramów czy analiza sąsiedztwa, a także analizując bardzo podobne lokalizacje i intensywności prążków po elektroforezie markerów ISSR.

7. Jądra komórek 2C z roślin ze stanowisk naturalnych, z regenerantów oraz z roślin po krioprezerwacji nie różnią się statystycznie pod względem ilości zawartego w nich DNA.

Podsumowując stwierdzam, że doktorant przeprowadził kompletne badania, zmierzające do wszechstronnej oceny przydatności metod mikrorozmnażania w warunkach *in vitro*, a także krioprezerwacji, zastosowanych do ochrony na terytorium Polski gatunku *Viola stagnina*, wykazując przy tym, że obydwie metody nie wprowadzają zaburzeń w genomie tych roślin albo też zaburzenia te są znikome i nieistotne statystycznie, a więc metody te mogą być bezpiecznie zastosowane. Wyniki te są przykładem obiektywnej i uzasadnionej naukowo metodologii badań w zakresie ochrony środowiska lub ochrony bioróżnorodności. W moim przekonaniu oceniana rozprawa zawiera wiele wartościowych wyników, w zupełności wystarczających na bardzo dobrą rozprawę doktorską.

Dyskusja

Pan mgr Piotr Żabicki odniósł się do wyników swoich badań w trzech grupach zagadnień: mikrorozmnażanie, krioprezerwacja oraz zbadanie, czy zastosowane metody, mające w założeniu pomóc zagrożonemu gatunkowi, nie zaburzają jego genetycznej (genomowej) struktury poprzez wprowadzenie przypadkowych zaburzeń do struktury DNA i zamiast pomóc ochranianym roślinom, sprowadza na nie dodatkowe niebezpieczeństwo. Tak przeprowadzoną dyskusję uważam za rzetelną i wystarczająco wszechstronną i zwiększającą zaufanie czytelnika (także recenzenta) do przedstawionych wyników badań.

Podsumowanie

Autor podsumował wyniki swojej pracy, formułując podsumowanie, a następnie końcowe wnioski. Nie miał z tym żadnego problemu ze względu na dostatek ciekawych i wartościowych wyników, stąd również i ja nie miałem żadnych problemów z zaakceptowaniem, zarówno podsumowania, jak i wniosków. Jedyne, co mogę w tym momencie zrobić, to zachęcić, aby Doktorant zamieścił wśród wniosków końcowych punkt, z którego będzie wynikało, że opisana metoda powinna być z powodzeniem zastosowana przynajmniej dla innych gatunków z rodzaju *Viola*, umieszczonych w Polskiej Księdze Gatunków Zagrożonych, a także informacja, że niniejsza rozprawa stanowi pierwsze w literaturze, tak całościowe opracowanie programu ochrony zagrożonego gatunku. A już na sam koniec, znając polskie realia kontaktów z Ministerstwem Ochrony Środowiska, zachęcam jednak Autora do śmielszych planów aniżeli tylko umieszczenie zregenerowanych i zaaklimatyzowanych roślin w ogrodzie botanicznym. Zamykanie zagrożonych roślin w kolekcjach ogrodów botanicznych jest bowiem działaniem podobnym do zamykania w rezerwach Indian, czy ostatnich przedstawicieli innych pierwotnych populacji, oficjalnie w celu ochrony przed wyginięciem

Spis literatury

Nie mam uwag, co do doboru cytowanych publikacji, których autor zebrał wystarczającą liczbę, zwłaszcza, że znakomita większość cytowanych pozycji przeszła wcześniej pozytywną weryfikację w redakcjach poszczególnych czasopism.

Wniosek końcowy

Wyrażam zdecydowaną opinię, że przedstawiona przez pana Piotra Żabickiego rozprawa doktorska doskonale, wpisuje się w wysiłki botaników w kierunku opracowania i weryfikacji metod ochrony zagrożonych gatunków roślin, zwłaszcza tych opartych o nowoczesne metody badawcze, posługujące się coraz bardziej różnorodnymi technikami, takimi jak krioprezerwacja, czy przede wszystkim metody badań molekularnych. W tym znaczeniu mgr Żabicki w swojej rozprawie wytyczył nowe drogi badawcze i pokazał nowe cele przyszłych badań.

Przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie kryteria wymagane dla dysertacji doktorskiej, a wielością przedstawionych wyników i merytoryczną wagą większości z nich, plasuje ją w szeregu tych najlepszych. Wnioskuje więc o dopuszczenie Pana mgr Piotra Żabickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Doceniam aktualny charakter tematu rozprawy, jej logiczny zamysł i założone cele, a także uzyskanie wielu, cennych wyników, posługujących się licznymi i, co najważniejsze, różnorodnymi technikami badawczymi. Powtórzę to, co napisałem wcześniej, że mgr Żabicki w swojej rozprawie wytyczył nowe drogi badawcze i pokazał nowe cele przyszłych badań, w najskromniejszym zakresie dotyczących innych zagrożonych gatunków z rodzaju *Viola*. Ważne jest też i to, że niniejsza rozprawa jest w literaturze naukowej pierwszym tak wszechstronnym podejściem do zagadnienia ochrony gatunkowej. Daje mi to podstawy do złożenia wniosku o wyróżnienie pracy, z nadzieją, że te tak potrzebne badania będą w przyszłości kontynuowane.

Ludek 22.03.2017



Prof. dr hab. Franciszek Dubert