

Dr hab. Alina Trejgell  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii  
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń  
tel. (56) 6112509, e-mail:trejgell@umk.pl



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Biologii  
i Ochrony Środowiska

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**pt: Wykorzystanie androgenezy, gynogenezy oraz poliploidyzacji do przywracania płodności roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.)**

**Autor: Przemysław Kopec**

Promotor: prof. dr hab. Agnieszka Płażek

Promotor pomocniczy: dr hab. Ewa Dubas

Gwałtowny rozwój przemysłu od wielu lat powoduje wzrost zapotrzebowania na energię elektryczną. Do tej pory pochodziła ona głównie ze spalania węgla kamiennego i brunatnego lub ropy naftowej, czyli nieodnawialnych źródeł. Jednak nadmierna eksploatacja tych surowców kieruje uwagę przedsiębiorców, a co za tym idzie naukowców, na poszukiwanie alternatywnych rozwiązań pozyskiwania energii. Największy potencjał pod tym względem wydaje się posiadać biomasa pochodzenia roślinnego. Do najbardziej znanych gatunków wysokoenergetycznych należą: *Salix viminalis* var. *gigantea*, *Sida hermaphrodita*, *Helianthus tuberosus*, czy gatunki z rodzaju *Populus*, a wśród traw wymienia się głównie *Spartina pretinata*, *Andropogon gerardi* oraz gatunki z rodzaju *Miscanthus*. W przypadku tych ostatnich są spełnione wymagania stawiane gatunkom wysokoenergetycznym: szybki przyrost biomasy (rośliny typu C4) i małe wymagania glebowe. Jednak *Miscanthus × giganteus*, który był obiektem badawczym w przedłożonej rozprawie doktorskiej, jest mieszańcem międzygatunkowym, który powstał w wyniku krzyżówki *M. sacchariflorus* z *M. sinensis*, allotriploidem zawierającym w jądrach

komórkowych 57 chromosomów. Gatunek ten jest rozmnażany jedynie wegetatywnie (podział kłacyjny), co utrudnia selekcję pożądaných cech użytkowych. W związku z powyższym wybór tematu rozprawy doktorskiej jest wysoce zasadny i wpisuje się w problematykę upraw gatunków wysokoenergetycznych, która jest podejmowana w ostatnich latach na całym świecie.

Rozprawa liczy 135 stron i napisana została w języku polskim oraz uzupełniona streszczeniem w języku angielskim. Układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analiza wyników zostały zrealizowane przez doktoranta w sposób prawidłowy.

Dwustronicowy wstęp i przegląd literatury liczący 19 stron to *de facto* wstęp z krótkim wprowadzeniem, w którym doktorant przedstawia istotność proponowanych badań oraz opisuje obiekt badawczy, pochodzenie, biologię i możliwości wykorzystania Miskanta olbrzymiego. W dalszej części wstępu szczegółowo opisana jest specyfika przebiegu mejozy roślin poliploidalnych oraz omówiony został przebieg proces andro- i gynogenezy oraz warunki, które inicjują ten proces w kulturach *in vitro*. Wstęp kończy omówienie metod otrzymywania poliploidów.

Uwagi do tej części pracy: W wyniku przebiegu mejozy powstają 4 komórki haploidalne, spory, które dają nie jak sugeruje doktorant początek gamet, ale z których rozwijają się gametofity (choć bardzo silnie zredukowane u roślin okrytonasiennych). Użyto zbyt dużego skrótu myślowego. Ponadto przy opisie metod wykorzystywanych do otrzymania haploidów na drodze gynogenezy w mojej opinii zabrakło przykładu kultur izolowanych komórek jajowych, techniki rzadko wykorzystywanej, ale stosowanej także w Polsce. **Czy doktorant mógłby wskazać ośrodek lub badacza, który dysponuje umiejętnościami regeneracji roślin tą techniką?**

Cel pracy przedstawiono na 2 stronach, podając cel nadrzędny, a następnie uszczegółowiono go w postaci powiązanych w spójną całość celów cząstkowych.

Zaplanowany ciąg eksperymentów miał prowadzić do uzyskanie osobników *Miscanthus x giganteus* zdolnych do rozmnażania płciowego. Badania zaplanowano w kilku etapach: badania wstępne, które miały z jednej strony wskazać gdzie leży przyczyna sterylności Miskanta, a z drugiej oszacować szansę uzyskania roślin haploidalnych na drodze andro- i gynogenezy. Ponadto określono fazy rozwoju gametofitu męskiego na podstawie cech morfologicznych, co umożliwiło pobieranie materiału wyjściowego w określonej fazie rozwojowej. Natomiast badania zasadnicze miały na celu uzyskanie osobników haploidalnych i ich poliploidyzację w celu przywrócenia płodności. Zamieszczony na końcu tego rozdziału schemat obrazuje cały zakres zaplanowanych badań.

W tym miejscu nasuwa się jednak pytanie **czy podwojone haploidy uzyskane na drodze androgenezy/gynogenezy, a następnie poliploidyzacji będą charakteryzowały się tak intensywnym przyrostem biomasy?** Cecha ta wynika bowiem ze zjawiska heterozji i jest następstwem krzyżówki pomiędzy *M. chińskim* i *M. cukrowym*.

Materiał i metody zamieszczono na 21 stronach. Opisy metod są szczegółowe i możliwe do odtworzenia. Skład pożywek, warunki wstępnego traktowania materiału do indukcji andro- i gynogenezy oraz poliploidyzacji przedstawiono w tabelach.

Uwagi do tej części rozprawy: W badaniach żywotności pyłku zastosowano szereg metod barwienia pyłku, jednak metody te wskazują raczej na prawidłowo wykształcone i uwodnione ziarna pyłku. Najbardziej miarodajna wydaje się metoda oceniająca aktywność peroksydaz (można było dodatkowo wykonać test tetrazolinowy). Jednak najlepszą metodą wydaje się zbadanie kiełkowania pyłku. Analizując dorobek publikacyjny doktoranta stwierdziłam jednak, że takie badanie zostało wykonane, a jego wyniki zostały zamieszczone w publikacji, której pan Kopeć jest współautorem.

Kolejna uwaga dotyczy zastosowanej nomenklatury. Eksplantaty do badań pobrano z 3 stref wiechy: dolnej, środkowej i górnej, **czy nie lepiej byłoby nazwać je proksymalną, centralną i dystalną?**

Do tej części pracy mam także kilka uwag edytorskich. Uważam, że sposób przedstawienia składu pożywek do poszczególnych typów kultury powinien być ujednolicony i przyjąć formę wzorowaną na tab. 6 str. 48, która jest najczytelniejsza. Podobnie warunki wstępnego traktowania materiału w kulturach pylnikowych, załączni i pąków kwiatowych powinny być przedstawione łącznie w 1 tabeli, ponieważ zastosowano identyczne warunki szoku termicznego (temperatura i czas).

Najobszerniejszą częścią rozprawy jest opis i analiza uzyskanych wyników, które przedstawiono na 43 stronach, zebrano je w formie 11 tabel i 10 wykresów a dla lepszego ich zilustrowania zamieszczono dokumentację fotograficzną, która obejmuje 20 plansz ze zdjęciami. Opis wyników jest bardzo precyzyjny i dobrze koreluje z danymi zamieszczonymi w tabelach i na wykresach, jedynie dane z tabeli 23 zostały niewłaściwie opisane. Doktorant podaje, że 510 kalusów poddano poliploidyzacji, wliczając w to kontrolę, która nie była poddawana tej procedurze.

Warto podkreślić, że przeprowadzone badania wykonane zostały bardzo strannie, a frekwencja prób i ilość powtórzeń jest imponująca i nie pozostawia żadnych wątpliwości, co do ich rzetelności. Doktorant dysponuje dobrym warszatem zarówno w dziedzinie biologii komórki, jak i technik *in vitro*, o czym świadczy chociażby uzyskana efektywność regeneracji z pąków kwiatowych dla *Miscanata*, wyższa niż w badaniach prowadzonych wcześniej przez innych badaczy.

Materiał badawczy stanowiły 2 zróżnicowane genetycznie klony *Miscanta olbrzymiego*, jak wynika z przeprowadzonych i opublikowanych badań (doktorant jest współautorem tej pracy). W rozprawie jednak brak odniesienia, **czy użyte w badaniach klony reprezentują**

oba klony (Hornum i Harvey) pochodzące z niezależnych sprowadzeń do Europy z Japonii, czy zróżnicowanie jest następstwem długoletniej propagacji w kulturze *in vitro* i wynika ze zmienności somaklonalnej. Czy któryś z zastosowanych w badaniach klonów odpowiada klonowi MG1 użytemu w badaniach przez dr Glowacką? Doktorant podkreśla ogromny wpływ genotypu na indukcję androgenezy i gynogenezy, z czym się w pełni zgadzam. **Czy doktorant nie rozważał możliwości zastosowania w badaniach oceniających wpływ tego czynnika klonów sprowadzonych z Illinois, które powstały z nowych przekrzyżowań ?**

W wynikach nie uwzględniano czynnik topofizycznego, który u wielu gatunków może mieć wpływ na efektywności indukcji kalusa i regenerację pędów. **Czy doktorant nie obserwował jego wpływu na regenerację?**

Do indukcji androgenezy zastosowano ponad 90 rodzajów traktowań materiału, co daje dużą dozę informacji dla przyszłych badaczy podejmujących ten interesujący temat. Jestem przekonana, że w dobie poszukiwania alternatywnych źródeł energii uprawa Miskanta oraz ulepszanie jego cech użytkowych będzie niejednokrotnie podejmowana. Jednak w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej użyto jedynie pożywek zawierających w swoim składzie 2,4-D i kinetynę, wcześniej stosowanych do indukcji androgenezy u kukurydzy, gdzie okazały się bardzo efektywne. **Dlaczego doktorant nie pokusił się o przetestowanie przynajmniej 1 podłoża zawierającego BAP?** W badaniach wstępnych i wcześniej prowadzonych przez innych badaczy stwierdzono pozytywną reakcję tkanki Miskanta na obecność tego regulatora wzrostu w podłożu indukującym kalus. Również do indukcji androgenezy u zbóż wykorzystywana jest BAP np. u pszenicy (Zheng).

Na koniec uwagi edytorskie. Na str. 59 błędnie wskazano numer ryciny przedstawiającej żywotność pyłku i nie zacytowano w tekście zdjęć 11d i e.

Sugerowałabym także zmianę tytułów tabeli 16, 17 i 18 na „Wpływ składu pożywki indukującej na efektywność odpowiednio: w tab. 16 -powstawania tkanki kalusowej na pąkach kwiatowych, w tab. 17- regeneracji zielonych pędów i w tab. 18- powstawania tkanki kalusowej na eksplantatach kwiatostanowych”. Na rycinie 19 przedstawiono zdjęcie ukazujące regenerację pędów, materiał umieszczony jest w magencie, jednak w tekście mowa o szalkach. Numeracja ryciny 21 (tekst) dotyczy zdjęcia oznakowanego jako 20 str.76. W opisie rycin 14 i 21 sugerowałabym pominąć nazwy substancji użytych w celu ograniczenia ciemnienia tkanek, ponieważ są one podane przy każdym ze zdjęć. Wyniki dotyczące analizy liczby chromosomów w komorach kalusa poddanych poliploidyacji przedstawiono na ryc. 30, w tekście jednak jest błędnie oznaczona jako 25, podpis tej ryciny jest niezrozumiały.

Zauważyłam także błędy stylistyczne: na str. 61 sformułowanie, nieprawidłowo rozwiniętym gametofitom oraz degenerującym, zmieniałabym na nieprawidłowo rozwiniętym oraz degenerującym gametofitom, w zdaniu na str.84 „Wysoką przeżywalnością wyróżniły się procedury, w których oddziaływano na rośliny ..”, sformułowałabym: Wysoką przeżywalnością wyróżniały się rośliny, które poddano procedurom... Ponadto na str.85, doktorant rozpoczyna zdanie od cyfry, co nie jest poprawne językowo.

Interesującą częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział Dyskusja liczący 16 stron. Napisany jest w sposób jasny i logiczny, a uzyskane wyniki doktorant skonfrontował z danymi opublikowanymi przez innych badaczy dla różnych gatunków Miskanta jak i innych traw. Jedyne wątek dotyczący syntezy antocyjanów przez tkankę kalusową indukowaną w warunkach świetlnych został pominięty, najprawdopodobniej z powodu braku bezpośredniego związku z tematem rozprawy doktorskiej. Wiadomo jednak, że biosynteza tej grupy związków stanowi zasadniczy element odpowiedzi rośliny na stres, jakim w tym przypadku mogło być duże natężenie światła. Ponadto na str. 110 doktorant wspomina o szoku genowym związanym z poliploidyacją komórek, jednak w opisie omyłkowo podaje, że do tego zjawiska może dochodzić przy haploidyacji Miskanta, a nie poliploidyacji.

Rozprawę doktorską wieńczą wnioski, które doktorant stawia po przeanalizowaniu uzyskanych wyników.

Dobór literatury uważam za dobry, w przygotowaniu wstępu i dyskusji wyników wykorzystano 217 pozycji literatury. Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania do opracowania rozprawy nie tylko piśmiennictwa najnowszego, ale także starszych pozycji. Jednak brakuje w moim odczuciu publikacji prof. Anny Majewskiej-Sawki i prof. Marii Gośki, które od lat zajmują się trawami z rodzaju *Miskant*.

### **Podsumowanie**

Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury oraz bogatym warsztatem badawczym. Sposób zaplanowania doświadczeń i ich wykonanie świadczy o tym, że autor jest dojrzałym eksperymentatorem i poszukuje rozwiązań problemów, na jakie natrafia podczas realizacji badań. Wspomniane przeze mnie powyżej krytyczne uwagi nie obniżają ogólnej oceny rozprawy.

W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska pana mgr Przemysława Kopcia spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wg Ustawy z dnia 14.03.2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w artykule 13 Ustawy (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późn. zm., nowelizacja Dz. U. 2011 nr 84 poz. 455, Dz. U. 2014, poz. 1198). Ponadto dorobek naukowy doktoranta uzasadnia jego starania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomii. Wnioskuje do Rady Wydział Rolniczo-Ekonomiczny Uniwersytetu Rolniczego *im. Hugona Kołłątaja* w Krakowie o przyjęcie dysertacji i dopuszczenie pana mgr Przemysława Kopcia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Tujecki