

Prof. dr hab. Teresa Cegielska-Taras
Instytut Hodowli Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Poznaniu
Zakład Hodowli i Genetyki Roślin Oleistych

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Kopcia p.t:
**„Wykorzystanie androgenyzy i gynogenyzy oraz poliploidyzacji do przywracania
płodności roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus* Greef et Du.)”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Przemysława Kopcia została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Agnieszki Płazek w Katedrze Fizjologii Roślin Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pomocniczym była Pani dr hab. Ewa Dubas.

I Przedmiot rozprawy oraz naukowe znaczenie

Głównym celem podjętych badań przez mgr. Przemysława Kopcia była ocena możliwości otrzymywania płodnych roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus* Greef et Du.), który jest z natury niepłodnym triploidem, głównie z powodu niezgodności mieszańcowej.

Strategia badań obejmowała analizę możliwości uzyskiwania płodnych roślin miskanta olbrzymiego, poprzez otrzymanie haploidów metodami kultur *in vitro* androgenyzy i gynogenyzy oraz poliploidyzację poprzez użycie substancji zaburzających kariokinezę. Takie podejście otrzymywania płodnych roślin miskanta olbrzymiego, wymienionymi metodami, było bardzo trudne i bardzo ryzykowne w uzyskaniu pozytywnego efektu badań. Natomiast wyniki przeprowadzonych bardzo szczegółowych badań podstawowych dotyczących kultur: *in vitro*: androgenyzy i gynogenyzy, a także cytogenetyki gametofitu męskiego i żeńskiego, kariotypu miskanta w kilku aspektach oraz studia nad poliploidyzacją tej triploidalnej rośliny, przyczyniły się niewątpliwie do pogłębienia wiedzy o biologicznej naturze miskanta olbrzymiego.

II Struktura pracy

Praca jest obszerna z bardzo szczegółowymi opisami poszczególnych etapów badań, liczy 135 stron maszynopisu, w tym 19 stron spisu literatury, z około 217 pozycjami w j. polskim i angielskim. Dziesięć stron przeznaczonych zostało na strony tytułowe, wstęp, streszczenia w j. polskim i angielskim oraz spis treści. W pracy zamieszczono 32 ryciny (wykresy, diagramy, obrazy preparatów mikroskopowych cytogenetycznych) oraz 23 tabele.

Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych, praca jest starannie opracowana edytorsko.

Przegląd literatury, (19 stron), podzielony jest na cztery części. Dotyczą one charakterystyki miskanta, specyfiki przebiegu mejozy u poliploidów, procesu androgenyzy *in vitro* i gynogenyzy *in vitro* oraz metod uzyskiwania poliploidów. Przegląd literatury obejmuje zagadnienia ściśle związane tematyką pracy i jest prawidłowo udokumentowany.

Rozdział materiał i metody (21 stron) jest podzielony na cztery części. Wpierw Autor opisuje materiał roślinny i jego pochodzenie. Po czym następuje szczegółowy opis metod wykorzystanych w prowadzonych tzw. badaniach wstępnych: w analizie przebiegu mikrosporogenyzy u miskanta olbrzymiego, w określeniu markera morfologicznego, długości pędu skorelowanego z rozwojem gametofitu męskiego, w analizie żywotności ziaren pyłku, w

analizie przebiegu megasporogenezy, indukcji tworzenia kalusa oraz stymulacji do rozwoju pędów z tej tkanki. Kolejną część tego rozdziału zajmuje opis metod stosowanych w badaniach zasadniczych: indukcji androgenozy *in vitro*, indukcji gynogenezy *in vitro*, kulturze pąków kwiatowych, w kulturze załazni i poliploidyzacji miskanta olbrzymiego oraz w analizach cytogenetycznych. Ostatnią częścią tego rozdziałem jest opis stosowanych metod statystycznych w analizie uzyskanych wyników.

Rozdział wyniki zawiera 42 strony tekstu wraz z rycinami i tabelami, diagramami i wykresami oraz obrazami preparatów cytogenetycznych. Ta część pracy doktorskiej jest podzielona na osiem części. Układ treści w rozdziale wyniki jest uporządkowany zgodnie z opisem stosowanych metod. W pierwszym podrozdziale omówiono wyniki badań nad przebiegiem mikrosporogenezy, doбором fazy rozwojowej gametofitu męskiego, określeniem żywotności ziaren pyłku. W dalszej części następuje prezentacja wyników badań nad megasporogenezą i rozwojem gametofitu żeńskiego. Znaczną część tego rozdziału zajmuje opis uzyskanych wyników z badań nad czynnikami wpływającymi na proces androgenozy w kulturze pylników *in vitro* oraz gynogenezę *in vitro* w kulturze pąków kwiatowych oraz izolowanych załazni. Rozdział kończy omówienie wyników badań nad poliploidyzacją roślin i tkanki kalusowej miskanta olbrzymiego.

Dyskusja (15 stron) jest prowadzona zgodnie z układem wyników. Doktorant wykazuje w tym rozdziale szeroką znajomość przedmiotu. Na końcu pracy zamieszczono trzynaście wniosków.

III Ocena merytoryczna

W pracy podjęto się bardzo ważnego zagadnienia, szczególnie dla hodowli, a pośrednio dla uprawy miskanta olbrzymiego, przełamania bariery jego niepłodności. Brak rozmnażania płciowego pozbawia ważną energetyczną roślinę nie tylko łatwego namnażanie materiału siewnego, ale także możliwości poszerzenia zmienności genetycznej tego gatunku.

Wyniki badań miały dać odpowiedź czy zastosowane w dysertacji technologie biotechnologiczne doprowadzą do uzyskania roślin zdolnych do wytwarzania nasion. Był to bardzo ambitny i trudny do zrealizowania cel. Miskant olbrzymi to roślina triploidalna z nieparzystą liczbą chromosomów i jest niepłodny ze względu na brak równowagi genetycznej i zaburzeń w parowaniu chromosomów w mejozie żeńskiej lub męskiej.

Podjęcie Autora do pokonania bariery sterility wykorzystujące androgenezę lub gynogenezę *in vitro* oraz poliploidyzacją miskantusa wydaje się bardzo złożone i skomplikowane w realizacji. Choć w literaturze te trzy metody wskazywane są jako techniki mogące umożliwić otrzymywanie płodnych roślin miskanta olbrzymiego. Dla realizacji wyznaczonego celu Doktorant podjął się badań nad optymalizacją wskazanych metod kultur *in vitro*, przeprowadził szczegółowe eksperymenty nad stymulującą do podziałów gametofitów: męskiego i żeńskiego oraz testował różne substancje antymitotyczne w celu uzyskania heksaploidalnych roślin. Te bardzo pracochłonne badania, pod względem metodycznym, były przeprowadzone poprawnie.

Najpierw uzyskano materiał roślinny z dwóch klonów miskanta olbrzymiego w odpowiedniej kondycji fizjologicznej, jako dawców pylników, pąków i załazni lub tworzenia tkanki kalusowej. Następnie nastąpiło wprowadzenie, (badania wstępne), do przedstawienia wyników badań zasadniczych nad przełamania bariery sterility miskanta olbrzymiego. Doktorant zaprezentował wyniki szeregu przeprowadzonych eksperymentów nad poznaniem przebiegu mikrosporogenezy, określeniem stadium rozwoju mikrospory, oznaczenia żywotności ziaren pyłku metodami, które wskazywały na istnienie części funkcjonalnych ziaren pyłku miskanta olbrzymiego. Ten bardzo interesujący fragment pracy był częściowo opublikowany z współautorstwem Doktoranta.

Wykazana niejednakowa wielkość ziaren pyłku wskazuje na różnicowanie liczby chromosomów, czyli cytologicznie niezbalansowanych, co mogło być przyczyną trudności w indukcji i przebiegu androgenyzy *in vitro*. W badaniach nad stymulacją androgenyzy *in vitro* w kulturze pylników selekcionowano pylniki z mikrosporami w fazie późnojednojądrowej, z roślin po wstępnym traktowaniu i wykładano na dziewięć różnych pożywek, których skład był modyfikowany przez Doktoranta.

W badaniach tych brakuje analizy nad wyznaczeniem odpowiedniej fazy rozwoju mikrospor w pylnikach roślin miskanta olbrzymiego, rozwijających się w warunkach z których był pobierany materiał biologiczny. Doktorant uznał za danymi literaturowym, fazę późnojednojądrową rozwoju mikrospor za podatną do zmiany kierunku rozwoju mikrospory z generatywnego na wegetatywny. Dużym utrudnieniem w prowadzeniu kultury pylników było szybkie ciemnienie tkanek pylnika prawdopodobnie wywołane między innymi stresem izolacji, a żadne z zastosowanych substancji nie powstrzymało proces nadmiernego wytwarzania związków polifenolowych. Nasuwa się pytanie czy w pylnikach wykładanych na pożywki i w ciemniejących pylnikach były żywotne mikrospory. Wydaje się, że efekt ciemnienia i wysychanie pylników wskazywało na zamieranie mikrospor. Doktorant nie wspomina, czy każdorazowo analizowana była żywotność mikrospor w pylnikach wykładanych na pożywki oraz w trakcie ciemnienia tkanki pylnika (po paru dniach).

Badania nad indukcją gynogenezy *in vitro* u miskanta olbrzymiego poprzedzone były analizą przebiegu megasprogenyzy, co było wprowadzeniem do wskazania na trudności z którymi trzeba się będzie zmierzyć w przypadku miskanta olbrzymiego. Tylko w nielicznych załączkach obserwowano prawidłowy przebieg tego procesu rozwojowego. Doktorant wysuwa wniosek, że nieprawidłowości w rozwoju megaspor i woreczków zalążkowych są spowodowane występowaniem zaburzeń mejozy częstych u triploidalanych roślin. Prawidłowy rozwój nielicznych woreczków zalążkowych miskanta olbrzymiego stwarzał, według Autora, szansę na pozytywną indukcję podziału komórki gametofitowej. Także tutaj występowało ciemnienie izolowanych zalążni w krótkim czasie po ich izolacji. Ten fakt wskazuje, jak trudną rośliną jest miskant olbrzymi w eksperymentalnych pracach kultur *in vitro*. Stosowanie substancji zapobiegających wytwarzaniu substancji fenolowych nie było skuteczne.

Badania nad gynogenezą prowadzono w kulturze *in vitro* pąków kwiatowych jak i zalążni. Jednakże nie uzyskano roślin miskanta olbrzymiego poprzez gynogenezę mimo stosowania wielu wariantów pożywek i rodzajów stymulacji. Natomiast z komórek somatycznych pąków kwiatowych poprzez inicjację tkanki kalusowej Doktorant uzyskał rośliny, które okazały się triploidami. Może to być jeszcze jedna technologia mikropropagacji roślin miskanta olbrzymiego w kulturze *in vitro* pąków kwiatowych alternatywna do uznawanej za najbardziej wydajną metodę kwiatostanową. Chociaż można się było spodziewać, tworzenia tkanki kalusowej i regeneracji roślin z tkanek somatycznych pąków, a nie komórki generatywnej w kulturze pąków kwiatowych. Proponuję zweryfikować Tytuł tabeli 16, gdyż obecny może być błędnie zrozumiały, czy to był kalus z komórek somatycznych :” liczba kalusów embriogennych na podłożach indukujących gynogenezę...”.

Doktorant przeprowadzał także badania nad podwojeniem liczby chromosomów roślinom uzyskanym w kulturze *in vitro* z wykorzystaniem niedojrzałych kwiatostanów jak i wytworzonej tkanki kalusowej, stosując substancje antymitotyczne: kolchicynę, oryzalinę, trifluralin, a także kofeinę w różnych stężeniach i różnym czasie traktowania roślin tymi związkami. Uzyskane młode wytworzone pędy po badaniach cytometrycznych w znaczącej części posiadały triploidalną liczbę chromosomów. Tylko kilka nowych pędów była miksploidalna, a dwa pędy były heksaploidalne, które zamierały po paru tygodniach. Pośród stosowanych związków kofeina była najmniej toksyczną dla eksplantatów, ale też nie była skuteczna w podwojeniu liczby chromosomów. Miskant olbrzymi posiada 57 chromosomów,

a uzyskanie roślin o heksaploidalnej liczbie (114) chromosomów co może być wyjątkowo trudne. Chociaż takie doniesienia w literaturze się znajdują.

Doktorat często wspomina o wpływie genotypu na procesy biologiczne: androgenzę i gynogenezę, ale w badań tylko dwa klony miskanta olbrzymiego. Właściwie nie obserwowano i nie udokumentowano różnic reakcji obu genotypów wprowadzonych badaniach. Końcowe wnioski są konstruowane na podstawie uzyskanych wyników i wymagają weryfikacji. Wniosek 6 należałoby uściślić w drugiej części zamiast „Gamety.....niepodatne na indukcję..”, ale gamety miskanta nie były podatne na stymulację tylko na zastosowane w badaniach czynniki indukujące. We wniosku 7 można opuścić słowo „mogą” gdyż stwierdzono występowanie komórek o różnej ...”. Wniosek 11 dotyczy tylko reakcji na badane stężenia tych związków. Wniosek 12 tylko w stosowanym stężeniu „...obniżały...”. Wniosek 13 wymaga weryfikacji - uzyskuje się heksaploidalne pędy, czyli podwojenie jest możliwe.

IV Uwagi szczegółowe

Doktorant nie ustrzegł się od pewnych nieścisłości w pracy i czasami zdarzały się potknięcia w tekście, przytaczam niektóre z nich:

Str. 22. ...w obrębie jednej **rośliny** uprawnej mogą... - powinno być w obrębie jednego **gatunku rośliny** uprawnej mogą... . Ponadto należy unikać określeń, które nie są naukowymi np.: str. 25 - '**niedojrzałe ziarna pyłku**' zamiast „mikrospora”. Ostatnie zdanie na tej stronie też nie jest klarowne; str. 26 '**antymitotyk**' – zamiast substancja antymitotyczna; str. 29 W kulturach tkankowych **presji antymitotyków**...”-?, str.33 i 57 „wykonano **rozgniot**” lub „preparaty **rozgnitowe**”- zamiast preparaty rozgniatane; str. 35 tytuł podrozdziału 4.2.5 ”i jego regeneracji,, regeneracji czego?; str. 36 „...umieszczano 10 kalusów..”- czy były to eksplantaty kalusowe, czy odrębne fragmenty ?; str.36 „powstanie korzeni indukowano przez 4 tygodnie..” – wytworzenie korzeni trwało.....; a „**ukorzenione pędy** „ - to roślina; str.44 „**ziemia ogrodowa**”- zazwyczaj ogrodnicza, chyba, że była pobrana z ogrodu.

W ocenie całości chciałam podkreślić dobry poziom merytoryczny. Cele pracy były ambitne. Przygotowano i wykonano założenia eksperymentalne. Praca jest starannie opracowana.

V. Wniosek Końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Przemysława Kopcia pt. „Wykorzystanie androgenyzy i gynogenezы oraz poliploidyzacji do przywracania płodności roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus* Greef et Du.)” wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, jest wartościowa, zawiera udokumentowane wyniki i świadczy o tym, że Doktorant zna doskonale tematykę związaną z metodami i technikami stosowanymi w biologii eksperymentalnej i potrafi je wykorzystywać w badaniach.

Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawą doktorskim przez Ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w artykule 13 Ustawy (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z póź. zm.) i wnioskuję do Rady Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. *Hugona Kołłątaja* w Krakowie o dopuszczenie mgr. inż. Przemysława Kopcia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Teresa Cegielska-Taras

prof. dr hab. Teresa Cegielska-Taras

Poznań, 17.I.2017