

dr hab. Anna Mięka, prof. nadzw.
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anety Adamczuk

pt. „Modyfikacje morfogenezy lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) typu oleistego i włóknistego w kulturach in vitro”

Praca wykonana pod kierunkiem prof. UwB, dr hab. Iwony Ciereszko i dr Ireny Siegień

Wstęp

Regeneracja roślin w kulturze in vitro jest indukowana za pomocą różnych czynników fizycznych i chemicznych, dobieranych eksperymentalnie. Poznanie ich kombinacji prowadzi do uzyskania efektywnego systemu mikrorozmnażania/produkcji roślin. W praktyce najczęściej warunki te muszą być ustalane dla każdego gatunku z osobna. Prowadzone na różnych poziomach badania nad opisaniem mechanizmów indukujących procesy regeneracji roślin, mogą w konsekwencji doprowadzić do łatwiejszego sterowania losem komórek somatycznych eksplantatów wprowadzanych do kultur in vitro.

W pracy porównano dwie odmiany lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.), oleistą-Szafir i włóknistą-Selena, na etapie wczesnego rozwoju ontogenetycznego siewek oraz podczas kultury eksplantatów hipokotyli traktowanych różnymi warunkami kultury in vitro i wykazujących różne zdolności morfogenetyczne. Reakcję tkanek wyrażono efektywnością organogenezy pędowej i korzeniowej nakładając na to obraz endogennej regulacji obserwowanego procesu morfogenezy w oparciu o wybrane parametry oceny.

Celem badań było porównanie zdolności morfogenetycznych dwóch odmian lnu zwyczajnego oraz określenie mechanizmów regulacji organogenezy przez oddziaływanie wybranymi czynnikami abiotycznymi w kulturze in vitro.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa ma format standardowej pracy doktorskiej. Liczy 226 stron plus 34-stronicowy materiał uzupełniający, na który składają się spisy rycin, tabel i fotografii oraz aneks obejmujący 2 tabele. W pracy zacytowano 312 pozycji literaturowych, z których 1/3 pochodzi z ostatnich 7 lat. Prawie 80% zgromadzonej bibliografii (245 pozycji) to literatura anglojęzyczna. Cytowane prace odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w interesującej tematyce, jednakże ich liczba mogłaby być z powodzeniem zredukowana bez szkody dla przedstawianych zagadnień. Proporcje ilościowe pomiędzy rozdziałami dedykowanymi przeglądowi literatury (29 stron), metodyce (22 strony), wynikom (108 stron) i dyskusji (15 stron) są utrzymane z przewagą części poświęconej wynikom. W tekst wkomponowano 71 rycin, 27 tabel i 13 fotografii opatrzone podpisami. Rozmiary Fot. 6-9, z których każda jest planszą zestawioną z 10-13 obrazów preparatów mikroskopowych, są zbyt małe, przez co niektóre detale omawiane w tekście są na nich niewidoczne. Poza tym fotografie są dobrej jakości. Ryciny i tabele są przejrzyste i opatrzone wynikami analizy statystycznej. Ich łatwiejszą interpretację można było zapewnić poprzez zestawienie wyników na wspólnych wykresach; dotyczy to zwłaszcza % reagujących eksplantatów, liczby pędów, masy. Takie zestawienie pozwoliłoby na przeprowadzenie bardziej kompleksowego/ porównawczego ich omówienia. Spis treści zawarty na 6 stronach jest zbyt szczegółowy, opisowy, a przez to mało czytelny.

Praca jest napisana starannie, poprawną polszczyzną, bez błędów językowych, z wykorzystaniem prawidłowej terminologii naukowej. Zawiera nieliczne literówki.

Ocena merytoryczna

Tytuł oddaje treść rozprawy. **Cel pracy** został jasno określony i konsekwentnie zrealizowany.

Przegląd literatury rozpoczyna się od przedstawienia typów morfogenezy w warunkach kultury *in vitro* i krótkiego scharakteryzowania czynników leżących u podstaw jej indukowania. W tym omówieniu obszerny akapit poświęcony został genomowi związanym z procesem somatycznej embriogenezy (str. 15/16), która nie jest obiektem zainteresowania niniejszej pracy. Kolejne rozdziały opisują czynniki abiotyczne i ich wpływ na morfogenezę. Scharakteryzowano w nich poszczególne fotoreceptory (fitochromy, kryptochromy, fototropiny, zeaksantynę) wskazując ich powiązanie z konkretnym rodzajem światła i rolą w procesach wzrostu i różnicowania roślin. Następnie szczegółowo omówiono zaangażowanie egzogen- i endogennych cukrów oraz hormonów i regulatorów wzrostu (PGRs) w procesy morfogenetyczne *in vitro*. Doktorantka podkreśliła problem współdziałania nie tylko różnych fitohormonów ze sobą, lecz także ich powiązania ze szlakami cukrowymi. Poznanie tych zależności jest istotne dla opisu indukcji procesów różnicowania roślin *in vitro*. Kolejny 2-stronicowy rozdział systematyzuje wiedzę z zakresu odpowiedzi tkanek roślinnych na czynniki abiotyczne. Stanowi on wprowadzenie do szczegółowego scharakteryzowania w kolejnych rozdziałach wpływu stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego na zdolności regeneracyjne roślin w warunkach *in vitro*. Omówienie zależności pomiędzy nadprodukcją reaktywnych form tlenu (ROS) oraz azotu (RNS) jako efektu reakcji tkanek na stres jest wystarczające dla zrozumienia badań podjętych w przedstawionej rozprawie. Uważam, że rozdziały przeglądu literatury powinny nosić następujące tytuły:

- 1.1. Morfogeneza w warunkach *in vitro*
- 1.2. Czynniki abiotyczne wpływające na morfogenezę
 - 1.2.1. Rola światła
 - 1.2.2. Rola węglowodanów
 - 1.2.3. Rola hormonów i roślinnych regulatorów wzrostu
- 1.3. Odpowiedź tkanek roślinnych na czynniki abiotyczne a morfogeneza *in vitro*
 - 1.3.1. Reaktywne formy tlenu (ROS) i ich działanie w warunkach stresowych
 - 1.3.2. Rola ROS w regulacji morfogenezy
 - 1.3.3. Reaktywne formy azotu (RNS) i ich działanie w warunkach stresowych
 - 1.3.4. Rola tlenku azotu (NO) w regulacji morfogenezy

Prace dotyczące kultur tkankowych *linu* zostały wplecione w omawiane zagadnienia przeglądu literatury. **Odczuwa się jednak wyraźny brak rozdziału dedykowanego dotychczasowym osiągnięciom w zakresie mikrorozmnażania *linu* i wykorzystania narzędzi biotechnologicznych do jego ulepszania. Proszę Doktorantkę o syntetyczne nakreślenie tego zagadnienia.**

Rozdział **Material i metody** rozpoczyna się od opisu gatunku *Linum usitatissimum* oraz dwóch jego odmian (Szafir i Selen) będących obiektami eksperymentów. Przedstawiono tu warunki oraz zakres i sposób wykonania analiz. Oprócz obserwacji biometrycznych obejmujących ocenę efektywności organogenezy oraz przyrostu świeżej i suchej masy, wykonano mikroskopową analizę uzyskanych w warunkach *in vitro* procesów regeneracji. Do opisu wykorzystano preparaty półtrwałe i trwałe (przygotowane techniką parafinową) oraz specyficzne barwienia (błękit metylenowy, safranina, zieleń trwała). Do badania mechanizmu regulacji organogenezy zaangażowano analizy spektrofotometryczne, chromatograficzne i spektroskopowe oraz metody specyficzne dla oznaczania aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Zastosowane metody są adekwatne do zrealizowania postawionego celu.
Uwagi do tej części pracy:

1. Uważam za bezcelowe wymienianie składu podstawowych pożywek hodowlanych (Tab. 1; MS, B5 oraz ich prosta modyfikacja), ponieważ są one powszechnie dostępne w katalogach firm oferujących odczynniki.
2. Doświadczenia wykonywano w 5 powtórzeniach i w 3 seriach doświadczalnych. Brakuje informacji co stanowi jedno powtórzenie.
3. W opisie doświadczeń przedstawionych w pkt. 3.5.2 nie zaznaczono, że ich część była wykonana na pożywkach z PGRs (pędowej i korzeniowej), a część bez ich użycia.
4. Używanie terminu „hormony” w odniesieniu do syntetycznych substancji dodawanych do pożywki jest niepoprawne; poprawny termin to roślinne regulatory wzrostu.
5. Str. 53; wiersz 3 od dołu – odwołanie dotyczy Tab. 4 (nie Tab. 5).

Pierwsza część **Wyników** poświęcona jest badaniu efektywności organogenezy pędowej i korzeniowej dwóch odmian lnu. Efektywność wyrażona jest: % reagujących eksplantatów, liczbą pędów/korzeni, świeżą i suchą masą oraz zawartością wody w materiale roślinnym. Porównano wpływ: 1) pożywki MS, B5 i kombinacji MS+B5 w obecności wybranych PGRs; 2) trzech różnych cytokinin na efektywność organogenezy pędowej; 3) trzech różnych auksyn na efektywność organogenezy korzeniowej; 4) dokonano również analizy wzajemnego oddziaływania cytokinin i auksyn na obie drogi regeneracji. Mimo starannego statystycznego i graficznego opracowania wyników, sposób ich przedstawienia znacząco utrudnia wyciąganie wniosków i podążanie za tokiem myślowym Autorki. Wyniki badań zestawiono w osobnych tabelach/wykresach na 24 stronach i omówiono krok po kroku. Bardziej zwarte zestawienie wyników umożliwiłoby nie tylko syntetyczne ich omówienie, ale również ułatwiłoby wyciąganie wniosków. Praca byłaby bardziej dojrzała. Efektem tych badań jest wskazanie rodzaju pożywki (MS dla odmiany Szafir; B5 dla odmiany Selena) oraz PGRs, najefektywniej stymulujących formowanie pędów lub korzeni u badanych odmian na tym etapie prowadzonych badań.

Zastanawiające jest dlaczego Autorka podjęła się opracowania warunków indukowania efektywnej organogenezy korzeniowej? W praktyce bardzo rzadko udaje się odtworzyć roślinę z korzenia, dlatego ta droga organogenezy nie jest wykorzystywana w mikrorozmnażaniu. **Proszę o podanie przykładów roślin, dla których udało się odtworzyć część pędową z uzyskanego wcześniej korzenia.**

W kolejnym etapie badań Autorka przeprowadziła cyto-morfologiczną analizę powstawania pędów i korzeni z eksplantatu hipokotyla pomiędzy 0 a 7 dniem prowadzenia kultury. Załączona dokumentacja fotograficzna wskazuje, że pędy u obu typów lnu różnicują się na drodze organogenezy bezpośrednio. Powstają one z intensywnie dzielących się komórek epidermy i subepidermy hipokotyla. Wraz z wykształcaniem się pąków przybyszowych stopniowo różnicują się ich elementy przewodzące, posadawiające pędy głęboko w tkankach eksplantatu. Korzenie mogą powstawać w dwojaki sposób: boczne z komórek perycyklu; przybyszowe (Fot. 8.7b,c) na drodze organogenezy bezpośrednio lub pośrednio.

Analiza strukturalna przeprowadzona w ciągu pierwszych 7 dni kultury jest podstawą właściwego wyboru odcinków czasowych w jakich pobierano materiał roślinny do badań przeprowadzonych w pkt. 4.15 i 4.16. Dzięki wynikom tej analizy wiemy, że zmiany odnotowane w 5 dniu kultury są związane z indukcją formowania pędów, zaś w 15 dniu z zaawansowanym ich rozwojem. Badania te są więc niezbędne do właściwej końcowej interpretacji wyników.

Do tego rozdziału mam szereg uwag:

1. Przez niewielkie wymiary fotografii utrudnione (lub niemożliwe) jest śledzenie zmian zachodzących w hipokotylach pod wpływem kultury. Być może właśnie to jest przyczyną braku widocznych różnic w budowie kory pierwotnej 7-dniowych siewek lnu typu oleistego i włóknistego. Girault i wsp. (1997; Int J Biol Macrom, 21:179-188) wykazali

obecność komórek włókien w 10-dniowych siewkach *L. usitatissimum* L., var. Ariane (typ włóknisty). **Czy czas zakładania się włókien w lnie typu włóknistego może być skorelowany z rozwojem ontogenetycznym siewek i czy może być specyficzny gatunkowo?**

2. Na zdjęciach nie są wskazane detale, o których mowa w tekście: szparki, komórki brodawkowate, podzielone komórki, skrobia, jądra, jąderka, kambium, centra merystematyczne, itd. Tkanki na przekrojach nie są opisane. Powinna być wskazana epiderma, kora pierwotna, ksylem.
3. Opisy pod obrazami cyto-morfologicznymi informują jedynie o czasie, w którym pobrano eksplantat. Brak opisu merytorycznego sprawia, że zdjęcia nie mogą być analizowane przez czytelnika niezależnie od tekstu. Nie jest to praktykowane w pracach dedykowanych tej tematyce.
4. Fotografie składające się na jedną planszę powinny być ponumerowane kolejno od 1 do x. Przyjęta numeracja związana z dniem wykonanej analizy jest myląca, szczególnie w tekście. Brak informacji o barwieniu.
5. Mięszysz asymilacyjny jest tkanką występującą w liściu, nie w hipokotylu (str. 94) – błąd nomenklatury.
6. Powiększenie na Fot. 6.1 nie pozwala na obserwowanie jąderek, a tym bardziej wnioskowanie o ich powiększeniu się.
7. Fot. 7.5a nie przedstawia szparki. Są tam widoczne zawiązki liści różniące się z wielokrotnie podzielonych komórek epidermy (i być może również subepidermy).
8. Fot. 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.7a, 9.5, 9.7, 9.7a pokazują różnicowanie się korzeni bocznych a nie przybyszowych (jak napisano na str. 98 i 100), które są wyraźnie widoczne na Fot. 8.7b i 8.7c.
9. Obrazy na Fot. 9.2 i 9.7b są zbyt małe, by wyciągać wnioski o wskazanych zdarzeniach/strukturach.

Wyniki analiz spektrofotometrycznych, spektroskopowych i chromatograficznych dostarczają dwójakiej informacji. Analiza całych 7-dniowych siewek pozwala na porównanie lnu typu oleistego i włóknistego (na tym poziomie rozwoju ontogenetycznego), zaś kontrolny eksplantat hipokotyli jest podstawą interpretowania zmian zachodzących w czasie prowadzenia 28-dniowej kultury.

Badania siewek wykazały szereg różnic pomiędzy lnem typu oleistego i włóknistego. Przy nieistotnie różnym poziomie barwników fotosyntetycznych siewki badanych odmian różniły się intensywnością fotosyntezy netto (P_N) oraz zawartością lotnych związków organicznych (LZO) na korzyść odmiany Selenia. Po 28 dniach kultury intensywność fotosyntezy w eksplantatach hipokotyli obu odmian zmalała średnio o 2/3, a oddychania ciemniowego o 1/2; odnotowano również wahania w zawartości LZO. Po tym czasie, w kulturach pędowych odmiany Szafir wykazano zwiększoną zawartość barwników fotosyntetycznych, pozostałe parametry były nieistotnie różne.

W 7-dniowych siewkach odmiany Szafir poziom węglowodanów i glukozydów jest ok. 3-krotnie większy, zaś kwasów alifatycznych i glicerydów, aminokwasów, związków aromatycznych oraz „pozostałych związków” ok. 3-krotnie mniejszy niż w odmianie Selenia. W trakcie kultury hipokotyli tendencje zmian są podobne u obu odmian: pojawiają się alkohole polihydroksylowe, stopniowo maleje udział aminokwasów oraz kwasów alifatycznych i glicerydów. Pod wpływem kultury:

- 1) wielokrotnie zmalała zawartość fenylpropanoidów, flawonoidów i antocyjanów (być może jest to rezultat wycięcia eksplantatu), związków polifenolowych i tanin, oraz aktywność katalazy (CAT);
- 2) zmienna zawartość białka może wynikać z odmiennej dynamiki wzrostu kultur pędowych i korzeniowych;

3) na stałym poziomie utrzymała się aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w odmianie Selena, zaś w odmianie Szafir obniżyła się wielokrotnie.

Uwagi do tej części pracy:

1. Zestawienie obok siebie na jednej stronie (obecnie to 4 strony) kołowych diagramów przedstawiających procentowy udział poszczególnych grup związków zidentyfikowanych w ekstraktach obu odmian (Ryc. 25 i 26) pozwoliłoby na łatwiejszą interpretację wyników. Brak wartości procentowych na diagramach.
2. Mam wątpliwości czy analizowane w rozdziale 4.9 związki fenolowe i polifenolowe oraz antocyjany i taniny zostały prawidłowo określone mianem metabolity wtórne (dotyczy to również wniosku nr 6). Nie są to bowiem związki czynne specyficzne dla lnu.
3. **Czy wśród związków organicznych zidentyfikowanych w ekstraktach metanolowych w poszczególnych grupach można wskazać związki kluczowe dla omawianego u lnu procesu organogenezy?**

W dalszym usprawnianiu efektywności organogenezy badano wpływ podniesionych stężeń sacharozy oraz kombinacji sorbitolu i maltozy. Zmodyfikowane warunki kultury nie wpłynęły na efektywność formowania pędów i korzeni u badanych odmian. Nie zaobserwowano wzmożonej peroksydacji lipidów. Pewne zmiany wystąpiły w zawartości nadtlenu wodoru (H₂O₂).

Kolejne modyfikacje polegały na włączeniu do badań wodnego roztworu nitroprusydku sodu (SNP) - donora tlenu azotu (NO) oraz pożywki zawierającej i pozbawionej PGRs. W doświadczeniach eksperymentalnie ustalono sposób podania SNP (w postaci lotnej działał efektywniej niż podany do pożywki), jego stężenie (5 mM) i objętość (5 ml lub 10 ml). Traktowanie 5ml SNP eksplantatów utrzymywanych na pożywce bez PGRs 1) w stosunku do opracowanych wcześniej pożywek pędowej i korzeniowej, skutkowało 2-krotnym obniżeniem liczby pędów u odmiany Szafir (z 16 do 8), zaś u odmiany Selena ponad 4-krotnym podniesieniem liczby pędów (z 3 do 13) i prawie 10-krotnym obniżeniem liczby korzeni (z 19 do 2/eksplantat po 4 tygodniach kultury); 2) w stosunku do kontroli (bez PGRs), skutkowało brakiem zmian w efektywności formowania pędów u obu odmian, korzenie u odmiany Szafir nie powstały, zaś u odmiany Selena ich liczba nieco wzrosła. Zastosowanie „wymiatacza” NO (c-PTIOU) potwierdziło stymulujący wpływ SNP na organogenezę korzeniową odmiany Selena. Na tej podstawie wybrano ją do zrealizowania drugiej części celu badań tj. określenia mechanizmów regulacji organogenezy. Podjęto się tego poprzez zbadanie: zawartości H₂O₂ i produktów peroksydacji lipidów (reagujących z kwasem tiobarbiturowym), zdolności do redukcji stabilnego wolnego rodnika DPPH, aktywności katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i jej trzech izoform.

Uwagi do tej części pracy:

- 1) Wyniki tej części pracy wskazują, że najwięcej pędów u odmiany Selena otrzymano na pożywce kontrolnej niezawierającej PGRs. Szkoda, że nie podkreślono i nie przedyskutowano tej kwestii w dyskusji. Nie jest to pierwszy przykład uzyskania efektywnej regeneracji bez użycia PGRs u lnu (np. odmiana ‘Mikael’; Burbulis et al. 2009; Zemdirbyste-Agriculture 96(3):168-175), natomiast jest to jedna z niewielu roślin, u której tak „niewyszukana” pożywka może być skuteczna.
- 2) Tytuł rozdziału 4.13.3 sugeruje, że badania były prowadzone na pożywce bez PGRs, co nie jest prawdą;
- 3) W rozdziale 4.13.4 eksplantaty traktowano oparami wodnego SNP na pożywce bez PGRs. Czy kontrola do tych doświadczeń pochodzi również z pożywki bez PGRs? Z metodyki to nie wynika.

Dyskusja jest podzielona na 2 rozdziały. Pierwszy z nich dotyczy najważniejszych aspektów optymalizacji warunków organogenezy in vitro oraz endogennej reakcji tkanek.

W drugim zostały omówione efekty stresowego traktowania i ich wpływ na procesy morfogenetyczne w powiązaniu ze zmianami w aktywności enzymów antyoksydacyjnych i zdolności przeciwwolnorodnikowej. Dyskusja dotyka podejmowanych wątków badawczych i konfrontuje je z literaturą. W jej końcowej części został zaproponowany schemat działania NO na procesy morfogenetyczne w kulturze lnu odmiany Selena (Ryc. 71). Śledząc go odczuwa się jednak pewien niedosyt. Na schemacie uwzględniono bowiem aktywność badanych związków bez rozdziału na czas trwania kultury i objętość użytego roztworu SNP. Interpretacja wyników tak przedstawionych jest niejednoznaczna, ponieważ nie wiadomo którego etapu morfogenezy dotyczy (indukcji czy rozwoju organów?). Proponuję sporządzić 2 osobne schematy, z których pierwszy będzie skupiony na analizie zmian w dniu 5 kultury (tj. w czasie indukcji organogenezy), drugi zaś w dniu 15 kultury (tj. w czasie rozwoju organów), w obecności 5 ml SNP. **Proszę o zwięzłe podsumowanie rezultatów tej interpretacji w czasie publicznej obrony.**

Na schemacie (Ryc. 71) zauważam błąd, który dotyczy sugerowanej poprawy kaulogenezy (nie widać jej na Ryc. 53B i 54B). Reasumując: reakcja na pożywcę „+NAA” wiąże się z poprawą ryzogenezy, zaś na „-NAA” z poprawą ryzogenezy i obfitą kaulogenezą (przy czym udział pędów wielokrotnie przewyższa udział korzeni).

Dyskusja prowadzi do **podsumowania i wniosków** końcowych ujętych w 16 punktach. Mam kilka uwag do tej części pracy.

- 1) Pkt. 1 jest niekompletny, pkt. 2 jest nieprawdziwy. Patrząc pod kątem efektywnej organogenezy można stwierdzić, że badane odmiany lnu różnią się nie tylko wymaganiami co do składu mineralnego pożywki, ale także wymogami odnośnie obecności regulatorów wzrostu.
- 2) Pkt. 10 pozostaje w sprzeczności z wynikami na Ryc. 53B i 54B w zakresie organogenezy pędowej.
- 3) Wykazano, że różnice między typem lnu oleistego a włóknistego są widoczne już w 5-dniowych siewkach. Warto wskazać te różnice.
- 4) Brak wniosku końcowego, który podsumowywałby przydatność prowadzonych badań/uzyskanych rezultatów i ich wkład w naukę.

Wniosek końcowy

Wprawdzie w recenzowanej rozprawie doktorskiej znalazłam szereg uchybień, jak również nie podzielam przyjętego sposobu przedstawienia części wyników i nie zgadzam się ze wszystkimi wnioskami sformułowanymi przez Doktorantkę, to jednak uważam, że przedstawiona praca jest wartościowym opracowaniem z zakresu poznawania zdolności morfogenetycznych lnu. Uzyskane przez mgr Anetę Adamczuk wyniki przyczyniają się do lepszego poznania fizjologicznych mechanizmów leżących u podstaw procesów różnicowania roślin w warunkach kultury in vitro.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymagane kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego zwracam się do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Anety Adamczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/dr hab. Anna Mikula, prof. nadzw./