

Skierniewice, 4 grudnia 2024 r.

Prof. dr hab. Bożena Matysiak
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy

Recenzja
rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Przemysława Marciniaka pt. „Wybrane aspekty
określania stopnia mieszańcowości oraz mikrorozmnażania *Hippeastrum* sp.”

Przestawiona do recenzji praca została wykonana w Samodzielnym Zakładzie Roślin Ozdobnych SGGW w Warszawie. Promotorem pracy jest dr hab. Dariusz Sochacki, a promotorem pomocniczym dr inż. Karolina Nowakowska. Rozprawa doktorska została przygotowana w 2024 r. i przesłana do recenzji na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo SGGW w Warszawie (RD/9/10/2024). Rozprawa doktorska ma formę liczącej 209 stron monografii. Praca do recenzji dostarczona została w formie wydruku.

Zwartnica *Hippeastrum* to geofit o oryginalnych i trwałych kwiatach cieszący się dużą popularnością, produkowany jako roślina doniczkowa i na kwiat cięty. Rosnące znaczenie *Hippeastrum* na rynku kwiatarskim skłania hodowców do wzbogacenia asortymentu o nowości odmianowe. Programy hodowlane oparte jedynie na obserwacjach cech morfologicznych są zazwyczaj długotrwałe i pracochłonne, a niejednokrotnie także obciążone wieloma ograniczeniami. Właściwym celem hodowli, także w przypadku *Hippeastrum*, powinno być maksymalne wykorzystanie potencjału genetycznego w możliwie jak najkrótszym czasie. Ocena zróżnicowania genetycznego z wykorzystaniem markerów molekularnych ma duże znaczenie w początkowych etapach wszelkich programów hodowlanych – od właściwego doboru materiałów wyjściowych do hodowli aż po selekcję odpowiednich form rodzicielskich. Markery genetyczne i molekularne pozwalają wykryć zmienność genetyczną, określić relacje filogenetyczne, różnorodność genetyczną i przyczynić się do powstawania lepszych protokołów hodowlanych. Rozmnażanie *Hippeastrum in vitro* stosowane jest w praktyce ogrodniczej na skalę produkcyjną pozwalającą uzyskać wysokiej jakości materiał rozmnożeniowy, którą warunkuje genotyp i jego zdrowotność. Tradycyjnie w kulturach *in vitro* stosowane są syntetyczne regulatory wzrostu. Metoda kultur *in vitro* może być wykorzystana także w hodowli *Hippeastrum* m.in. do rozmnażania form triploidalnych, które są bezpłodne.

W przedstawionej do recenzji rozprawie, autor podjął się odpowiedzieć na kilka problemów badawczych i poszerzyć wiedzę w zakresie możliwości wykorzystania markerów morfologicznych, genetycznych i molekularnych do oceny zróżnicowania klonów hodowlanych *Hippeastrum* oraz ustalenia pokrewieństwa pomiędzy formami wyjściowymi i klonami potomnymi. Podjął się także udoskonalenia procedur mikrorozmnażania *Hippeastrum*, w tym sprawdzenia możliwości stosowania nowych regulatorów wzrostu – meta-Topoliny, karrikiny i biostymulatorów dodawanych do pożywek *in vitro* oraz na etapie aklimatyzacji *ex vitro*.

Tematyka badań prowadzonych przez doktoranta wpisuje się w nurt badań z zakresu hodowli nowych odmian *Hippeastrum* zapoczątkowany przez prof. Henryka Chmiela w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW w Warszawie pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku, a

kontynuowanych przez dr hab. Dariusza Sochackiego – promotora rozprawy doktorskiej mgr inż. Przemysława Marciniaka.

Pozytywnie oceniam podjęcie się powyższej tematyki badawczej przez autora. Badania mają znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Najbardziej wartościowe klony mogą w przyszłości być zarejestrowane jako pierwsze polskie odmiany zwartnicy pochodzące od *H. ×chmielii*.

Ocena struktury i układu pracy

Z punktu widzenia formalnego praca została przygotowana prawidłowo. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych prowadzonych w naukach rolniczych. Rozprawa podzielona jest na rozdziały: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis wykorzystanej literatury liczący aż 389 pozycji. Całość przedstawionych treści poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca jest napisana bardzo starannie, a dokumentacja wyników w formie tabel, wykresów i rycin przedstawiona jest przejrzysto i czytelnie. Bardzo dobrym uzupełnieniem wyników badań są wysokiej jakości autorskie zdjęcia chromosomów metafazowych, aparatów szparkowych liści, kwiatów, polimorfizmu DNA, a także autorski schemat cech deskryptorowych służących do oceny fenotypowej pędów i kwiatów dla rodzaju *Hippeastrum*.

Mam kilka uwag odnoszących się do struktury pracy. Za zbędne uważam tworzenie rozdziałów z tylko jednym podrozdziałem (2.4.1. czy 5.9.1). Niezrozumiałe jest także, dlaczego wyodrębniono dwa rozdziały odnoszące się do analiz cytometrycznych (rozdział 4.3 i 4.4). W mojej ocenie niewłaściwe jest także zamieszczenie podrozdziału 4.7 dotyczącego oceny stopnia pokrewieństwa klonów hodowlanych *Hippeastrum* i ich form wyjściowych za pomocą markerów RAPD i ISSR wśród podrozdziałów dotyczących optymalizacji metod mikrorozmnazania. Uwaga ta odnosi się do zarówno do rozdziału „materiał i metody” jak i „wyniki”. Podrozdział 4.7 odnoszący się do analizy molekularnej powinien być usytuowany bezpośrednio po zagadnieniach związanych z analizami cytogenetycznymi (ocena poziomu ploidalności i wielkości genomu).

Ocena merytoryczna pracy

Krótki wstęp dobrze wprowadza do tematu pracy. Autor uzasadnia potrzebę wzbogacenia asortymentu *Hippeastrum* o nowości odmianowe oraz udoskonalenia metody mikrorozmnazania tej rośliny z wykorzystaniem proekologicznych biostymulatorów, które mogłyby zastąpić tradycyjnie stosowane regulatory wzrostu w kulturach *in vitro*.

Przegląd literatury oparty jest na bogatej wiedzy literaturowej. W rozdziale tym autor opisuje *Hippeastrum* jako obiekt badawczy, przedstawia dotychczasowe osiągnięcia hodowlane, morfologię i biologię kwitnienia roślin. Następnie opisuje wybrane metody oceny cech morfologicznych roślin z wykorzystaniem deskryptora opracowanego przez Międzynarodową Unię Ochrony Nowych Odmian Roślin (UPOV), wielkości aparatów szparkowych liści, a także wybrane markery genetyczne (liczba chromosomów i wielkość genomu) i molekularne oparte na właściwościach kwasów nukleinowych (RAPD i ISSR) wykorzystywane do analizy zmienności genetycznej i stopnia pokrewieństwa w obrębie populacji. Kolejna część rozdziału dotyczy mikrorozmnazania *Hippeastrum* oraz możliwości optymalizacji pożywki z wykorzystaniem biostymulatorów zawierających aminokwasy (Agro-Sorb Folium), filtrat z glonów morskich (Goemar Goteo), a także stosunkowo nowe i mało poznane regulatory wzrostu, jak karrikena i meta-Topolina. Ostatnia część rozdziału dotyczy roli węglowodanów

w rozwoju geofitów. Rozdział przegląd literatury jest interesujący i obejmuje syntetyczną analizę metod określania stopnia mieszańcowości i możliwości ich wykorzystania do oceny badanych genotypów *Hippeastrum*, co stanowi dobre wprowadzenie do postawionych w pracy celów badawczych. Pozwala także szerzej spojrzeć na aspekt zastępowania regulatorów wzrostu stosowanych w kulturach *in vitro* biostymulatorami. Przegląd literatury wyraźnie wyznacza miejsce w istniejącym dorobku naukowym dla podjętych przez doktoranta badań oraz wskazuje na możliwość wykorzystania cennych form mieszańcowych do zwiększenia postępu genetycznego w hodowli *Hippeastrum*. Cały rozdział jest napisany wnikliwie, skupiający się na najważniejszych aspektach i oparty na obszernej aktualnej literaturze. Mogę stwierdzić, że autor posiada bogatą wiedzę, którą umiejętnie przedstawia. Za zbędne natomiast w tym rozdziale uważam opisywanie barier krzyżowalności przyzgotycznych i postzygotycznych, gdyż ta tematyka nie jest przedmiotem badań (podrozdział 2.4.).

Cel i zakres pracy zostały jasno sformułowane i odpowiadają zakresowi podjętych badań. Autor przedstawił aż 10 hipotez badawczych, mających charakter bardzo szczegółowy. Większość z nich jest uzasadniona i sformułowana w oparciu o szeroki przegląd literatury. Wątpliwość natomiast budzi weryfikowalność hipotezy nr 1 z uwagi na fakt, iż w rozprawie przedstawiono jedynie wybrane cechy UPOV. Hipotezy badawcze 8 i 9 są mało precyzyjnie sformułowane w stosunku do czynnika badawczego jakim jest nawożenie. Autor przewiduje, że „Nawożenie wpływa na wybrane parametry biometryczne roślin...” oraz „Nawożenie wpływa na akumulację skrobi i fruktanów w cebulach *Hippeastrum*”.

Obszerłą część pracy stanowi rozdział opisujący materiał i metody badawcze. Część laboratoryjna i analityczna zostały dobrze opisane. Przewidziona procedura mikrorozmnażania *Hippeastrum* z wykorzystaniem mikrocebul, a także szczegółowy opis eksperymentów dotyczących możliwości zastosowania nowych regulatorów wzrostu i biostymulatorów *in vitro* oraz podczas aklimatyzacji i dalszej 7-tygodniowej powinny umożliwić ich powtórzenie. Wybór i zastosowanie metod statystycznych oraz programu komputerowego do szczegółowej analizy danych molekularnych są odpowiednie i świadczą o dobrym przygotowaniu autora do interpretacji wyników badań. Uważam, że rozdział ten napisany jest w sposób przemyślany i wystarczający.

Rozdział „Wyniki” liczy 71 stron i obejmuje 92 tabele, 15 wykresów i 8 fotografii. Ta część pracy jest bardzo dobrze napisana, a wyniki badań zostały udokumentowane bardzo starannie.

Pierwszą i moim zdaniem bardzo wartościową częścią pracy jest analiza fenotypowa 15 wyselekcjonowanych klonów hodowlanych otrzymanych ze skrzyżowań *H. ×chmielii* i trzech odmian *Hippeastrum hybridum* ‘Gervase’, ‘Rio Negro’ i ‘Royal Velvet’. Szczegółowa analiza pozwoliła na wytypowanie trzech klonów hodowlanych o wyróżniających się cechach względem form matecznych. Klony 0037-13, 0021-10 i 0023-11 wyróżniały się większą liczbą kwiatów w kwiatostanie i szerszym okwiatem oraz odmienną barwą okwiatu w porównaniu do form rodzicielskich. Barwa okwiatu klonu 0037-13 była szaro-fioletowa, a klonów 0021-10 i 23-11 pomarańczowo-czerwona o różnej intensywności wybarwienia z wyraźnymi paskami na działkach okwiatu. **Klony te mogą stać się potencjalnie nowymi polskimi odmianami z uwagi na duże i okazałe kwiaty o ciekawych barwach.**

Następną część pracy poświęcono analizie cech charakteryzujących genom takich jak wielkość oraz liczba chromosomów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Autor potwierdził, że podstawowa liczba chromosomów *Hippeastrum* wynosi $x=11$. Wśród badanych klonów hodowlanych wykryto 15 tetraploidów, 4 triploidy i jeden diploid oraz wykazano duże zróżnicowanie wielkości genomu badanej populacji w zakresie od 32,6 do

62,3 pg. Wyniki badań udokumentowano zdjęciami chromosomów genotypów di-, tri- i tetraploidalnych wybarwianych różnymi metodami. Interesującym odkryciem było wykrycie chimery poliploidalnej w obrębie badanej populacji oraz triploida pochodzącego ze skrzyżowania dwóch tetraploidów. Wykazano, że wykryty jeden diploid (*Hippeastrum* 'Rio Negro') posiada istotnie mniejsze aparaty szparkowe i większą ich gęstość niż wszystkie tetra- i triploidalne formy. Pozytywnie oceniam część pracy poświęconej próbie potwierdzenia podobieństwa genetycznego form wyjściowych i klonów potomnych w oparciu o 30 markerów RAPD i ISSR. Na podstawie sporządzonego dendrogramu autor potwierdził wysokie podobieństwo genetyczne form wyjściowych i klonów potomnych w przedziale 74-85%.

Obszerną część badań stanowiły eksperymenty dotyczące doskonalenia metod mikrorozmnażania *Hippeastrum* z wykorzystaniem mikrocebulek wszystkich 20 badanych genotypów. Autor zastosował cztery modyfikacje składu pożywki MS uwzględniające dodatek biostymulatorów Goemar Goteo i Agro-Sorb Folium oraz regulatorów wzrostu meta-Topoliny i karrikinu KAR₁, a uzyskane wyniki badań zestawiał w 40 odrębnych tabelach. W kolejnych etapach mikrorozmnażania roślin tj. 3-tygodniowym okresie aklimatyzacji do warunków *ex vitro* oraz dalszym, 7-tygodniowym okresie uprawy roślin, autor oceniał wpływ preparatów Goemar Goteo i Agro-Sorb Folium oraz karrikinu KAR₁, a wyniki zestawiał w kolejnych 40 tabelach. Chciałam podkreślić ogrom pracy jaki musiał wykonać autor, aby rzetelnie ocenić wpływ stosowanych regulatorów wzrostu i biostymulatorów na wzrost i rozwój mikrosadzonek w kulturach *in vitro*, aklimatyzację do warunków *ex vitro* oraz dalszą uprawę roślin w podłożach. Autor wykazał, że biopreparaty Goemar Goteo i Agro-Sorb Folium stymulują wzrost mikrosadzonek *in vitro* i potencjalnie mogą zastąpić syntetyczne regulatory wzrostu stosowane tradycyjnie w kulturach *in vitro*. Dodatkowo autor wykazał pozytywny wpływ biostymulatora Geomar Goteo na aklimatyzację oraz wzrost roślin w końcowym etapie uprawy. **Za szczególnie cenne uważam odkrycie stymulującego wpływu karrikinu KAR₁ na wzrost i rozwój roślin *Hippeastrum* we wszystkich etapach mikrorozmnażania począwszy od kultur *in vitro*, poprzez aklimatyzację *ex vitro* i w dalszym etapie uprawy roślin. Co więcej autor wykazał, że cytokinina meta-Topolina hamuje działanie KAR₁. Są to pionierskie badania, w których po raz pierwszy wykorzystano karrikinu w kulturach *in vitro*.** Karrikinu to stosunkowo niedawno opisane związki organiczne występujące w dymie podczas spalania materiału roślinnego. Działanie biologiczne tych związków polega na stymulacji kiełkowania, co zostało potwierdzone dla wielu gatunków roślin. Pozytywne efekty zastosowania karrikinu w kulturach *in vitro* *Hippeastrum* otwiera drogę do dalszych badań i lepszego zrozumienia mechanizmu działania tych związków w regulacji wzrostu i rozwoju innych roślin.

Pozytywnie oceniam część pracy dotyczącą analizy zawartości cukrów zapasowych w cebulach *Hippeastrum* po zakończeniu całego cyklu uprawy roślin. Autor wykazał, że cebule badanych genotypów hodowlanych różnią się pod względem zawartości fruktanów i skrobi. Cukry zapasowe magazynowane w cebulach, zużywane są w okresach niekorzystnych dla rośliny warunków środowiska. Autor wykazał, że zasilanie roślin nawozem Kristalon Zielony (18-18-18) stymuluje wzrost roślin, ale ogranicza gromadzenie skrobi i fruktanów w cebulach *Hippeastrum*, natomiast **karrikina KAR₁ poprawia magazynowanie cukrów zapasowych.** Jest to kolejny, uzyskany przez autora pozytywny i ważny z poznawczego punktu widzenia aspekt działania karrikinu KAR₁. Pewnym uchybieniem w tym rozdziale jest niepoprawne używanie przez autora sformułowania „traktowanie nawozem”.

Pytania, które nasunęły się w trakcie czytania rozprawy doktorskiej:

- 1) Czy zmiana składu chemicznego nawozu użytego do odżywiania *Hippeastrum*, szczególnie w odniesieniu do azotu, mogłaby wpłynąć na zawartość i rodzaj cukrów zapasowych w cebulach?
- 2) Proszę wytłumaczyć uzyskanie osobnika triploidalnego *Hippeastrum* 0050-16 ze skrzyżowania dwóch tetraploidów.
- 3) Najgroźniejsze choroby *Hippeastrum* i czy wystąpiły na odmianach lub klonach hodowlanych.

Podsumowując oceniam, że pan mgr inż. Przemysław Marciniak uzyskał wiele wartościowych wyników i mam nadzieję, że zostaną one wkrótce opublikowane. Chciałam powtórnie podkreślić dużą pracowitość badań, które stały się podstawą rozprawy doktorskiej przedstawionej mi do oceny. Dyskusja poprowadzona jest w sposób wyczerpujący, logiczny i przemyślany. Autor dokonuje oceny fenotypowej klonów hodowanych obejmującej najważniejsze cechy określające dekoracyjność *Hippeastrum* w powiązaniu z analizą genetycznego pokrewieństwa form rodzicielskich z potomstwem oraz analizami cytogenetycznymi. Interpretacja uzyskanych wyników dotyczących rozmnażania *Hippeastrum in vitro*, efektów działania biostymulatorów i regulatorów wzrostu w warunkach *in vitro* i *ex vitro* jest poprawna i prowadzona jest m.in. na tle innych geofitów. Autor wskazuje na zagadnienia, które wymagają dalszych pogłębionych badań i przedstawia motywacje tych badań. Wskazuje na potrzebę badań mających na celu zastąpienie regulatorów wzrostu w kulturach *in vitro* biostymulatorami, a także uwzględnianie ważnej cechy w hodowli geofitów jaką jest zdolność do magazynowania cukrów zapasowych w cebulach, warunkujących dobre przechowywanie cebul, wzrost i kwitnienie roślin, ale także lepsze dostosowanie roślin do zamieniającego się klimatu. Rozprawa kończy się podsumowaniem oraz wnioskami wynikającymi z wykonanych badań oraz przeprowadzonej analizy statystycznej.

Podsumowanie

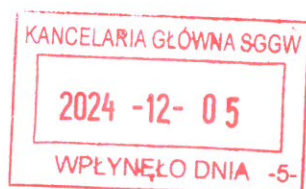
Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym ważnego problemu badawczego. Całość jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z wykorzystaniem właściwych metod, zakładane cele zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Autor wykazał się umiejętnością sformułowania i rozwiązania problemu badawczego i zdolnością krytycznej analizy wyników. Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam określenie stopnia mieszańcowości 15 form *Hippeastrum* z wykorzystaniem markerów morfologicznych, genetycznych i molekularnych, potwierdzenie pokrewieństwa genetycznego z formami rodzicielskimi oraz wytypowanie kilku obiecujących klonów, które mogą potencjalnie stać się nowymi polskimi odmianami. Drugim ważnym osiągnięciem jest zwiększenie wydajności procedur mikrorozmnażania *Hippeastrum*, a także wykazanie pozytywnego wpływu meta-Topoliny, karrikiny oraz biostymulatorów na wybrane cechy jakościowe roślin. Z powyższych względów uważam, że rozprawa jest wartościowym opracowaniem wnoszącym nową wiedzę o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym w zakresie nauk rolniczych. Podkreślenia wymaga wykorzystanie wymagających nabycia umiejętności przez autora wielu technik badawczych i metod obliczeniowych. Na uznanie zasługuje zapewnienie we wszystkich eksperymentach odpowiedniej liczby niezależnych powtórzeń obejmujących wiele roślin, co jest istotne dla zapewnienia jakości i utwierdza w powtarzalności uzyskanych wyników oraz uwiarygadnia przeprowadzone interpretacje. Rozprawa doktorska pokazuje, że mgr inż. Przemysław Marciniak wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, której autorem jest mgr inż. Przemysław Marciniak spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim opisane w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2023 r. poz. 742 z póź. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo SGGW w Warszawie o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania.

Andrzej Małysz

Skierniewice, 4 grudnia 2024 r.

Prof. dr hab. Bożena Matysiak
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
96-100 Skierniewice
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
Tel: 510 208 443
e-mail: Bozena.Matysiak@inhort.pl



Dr hab. Dariusz Wrona, prof. SGGW
Przewodniczący Rady Dyscypliny
Rolnictwo i Ogrodnictwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Szanowny Panie Profesorze,

w załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Przemysława Marciniaka pt. „Wybrane aspekty określania stopnia mieszańcowości oraz mikrorozmnażania *Hippeastrum* sp.”.

Z wyrazami szacunku