

## RECENZJA

**pracy doktorskiej Pana mgr. Marcina Michalaka  
pt. "Kriokonserwacja zasobów genowych wybranych gatunków dzikich drzew i  
krzewów owocowych"**

Fizjologodzy roślin drzewiastych nigdy nie mieli łatwego życia z uwagi na specyficzne cechy obiektu swych badań. Jeśliby bowiem zamierzeli poddać ocenie cechy użytkowe drzew określonego gatunku, stanowiących potomstwo konkretnych rodziców o szczególnych cechach, to albo musieliby korzystać z kolekcji założonej przez dużo starszych kolegów, albo też inicjowaliby prace, z których skorzysta ktoś, kto jeszcze się nie urodził i dopiero za wiele lat ... rozpocznie pracę naukową. Taki sam problem powstałby w związku z badaniami nad biologią i genetyką drzew leśnych, czy skutkami celowych zabiegów hodowlanych.

Ta niedogodność bycia fizjologiem drzew nasiliła się w ostatnich latach, gdy statystyka naukowa stała się metanauką, pozwalającą „precyzyjnie” ocenić i porównać wartość różnych naukowców, zespołów czy instytucji. Ta „precyzja” wynika stąd, że statystyka naukowa posługuje się liczbami, a liczby można porównywać. Jeśli więc naukowcy czy instytucji naukowej przypisze się liczbę (np. publikacji, cytowań, IF czy liczbę Hirscha) to od razu widać kto jest lepszy, a kto gorszy. Przyszłość nie rysuje się lepiej, należy bowiem publikować jeszcze więcej i częściej. Tymczasem w fizjologii drzew nic się nie dzieje szybko, drzewa to nie *Arabidopsis*, to maratończycy. Jak więc wykonać pracę cenzusową, kiedy na doktorat muszą wystarczyć cztery lata, a na habilitację siedem.

Temat rozprawy doktorskiej Pana Michalaka, dotyczący krioprezerwacji zasobów genowych dzikich gatunków drzew i krzewów owocowych, postawił go już na początku w sytuacji jeszcze trudniejszej. Gdybyż to bowiem były kultury *in vitro* wybranych gatunków drzew, opis zróżnicowania genomów różnych proveniencji, śledzenie procesów migracji gatunków i problemy temu podobne, można byłoby liczyć na szybszy sukces z uwagi na przyspieszenie procesów zachodzących w kulturach tkanek albo dlatego, że opisywany byłby stan statyczny, a nie jego zmiany w czasie. Tymczasem krioprezerwacja jest procesem czy zabiegiem, którego efekty można ocenić dopiero po wielu latach. Recenzowana rozprawa jest więc ambitnym naukowym zadaniem o trudnym do określenia prawdopodobieństwie sukcesu, który zależy od właściwości badanego obiektu, nie zaś od eksperymentatora. To jednak cechuje prace prawdziwie naukowe.

Tym wstępem zamierzałem uzasadnić opinię, że praca doktorska Pana mgr Marcina Michalaka jest ważna i to zarówno z punktu widzenia biologicznego – umożliwiając lepsze poznanie fizjologii kiełkowania badanych gatunków, jak i aplikacyjnego – poprzez wzbogacenie warsztatu badawczego dendrologów o wartościowe narzędzie służące do przechowania i utrwalania dla przyszłych pokoleń, zasobów genowych, w celu zachowania różnorodności środowiska leśnego.

### **Uwagi ogólne o pracy**

Rozpoczyna się ona słownikiem terminów i skrótów w niej użytych, przez co unika się niejednoznaczności towarzyszących dalszemu posługiwaniu się nimi. Pochwalam ten sposób uzgodnienia stosowanej terminologii mimo, iż skróty takie jak RNA czy DNA pominąłbym, umieszczając w zamian definicje terminów orthodox, suborthodox i recalcitrant. Po „banku” terminów następuje przegląd literatury przedstawienie przedmiotu pracy, sformułowanie celu

badania, opis materiału biologicznego oraz zastosowanych metod badawczych, opis uzyskanych wyników, ich dyskusja, sformułowanie końcowych wniosków, dwujęzyczne streszczenie oraz spis cytowanych publikacji.

Prezentowana rozprawa stanowi dobrej klasy opracowanie edytorskie, a jej autor zastosował efekty edytorskie oszczędnie, przez co uchronił się przed podejrzeniami o efekciarstwo. Praca ta jest obszerna, gdyż obejmuje 152 strony druku, 48 rycin, wykresów i fotografii, oraz wielka liczba 335 cytowanych pozycji literatury. Duchem nowych czasów jest spora liczba cytowań pochodzących ze stron www. Rozprawa napisana została jasnym i precyzyjnym językiem.

**Przegląd literatury** jest obszerny, sięga bowiem niemal 40 stron druku. Jest to jednak uzasadnione bogatym zestawem omówionych tematów. Rozpoczyna się przedstawieniem wagi problemu zachowania bioróżnorodności w ekosystemach. To zagadnienie już na wstępie budzi dalsze zapytania, z którymi zwracam się do doktoranta. **Tak więc, czy jest możliwe pogodzenie ochrony bioróżnorodności ekosystemów rolniczych, czy leśnych z rosnącą stale intensywnością ich eksploatacji gospodarczej. Przecież nie da się pogodzić intensywnej uprawy z dopuszczeniem do rozpowszechnienia się chwastów na polach, a w lasach – dopuszczeniem do nadmiernego rozwoju drzew o małej wartości użytkowej. Czy zatem miejscem tych tysięcy obecnie nieużytkowych, gatunków będą wyłącznie banki genów, zakładane z nadzieją, że przyszłe pokolenia znajdą sposób na rozwiązanie tego problemu?**

Drugi rozdział przeglądu literatury poświęcony jest omówieniu metod zachowania zasobów genowych, które jednak mają tę słabą stronę, że nawet w specjalistycznych organach przechowalniczych roślin, jak nasiona, standardowa temperatura przechowywania  $-18^{\circ}\text{C}$  nie zapewnia zatrzymania się ich procesów życiowych, co ogranicza długość okresu przechowywania. Z drugiej strony nasiona, zwłaszcza szczególnie cennych osobników, muszą być przechowywane. W ten sposób autor doprowadza czytelnika do wniosku, rozwijanego w dalszych rozdziałach, że najskuteczniejszym sposobem przechowywania jest kriokonserwacja w ultra niskich temperaturach, przynajmniej zaś w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Jak wynika z długiej listy cytowanych prac, jest wiele gatunków roślin drzewiastych podatnych na krioprezerwację.

W rozdziale następnym autor przedstawia biofizyczne aspekty krioprezerwacji poprzez charakterystykę procesów zachodzących podczas przygotowywania obiektów biologicznych do zamrożenia oraz w trakcie stopniowego obniżania temperatury. Głównie chodzi tu o przemiany fazowe, jakim podlega woda tkankowa w trakcie zamrażania, co czyni koniecznym uprzednią optymalizację stopnia uwodnienia tkanek. Krystalizacja wody wprowadza bowiem niebezpieczeństwo silnych uszkodzeń mechanicznych tkanek, w tym także ich rozrywanie, a także równie niebezpieczne odwodnienie tkanek w wyniku odciągania z nich wody krystalizacyjnej. Autor widzi, zupełnie słusznie, zeszklenie roztworu komórkowego, następujące podczas bardzo szybkiego schładzania tkanek, jako alternatywę do konwencjonalnego procesu krioprezerwacji. Jako ciekawostkę odnotowałem informację, że rafinoza i stachioza skuteczniej tworzą fazę szkła niż popularniejsze cukry proste oraz sacharoza. Przypomniałem sobie bowiem, że w naszych badaniach nad miskantem olbrzymim zaobserwowaliśmy, iż w karpach roślin, w okresie zimowym następuje nagromadzenie się właśnie rafinozy i stachiozy, który to proces tak jak szybko pojawił się na początku zimy, tak szybko ustąpił z początkiem wiosny. Być może należałoby zainteresować specjalistów z chemii teoretycznej, aby zbadali, czy struktura cząsteczek wymienionych cukrów w jakiś specyficzny sposób „pasuje” do struktury agregatów cząsteczek wody i tym samym utrwala je w trakcie witrifikacji.

Rozważania te prowadzą do wniosku, że dwoma parametrami decydującymi o skutkach, a w konsekwencji do powodzenia krioprezerwacji, są zawartość i status wody komórkowej oraz tempo zmiany temperatury w trakcie zamrażania i rozmrażania tkanek.

W następnych kilku rozdziałach autor omówił sposoby i efektywność krioprezewacji trzech głównych klas nasion tj. orthodox, recalcitrant oraz suborthodox, a w związku z tym strategię krioprezewacji zarówno całych nasion jak ich osi zarodkowych.

Osobnym problemem poznawczym jest ruchliwość molekuł w ultraniskich temperaturach i wynikająca stąd szybkość reakcji chemicznych. Zwyczajowo przyjmuje się, że szybkość reakcji chemicznych zmniejsza się 2-3 krotnie wraz ze spadkiem temperatury o 10°C. To zaś oznacza, że spadek temperatury od plus kilkunastu stopni do temperatury wrzenia ciekłego azotu pod normalnym ciśnieniem (-196°C) przechodzi przez 21 „dziesiątek” stopni, co powinno skutkować przeciętnym spowolnieniem reakcji chemicznych od 2<sup>21</sup> (czyli ponad 2 miliony) do 3<sup>21</sup> (ponad 10 miliardów). Tym samym 1 sekunda w wyższej temperaturze wymagałaby od 12 dni do wielu lat, aby spowodować takie samo zaawansowanie procesów w niskiej temperaturze. Wydaje się jednak, że powyższa zależność obowiązuje tylko wtedy, gdy nie następują zmiany fazowe w środowisku, więc ma ona dla procesu krioprezewacji znikome znaczenie. Faktycznie autor konkluduje, że nawet podczas kriogenicznego przechowywania nasion zachodzą w nich, albo są kontynuowane, procesy fizjologiczne. **W tym miejscu proszę doktoranta o wypowiedź na temat czy spotkał się z doniesieniami na temat możliwości dalszego lub szybszego obniżenia temperatury przechowywanych nasion. W szczególności chodzi o chłodzenie nasion w ciekłym azocie odparowywanym pod obniżonym ciśnieniem dla uzyskania temperatury bliskiej jego zamarzaniu (-210.5°C), albo o zastosowaniu innych skroplonych gazów jak neon (temp wrzenia -246°C), czy wodór (-252.8°C), a w ostateczności ciekły hel. Skroplony wodór mógłby okazać się szczególnie interesujący, ze względu na wyjątkowo wysokie ciepło parowania, dzięki któremu szybciej następowaloby odbieranie energii cieplnej z chłodzonych nasion.**

W następnych rozdziałach wstępu autor przedstawił współczesną wiedzę na temat innych, stosunkowo mało znanych procesów zachodzących w tkankach podczas, albo raczej w wyniku, krioprezewacji. Chodzi tu o procesy cyto- i histologiczne, procesy biochemiczne, procesy genetyczne zachodzące na poziomie zmian struktury DNA i wreszcie zmiany następcze o charakterze epigenetycznym, w tym głównie związane z dynamiką procesów metylacji/demetylacji DNA.

Ostatnia część wstępu poświęcona została uzasadnieniu wyboru właśnie tych gatunków do badań. Wybrane do badań gatunki drzewiaste (dzika jabłoń, grusza pospolita oraz czereśnia ptasia) ważne są z kilku powodów:

- ich obecność zwiększa bioróżnorodność ekosystemów leśnych, które zostały wprawdzie wyeliminowane z form współczesnych w trakcie procesu hodowlanego, jednak w przyszłości mogą okazać się bardzo cenne (np. jako geny różnych odporności na stresy biotyczne i abiotyczne),
- geny pierwotnych form roślin użytkowych traktowane są jako skarby narodowe, o coraz większej wartości i z tego względu podlegają ochronie,
- drewno niektórych z tych gatunków, choć przyrasta powoli, charakteryzuje się wysoką wartością użytkową.

Od wymienionych gatunków odbiega leszczyna pospolita, która, jako krzew, nie dostarcza drewna o wyróżniającej się wartości, jednak jej owoce mają wysoką wartość odżywczą i nierzadko przewyższają pod tym względem odmiany hodowlane.

Jak wynika z dalszej charakterystyki wymienionych gatunków, zakres wiedzy na temat możliwości kriogenicznego ich przechowywania jest zróżnicowany ale w każdym przypadku bardzo niekompletny, czasem wręcz ograniczony do przechowywania pąków spoczynkowych lub osi zarodkowych, a czasem tylko do niektórych genotypów, czy form pokrewnych. Taki stan wiedzy uzasadnia w pełni cel pracy.

**Cel pracy** został określony jako możliwie wszechstronne zbadanie podatności nasion badanych gatunków na krioprezerwację przy różnych poziomach uwodnienia, opracowanie optymalnej procedury i warunków krioprezerwacji, określenie jej skutków, tj. stopnia zachowania żywotności nasion, a także ujawnienie odległych skutków tego zabiegu, ujawniających się poprzez zmiany stopnia metylacji DNA.

Autor wymienił 7 cząstkowych celów. Uznaję te cele jako ambitne zamierzenia badawcze, a już z pewnością warte poświęcenia im kilku lat badań. Cele te charakteryzują się wysokim stopniem nieprzewidywalności, co charakteryzuje prawdziwie naukowe badania, których powodzenie zależy od właściwości materiału roślinnego. Równocześnie jednak taki niekompletny stan wiedzy na temat możliwości krioprezerwacji nasion badanych gatunków nasunął mi podejrzenie, że temat ten może nie być łatwy jako, że podejmowali go już wcześniej badacze w różnych laboratoriach i najwyraźniej nie uzyskali zadowalającego sukcesu. Sądzę, że autor zdał sobie z tego sprawę ale było to zapewne później, kiedy zaawansowanie jego badań było znaczne i nieodwracalne.

Następny rozdział rozprawy opisuje **materiał roślinny i zastosowane metody badań**. Autor poddał badaniom w sumie 9 proveniencji roślin pochodzących z 4 województw zachodniej Polski. W kolejnych podrozdziałach autor opisał izolację osi zarodkowych leszczyny i ocenę ich przeżywalności na sztucznych podłożach, uzyskiwanie zadanej wilgotności nasion, technikę krioprezerwacji nasion w ciekłym azocie i następnie ich rozmrażanie, określanie zakresu bezpiecznej wilgotności nasion do przechowywania kriogenicznego, stratyfikację nasion i określanie ich zdolności do kiełkowania i wschodów i wreszcie techniki prowadzące do oznaczania stopnia metylacji DNA, a więc izolację DNA z nasion, osi zarodkowych i liści, a także oznaczenie zawartości metylocytozyny w hydrolizacie DNA znakowanym izotopem <sup>32</sup>P.

Podsumowując część metodyczną pracy stwierdzam, że autor zastosował właściwe metody badań, nie zgłaszam w tej kwestii krytycznych uwag.

**Uzyskane wyniki** można zestawić następująco:

- W badaniach wstępnych autor „przedstawił” nasiona badanych gatunków pod względem zdolności do kiełkowania i wschodów. Nasiona dzikiej jabłoni oraz gruszy pospolitej kiełkowały i wschodziły w wysokim procencie, nawet po silnym, wstępnym podsuszeniu, natomiast nasiona czereśni ptasiej kiełkowały słabiej, nawet przy optymalnym uwodnieniu a po podsuszeniu zdolność do kiełkowania i wschodów zmniejszała się nawet do kilku procent. Podobnie, słabszą zdolność do kiełkowania i wschodów wykazywały nasiona leszczyny pospolitej. Zaniepokoiło mnie jednak (**i proszę o ustosunkowanie się**) porównanie rycin 17 i 18 (a także w dalszej części pracy porównanie danych z tabel 35 i 36) z których wynika, że najsilniej podsuszone nasiona w większym procencie „wschodziły” niż kiełkowały. **Poza tym zastanawiam się, czy w przypadku relatywnie dużych nasion leszczyny podsuszanie ich doprowadza do uzyskania określonej zawartości wody uśrednionej dla całych nasion, w których oś zarodka stanowi znikomą ich część. Czy zatem nie wystąpiło niebezpieczeństwo, że uwodnienie osi zarodka może być znacząco inne aniżeli mierzone średnie uwodnienie nasion. Efekt ten w mniejszym stopniu powinien ujawnić się w znacznie mniejszych nasionach pozostałych gatunków.**
- Na drugą część wyników złożyły się eksperymenty, w których autor opisał wrażliwość nasion badanych gatunków na temperaturę ciekłego azotu i wpływ wilgotności nasion na tę wrażliwość. Nasiona dzikiej jabłoni wykazywały dobrą tolerancję na ultraniską temperaturę w tzw. bezpiecznym zakresie wilgotności, gdzie zdolności do kiełkowania i wschodów nasion w temperaturze ciekłego azotu i w

temperaturze kontrolnej były nieistotnie różne. Podobnie zachowywały się nasiona gruszy pospolitej i czereśni ptasiej, aczkolwiek w tym ostatnim przypadku kiełkowanie nasion było istotnie niższe. **Zastanowiło mnie dlaczego na rycinie 30 autor zaznaczył zakres wilgotności tylko do wilgotności 17.2%. Rozumiem, że zakres bezpiecznej wilgotności z punktu widzenia krioprezerwacji obejmuje temperatury w których kiełkowanie/wschody są nieistotnie różne w obu temperaturach. To się zgadza, ale przy wilgotności nasion 19.8% temperatura LN istotnie obniżyła wschody, co nie zmieniło faktu, że i tak były one wyższe od pozostałych, a więc w praktyce powinno się stosować właśnie tę wilgotność nasion do zabiegu krioprezerwacji. I druga kwestia – ryciny 32 i w pewnym stopniu 33 i 34 pokazują bardzo ciekawy efekt, że mianowicie wilgotności skrajnie niskie i skrajnie wysokie są najkorzystniejsze dla kiełkowania nasion, niezależnie od temperatury. Być może oznacza to, że woda zawarta w nasionach działa według różnych mechanizmów o różne umiejscowionych maksimach. Proszę o komentarz, ale sam nie mam pomysłu w tej sprawie.**

- Autor badał także efektywność długotrwałego (2 lata) przetrzymywania nasion gruszy pospolitej w temperaturze LN w porównaniu z przechowywaniem w chłodzie. Udało się wyznaczyć zakres wilgotności początkowej, dla której kiełkowanie nasion i wschody po okresie przechowywania były nieistotnie różne. **Początkowo zastanawiałem się, jaka korzyść dla przechowalnictwa wynika z takiego eksperymentu, bo z pewnością łatwiej zastosować temperaturę 3 °C niż -196 °C, a uzyskuje się taką samą efektywność kiełkowania. Potem jednak doszedłem do wniosku, że autor dłużej czekać nie mógł, a mam nadzieję, że zostawił sobie jakąś partię nasion, za kilka lat je rozmrozi i wówczas wynik może być spektakularny. Proszę o komentarz.**
- Nasiona leszczyny pozbawione okryw nasiennych, po przemrożeniu w temperaturze LN, zachowywały zdolność do wschodów jedynie w wąskim przedziale wilgotności 7 do 9%. Nasiona z pozostawioną okrywą owocni znosiły lepiej traktowanie temperaturą LN, aczkolwiek porównanie z poprzednią próbą wskazuje, że w obydwu próbkach zastosowano prawdopodobnie różne partie nasion albo, że upłynął różny czas od momentu zbioru.
- Następną grupą eksperymentów dotyczyła zbadania skutków zamrożenia przez okres dwóch lat, w temperaturze LN, nasion badanych gatunków drzew. Wschody nasion dzikiej jabłoni po przemrożeniu następowały nawet w większym procencie w porównaniu z kontrolą, natomiast w nasionach gruszy pospolitej i czereśni ptasiej wschody po przemrożeniu w LN nie różniły się istotnie od kontroli. **Uwaga podobna do wcześniejszej – mam nadzieję, że autor dysponuje próbkami nasion tych gatunków, którym w warunkach LN nadal „bije zegar” i będzie możliwe ponowne zbadanie wschodów tych samych nasion po upływie kilku lat.**
- Autor zbadał poziom metylacji cytozyny w DNA wyizolowanym z nasion kontrolnych i traktowanych temperaturą LN. Wyniki okazały się obiecujące, wskazały bowiem, choć tylko na przykładzie gruszy pospolitej, że traktowanie temperaturą LN nasion doprowadzonych do bezpiecznego zakresu wilgotności, określonego przez autora, nie zwiększyło poziomu metylacji, a więc, nie zwiększyło ryzyka wtórnych zmian w przechowywanym materiale, w tym także zmian epigenetycznych utrzymujących się dłużej czas po zakończeniu tego traktowania.
- Trochę oddalone od głównego tematu badań były eksperymenty z wykorzystaniem krioprezerwacji izolowanych osi zarodkowych owoców leszczyny w hodowli *in vitro*. We wstępnych badaniach autor znalazł pożywkę, na której osie zarodkowe formowały w pewnym procencie kompletną siewkę, czyli pęd i korzeń.

- Krioprezewacja nie pogorszyła zdolności organogenetycznych kultur izolowanych osi, a nawet je zwiększyła. Podobne wyniki uzyskano hodując w warunkach *in vitro* osie zarodkowe przechowywane w temperaturze LN; również i w tym przypadku z hodowli po traktowaniu kriogenicznym regenerowało się ponaddwukrotnie więcej kompletnych siewek w porównaniu z kontrolą.
- Rozdział wyniki kończy się efektowną fotografią prawidłowo wykształconej siewki leszczyny, która wyrosła z osi zarodkowej przechowywanej przez 2 lata w temperaturze LN i następnie regenerowanej w warunkach *in vitro*. Gratuluję.

### **Dyskusja**

Autor wnikliwie przeanalizował uzyskane przez siebie wyniki na tle badań innych autorów, podkreślając te osiągnięcia, w których jego wyniki są bardziej obiecujące aniżeli uzyskane te literaturowe. Takich sytuacji było kilka, co czyni pracę doktorską Pana Marcina Michalaka wartościowym dziełem naukowym.

### **Wnioski**

W rozdziale o takim tytule został zamieszczony przegląd uzyskanych wyników, a więc nazwałbym go raczej „**Podsumowaniem**”. Nie jest to jednak mankament pracy, ponieważ autorzy rozpraw doktorskich postępują w tym miejscu różnie, zamieszczając wnioski albo podsumowanie albo wreszcie jedno i drugie. Być może jednak byłoby wskazane, aby umieścić właściwe wnioski, a więc np. perspektywy i kierunki dalszych badań, wskazówki dla kontynuatorów tych badań, sposoby uniknięcia błędów w przyszłości, czy propozycja zastosowania innych technik badawczych. **Proponuję aby doktorant spróbował sformułować takie właśnie wnioski podczas obrony**, może w tym celu skorzystać ze streszczenia, gdyż widzę tam pewne przydatne do tego celu myśli.


### **Spis literatury**

Jak zaznaczyłem wcześniej, spis literatury jest wyjątkowo obszerny, co wynika z wielowątkowości pracy.

### **Wniosek końcowy**

Wyrażam zdecydowaną i jednoznaczną opinię, że przedstawiona przez Pana mgr. Marcina Michalaka rozprawa wnosi wiele nowych informacji, poszerzających naszą wiedzę o możliwości i efektywność krioprezewacji nasion dzikich gatunków drzew owocowych. Nasiona te bowiem, poza znaczeniem dla ochrony bioróżnorodności środowiska leśnego, wchodzi także w skład majątku narodowego, jako siedlisko genów, wyeliminowanych z uprawianych gatunków drzew sadowniczych w procesie hodowli, a które mogą dla współczesnych roślin stanowić rodzaj „genomowej arki Noego”.

Praca ta spełnia wszystkie kryteria wymagane dla dysertacji doktorskiej, wnioskuję zatem o dopuszczenie Pana Michalaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Franciszek Dubert