



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-84-16, tel./fax 85 738-84-14



Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka
„Konsekwencje warunków przechowywania nasion wybranych gatunków leśnych drzew
i krzewów dla rozwoju siewek”

Rozprawa doktorska mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka, doktoranta Środowiskowego Studium Doktoranckiego Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Pawła Chmielarza, w Pracowni Biologii Rozmnażania i Genetyki Populacyjnej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku. Oceniana rozprawa doktorska to cykl trzech monotematycznych publikacji analizujących warunki niskiej temperatury i wilgotności optymalne do przechowywania nasion kategorii *orthodox* wybranych gatunków roślin drzewiastych - opatrzony streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz kilkudziesięciostronicowym wprowadzeniem i obszernym spisem literatury. Zawarte są także oświadczenia współautorów publikacji, z odpowiednimi podpisami. Prezentowane publikacje są pracami oryginalnymi opublikowanymi w 2020 roku w dobrych czasopismach międzynarodowych: *Annals of Forest Science*, *Canadian Journal of Forest Research* i *PLOS ONE*. Wszystkie artykuły są pracami zespołowymi, nazwisko Doktoranta umieszczone jest na pierwszym miejscu. Lista publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, obejmuje następujące pozycje:

1. **Wawrzyniak MK**, Jasińska AK, Chmielarz P, Kozłowski G. 2020. Desiccation, dormancy, and storage of *Pterocarya fraxinifolia* (Juglandaceae) seeds: application in Hyrcanian and Colchian forest conservation. *Canadian Journal of Forest Research* 50 (1): 24-31 (Impact Factor 5-letni z 2019 r.: 2,162, pkt MNiSW 100)
2. **Wawrzyniak MK**, Kalemba EM, Ratajczak E, Chmielarz P. 2020. Oxidation processes related to seed storage and seedling growth of *Malus sylvestris*, *Prunus avium* and *Prunus padus*. *PLOS ONE* 15, 6, e0234510 (Impact Factor 5-letni z 2019 r.: 3,226, pkt MNiSW 100)
3. **Wawrzyniak MK**, Michalak M, Chmielarz P. 2020. Effect of different conditions of storage on seed viability and seedling growth of six European wild fruit woody plants. *Annals of Forest Science* 77 (2): 1-20 (Impact Factor 5-letni z 2019 r.: 2,758, pkt MNiSW 140).

Łączny Impact Factor (5-letni, 2019 r.) publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska wynosi ok. 8,15 a sumaryczna liczba punktów MNiSW - 340. Prace są z 2020 r. i nie były jeszcze cytowane przez innych autorów (wg. Web of Science, dn. 6.10.2020). Udział własny Doktoranta w powstaniu publikacji został określony w granicach od 70% do 75%. Jak wynika z

oświadczeń współautorów Doktorant był głównym wykonawcą badań, pisał i przygotowywał manuskrypty do druku. Doktorant jest także autorem korespondencyjnym.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską poprzedzone są Wstępem, w którym Doktorant omawia pokrótce rolę banków nasion w zachowaniu zasobów genowych drzew, charakteryzuje najważniejsze czynniki środowiskowe wpływające na czas przechowywania nasion oraz podaje i opisuje przyjęte podziały nasion na kategorie (*orthodox*, *recalcitrant*, *intermediate*), omawia podstawy procesu starzenia nasion i warunki sprzyjające ich żywotności. Zaprezentowane treści oraz przegląd literatury dobrze wprowadzają w tematykę naukowych zainteresowań Doktoranta. Cel recenzowanej rozprawy doktorskiej został sprecyzowany jako: „poznanie mechanizmów kiełkowania i wschodzenia nasion leśnych gatunków drzewiastych po ich przechowaniu w kontrolowanych warunkach do 3 lat oraz wpływu takiego przechowania na późniejszy wzrost i rozwój siewek”. Doktorant postawił cztery hipotezy badawcze, kolejno weryfikowane w prezentowanych publikacjach. Analizując opublikowane prace eksperymentalne, można stwierdzić, że cel pracy został zrealizowany a hipotezy potwierdzone. Doktorant skrótowo także scharakteryzował materiał badawczy i podstawowe metody, a następnie przedstawił wyniki uzupełniające oraz podsumowanie badań i wnioski.

Stosowany w prezentowanych pracach materiał roślinny, układ eksperymentalny i metody badawcze nie budzą zastrzeżeń. Obiektem badań Doktoranta były nasiona 7 gatunków leśnych drzew i krzewów: czereśni ptasiej (*Prunus avium* L.), czarernchy pospolitej (*Prunus padus* L.), derenia świdwy (*Cornus sanguinea* L.), gruszy pospolitej (*Pyrus communis* L.), jabłoni dzikiej (*Malus sylvestris* L.), jarzębu pospolitego (*Sorbus aucuparia* L.) i skrzydłorzecha kaukaskiego (*Pterocarya fraxinifolia* Poir. Spach.). Rozdziały dotyczące materiałów i metod we wskazanych publikacjach, zawierają szczegółowe informacje, wystarczające do ewentualnego powtórzenia przedstawionych doświadczeń. Dobór metod badawczych jest w miarę różnorodny, zastosowano odpowiednie i stosunkowo nowe techniki badawcze. Uzyskane wyniki badań zostały poddane dokładnej analizie statystycznej. Przegląd rozdziałów omawiających materiały i metody, łącznie z prezentowanymi w publikacjach wynikami badań, pozwalają stwierdzić, że mgr inż. Mikołaj K. Wawrzyniak opanował metodykę badań stosowaną w biologii eksperymentalnej roślin.

W pierwszej pracy ocenianego cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Doktorant badał stan spoczynku nasion skrzydłorzecha kaukaskiego (*P. fraxinifolia*), tolerancję na wysuszenie i niskie temperatury a także możliwość zastosowania kriokonserwacji podczas przechowywania tych nasion. Celem pracy Doktoranta było określenie takich cech nasion, które mogą być przydatne do ustalenia metod ochrony zasobów genetycznych badanego gatunku. *Pterocarya fraxinifolia* to reliktowy gatunek drzewa z rodziny *Juglandaceae*, pochodzący z południowego Kaukazu, wchodzący w skład roślinności tamtejszych zanikających obecnie łągów.

W prezentowanej publikacji Doktorant zastosował pięć różnych metod stratyfikacji - w większości 8 - 12 tygodni w temp. 3°C, z podłożem do stratyfikacji (lub bez), z modyfikacjami. Badania prezentowane w publikacji umieszczonej w czasopiśmie *Canadian Journal of Forest Research* (2020) stanowią, zgodnie z deklaracją autorów, pierwszą kompleksową ocenę cech nasion *P. fraxinifolia* z jego naturalnych drzewostanów mającą na celu określenie metod ochrony *ex situ* tego drzewa. Interesującą metodą wydaje się kriokonserwacja nasion w ciekłym azocie (-196°C) pozwalająca na zachowanie zasobów genetycznych zagrożonych wyginięciem roślin. Wykonane analizy wskazały na wilgotność nasion w granicach 2,8% -18,1% jako bezpieczną do ich krioprezervacji. Zgodnie z deklaracją autorów, to ich badania po raz pierwszy wykazały możliwość kriokonserwacji nasion tego gatunku. Nie stwierdzono także istotnych różnic w kiełkowaniu i wczesnym rozwoju siewek z nasion przechowywanych przez rok w temperaturach: -3, -18 i -196 °C. Obserwacja ta sugeruje możliwości długotrwałego przechowywania nasion w bankach genów, zarówno w temperaturze ok. -20 °C, jak i w ciekłym azocie, bez istotnej utraty żywotności. Opublikowane wyniki wskazały, że badane nasiona *P. fraxinifolia* mogą kiełkować po 8 tygodniach stratyfikacji (3°C), co pozwala na uzyskanie sadzonek już po 6-7 tygodniach. Doktorant wraz ze współautorami uznał, na podstawie uzyskanych wyników, że nasiona *P. fraxinifolia* można zaklasyfikować do kategorii *ortodox* (znosiły podsuszenie do 2,8% wilgotności). Prezentowane w publikacji wyniki (i ich dyskusja) są ciekawe, mogą mieć też praktyczne zastosowanie – stanowiąc podstawę dla programu konserwacji kriogenicznej tego relikтового gatunku drzewa.

W drugiej pracy z ocenianego cyklu publikacji Doktorant analizował zmiany związane z objawami stresu oksydacyjnego podczas długoterminowego przechowywania nasion jabłoni dzikiej (*Malus sylvestris*), czereśni ptasiej (*Prunus avium*) i czerechwy pospolitej (*Prunus padus*), badał także rozwój siewek i wzrost sadzonek. Deklarowanym w pracy głównym celem badań było określenie, jak przechowywanie nasion w warunkach niskiej wilgotności i ujemnych temperatur wpływa na proces kiełkowania, symptomy stresu oksydacyjnego, a następnie rozwój siewek oraz jakie warunki są odpowiednie do przechowywania nasion badanych gatunków (kategorii *orthodox*) i do uzyskania dobrej jakości sadzonek. Dodatkowym celem było zbadanie, czy zmiany poziomu nadtlenku wodoru, kwasu askorbinowego i/lub zmiany potencjału redoks w nasionach mogą być potencjalnym markerem jakości uzyskiwanych sadzonek. W celu realizacji tych badań Doktorant podjął współpracę z pracownikami Pracowni Biochemii Nasion Instytutu Dendrologii PAN, których wcześniejsze badania wykazały, że system antyoksydacyjny pełni istotną rolę w utrzymaniu żywotności nasion drzew i ich tolerancji na desykację podczas przechowywania. W pracy opublikowanej w *PLOS ONE* (2020) badano zawartość nadtlenku wodoru, produktów peroksydacji lipidów (TBARS), kwasu askorbinowego i jego potencjał redoks (formy utlenionej

oraz zredukowanej) w nasionach po 2 i 3-letnim okresie przechowywania w temperaturach: -3° , -18° lub -196°C , w warunkach obniżonej wilgotności (ok. 5%, 8% i 11%). Analizy wykonano wykorzystując kielkujące nasiona oraz 3-miesięczne siewki. Interesującym efektem tej pracy było stwierdzenie, iż nasiona badanych gatunków, choć zaklasyfikowane do kategorii *orthodox*, to jednak wykazują różnice w odpowiedzi na warunki przechowywania (na poziomie biochemicznym), zmiany są także widoczne w rozwijających się siewkach. Doktorant, wraz ze współautorami, wykazał niekorzystny wpływ obniżonej zawartości kwasu askorbinowego na rozwój i jakość siewek *M. sylvestris*, ponadto zawartość tego związku w siewkach *M. sylvestris* była kilkakrotnie wyższa w porównaniu z *P. avium* i *P. padus* (po dwóch latach – S1Fig.), niezależnie od sposobu przechowywania nasion. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant zasugerował, że monitorowanie zmian zawartości kwasu askorbinowego w kielkujących nasionach i młodych siewkach drzew może być pomocne w ocenie żywotności nasion. Należy żałować, że Doktorant nie wykonał pomiarów zawartości glutationu w badanym układzie doświadczalnym. Czy były takie plany doświadczeń? Chciałabym, aby na obronie rozprawy doktorskiej Doktorant ustosunkował się do tej kwestii, oczekuję informacji o możliwych funkcjach glutationu podczas przechowywania nasion drzew. Dyskusja jest dobrze napisanym rozdziałem tej publikacji, obszerne są także wyniki uzupełniające zawierające dokładne analizy statystyczne (ciekawie zilustrowane graficznie). Zauważyłam jednak w tekście publikacji nieco drobnych błędów, które umknęły podczas korekty tekstu (Tab. 1, strony: 3, 17, 18, 19, 20, 21).

W trzeciej pracy z ocenianego cyklu, opublikowanej w *Annals of Forest Science* (2020) Doktorant analizował biologię nasion sześciu gatunków dzikich drzew owocowych podczas przechowywania w kontrolowanych warunkach obniżonej wilgotności i niskich temperatur (w ciągu trzech lat) oraz wpływ stosowanych czynników na kielkowanie i wzrost siewek. Oprócz obserwacji kielkowania nasion w warunkach laboratoryjnych, analizowano także parametry wzrostowe rocznych sadzonek (rosnących w tunelu foliowym). Do badanych już w poprzedniej pracy *M. sylvestris*, *P. avium* i *P. padus* dodano doświadczenia nad *Cornus sanguinea*, *Pyrus communis* i *Sorbus aucuparia*. Na bazie uzyskanych wyników, Doktorant wraz ze współautorami zaproponował najbardziej optymalne warunki przechowywania nasion drzew, indywidualnie podchodząc do każdego badanego gatunku. Przykładowo, za najkorzystniejsze warunki przechowywania nasion *S. aucuparia* do lat trzech uznał temperaturę -3°C i niższą niż 11% wilgotność. Doktorant deklaruje, że po raz pierwszy wykazał możliwość bezpiecznego przechowywania nasion *C. sanguinea* i *S. aucuparia* w ciekłym azocie. Zaobserwował, iż nasiona *M. sylvestris* charakteryzowały się obniżoną zdolnością kielkowania przy wilgotności poniżej 5%, natomiast podsuszenie nasion *P. communis* poniżej 5% wilgotności nie wpływało istotnie na ich żywotność. Interesujące są także obserwacje, że zastosowane różnorodne warunki

przechowywania nasion nie wpływały istotnie na morfologiczne parametry rozwijających się siewek. Uzyskanie licznych wyników badań prezentowanych w omawianej publikacji i ich szczegółowe analizy (w tym statystyczne), a także w publikacjach omawianych wcześniej, na pewno wymagały dużego zaangażowania Doktoranta, co warto podkreślić.

Doktorant uzupełnił, ponadto, opublikowane wyniki o dane eksperymentalne, zrealizowane w ramach kolejnego etapu badań, dotyczące zawartości azotu w korzeniach siewek oraz analiz morfologii korzeni wytworzonych w efekcie kielkowania nasion, które przechowywano w różnych warunkach wilgotności i temperatury. Czy Doktorant ma w planach publikację tych wyników? Czy podobne badania były już opublikowane? Należy stwierdzić, że opis wyników badań w rozprawie doktorskiej mgr inż. M. K. Wawrzyniaka jest poprawny i logiczny, wykresy i tabele są zrozumiałe i opatrzone odpowiednimi legendami. Sposób przedstawienia, opis i dyskusja wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej, zarówno opublikowanych jak i będących uzupełnieniem, nie budzą zastrzeżeń. Chciałabym jednak, by mgr inż. M. K. Wawrzyniak w trakcie obrony rozprawy doktorskiej szerzej omówił procesy warunkujące usuwanie nadmiaru reaktywnych form tlenu w przechowywanych nasionach drzew oraz podkreślił własne osiągnięcia. Oczekuję także wskazania, które badania warto by było rozszerzyć i kontynuować w przyszłości.

Generalnie, w ocenie opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej recenzent ma ułatwione zadanie, gdyż przed drukiem przeszły już weryfikację specjalistów - wyniki badań zostały już poddane wnikliwej ocenie dokonanej przez recenzentów opublikowanych prac. W mojej opinii, jako recenzenta, tematyka rozprawy doktorskiej jest aktualna naukowo. Oceniane prace wpisują się w aktualny trend badań nad odpowiedzią roślin na czynniki stresowe oraz nad rolą reaktywnych form tlenu. Publikacje wpisują się także w trend badań konserwatorskich nad roślinami potencjalnie zagrożonymi w niektórych siedliskach. Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, a pod względem formalnym jest poprawnie skonstruowana. Oceniane prace oryginalne zawierają ciekawe wyniki o potencjalnym zastosowaniu aplikacyjnym, które mogą być pomocne w opracowaniu warunków optymalnych do przechowywania nasion poszczególnych gatunków drzew. Uważam, że dobór metod był właściwy a ich spektrum wystarczające dla rozprawy doktorskiej. Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy są pracami zespołowymi, co pokazuje, że Doktorant potrafi pracować w zespole i współpracować z innymi badaczami. Nazwisko Doktoranta jest na pierwszym miejscu, wskazując na Jego wiodącą rolę, co potwierdzają oświadczenia współautorów publikacji. Mgr inż. M.K. Wawrzyniak wydaje się być badaczem o sprecyzowanych zainteresowaniach naukowych. O doświadczeniu Doktoranta, jako badacza, świadczą również inne prace, w których jest współautorem, a także doniesienia konferencyjne, w tym udział w konferencjach

międzynarodowych. Prezentowane w pracach wyniki badań zostały przeprowadzone na wybranych nasionach leśnych gatunków drzew i krzewów, których biologia/fizjologia była dotychczas słabo poznana (zwłaszcza pod kątem przechowywania w ciekłym azocie). Badania nad wpływem warunków kilkuletniego, kontrolowanego przechowywania na początkowe fazy wzrostu siewek są interesujące i mogą mieć znaczenie praktyczne w szkółkarstwie leśnym.

Rozprawa doktorska mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka jest napisana poprawnym językiem, bez poważnych błędów, oraz jest prawidłowo zredagowana. Znaleziono pewne niedociągnięcia, głównie w części wprowadzającej, np. brakuje wyjaśnienia niektórych skrótów (np. Ryc. 1, czy str. 13), stwierdzono drobne błędy literowe (i interpunkcyjne), zwłaszcza w spisie literatury (np. str.: 7, 8, 9, 10, 15, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29) - nie wpływające jednak na wartość merytoryczną ocenianej rozprawy doktorskiej. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorant opanował problematykę i metodykę badań z zakresu fizjologii i biochemii nasion, wykazał się znajomością zagadnień i terminologii naukowej, potrafił zorganizować i zaplanować doświadczenia oraz zinterpretować uzyskane wyniki.

Podsumowując, chciałabym podkreślić wartość rozprawy doktorskiej mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka. Doktorant zrealizował cele postawione w pracy, uzyskane wyniki są oryginalne i opublikowane w dobrych czasopismach. Stwierdzam, jako recenzent, że **praca doktorska mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka** zatytułowana: **Konsekwencje warunków przechowywania nasion wybranych gatunków leśnych drzew i krzewów dla rozwoju siewek** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występuję zatem do Rady Naukowej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr inż. Mikołaja K. Wawrzyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 13.10.2020 r.

Prof. dr hab. Iwona Ciereszko

*Pracownia Fizjologii Roślin
Katedra Biologii i Ekologii Roślin
Wydział Biologii
Uniwersytet w Białymstoku*