



Dr hab. Justyna Lema-Rumińska  
Pracownia Biotechnologii  
Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych  
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Mgr inż. Dominiki Andrys**

pt. „Kultury *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)  
i ich wykorzystanie do pozyskiwania metabolitów wtórnych”

*“In vitro cultures of *Lavandula angustifolia* Mill. and their using  
to obtain secondary metabolites”*

Ocena została wykonana na podstawie uchwały nr 230 Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 20.10.2017 r., przekazanej przez Pana dr hab. inż. Edwarda Mellera prof. nadzw., Dziekana Wydziału.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dominiki Andrys, przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Danuty Kulpy w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie, składa się ze spójnego tematycznie cyklu publikacji naukowych zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595 ze zm.). W skład cyklu wchodzi 5 publikacji naukowych opublikowanych w roku 2017 (w tym jedna w trakcie trwania procesu wydawniczego – w druku). Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy opublikowano w czasopiśmie z tzw. Listy Filadelfijskiej (*Acta Chromatographica, Folia Horticulturae, Natural Product Research*) o łącznej wartości współczynnika wpływu (*Impact Factor*)  $IF = 5,130$  oraz 83 punktach z listy MNiSW. Przedstawione publikacje są wieloautorskie lub dwuautorskie, jednak we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem z udziałem potwierdzonym przez pozostałych współautorów stanowiącym 51%. Jest to bardzo dobry wynik, świadczący o przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia liczących się w świecie badań naukowych. Cykl publikacji poprzedzony jest 19-stronicowym opisem składającym się z ośmiu rozdziałów (1 - Wstęp, 2 - Cel badań, 3 - Omówienie wyników badań przedstawionych w publikacjach

stanowiących osiągnięcie naukowe, 4 - Wnioski, 5 - Literatura, 6 - Streszczenie, 7 - Abstract, 8 - Jednotematyczny cykl publikacji).

Temat rozprawy trafnie określa i spaja cały cykl publikacji dotyczący wykorzystania kultur *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.) do pozyskania metabolitów wtórnych. We Wstępie Doktorantka określiła gatunek, jego występowanie w środowisku naturalnym, produkcję metabolitów wtórnych oraz wykorzystanie roślinnych kultur *in vitro* do ich produkcji a także opisała znaczenie elicytorów wpływających na wydajność produkcji olejków eterycznych w tkankach roślinnych oraz potrzebę prowadzenia wyżej wymienionych badań. Podjęta problematyka badawcza jest istotna ze względu na poszukiwanie alternatywnych i jednocześnie naturalnych substancji pochodzących z roślin, które mogłyby zastąpić w praktyce kosmetycznej substancje chemiczne, prowadzące często do problemów alergicznych skóry. Ich produkcja w kulturach *in vitro* roślin może dostarczyć bardzo wysokiej jakości związków o charakterze metabolitów wtórnych, które mogą mieć charakter aplikacyjny w szeroko pojętej kosmetyce i kosmetologii.

Celem przedstawionej pracy było określenie wpływu roślinnych regulatorów wzrostu, w tym kwasu jasmonowego na wzrost i rozwój roślin lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.) w kulturach *in vitro*, porównanie aktywności antymikrobiologicznej i antyoksydacyjnej oraz morfologii trichomów wydzielniczych lawendy wąskolistnej uprawianej w warunkach polowych i namnażanych w kulturach *in vitro* oraz określenie różnic w składzie chemicznym olejków eterycznych wyizolowanych z ich tkanek; określenie wpływu zróżnicowanej zawartości kwasu jasmonowego (JA) dodawanego do pożywek na aktywność antyoksydacyjną lawendy wąskolistnej oraz skład chemiczny olejków eterycznych, a także ich aktywność antymikrobiologiczną. Ponadto celem było także określenie wpływu olejku eterycznego wyizolowanego z lawendy wąskolistnej namnażanej w warunkach *in vitro* na zdolność do syntezy prokolagenu typu I przez fibroblasty oraz określenie jego przydatności jako naturalnej substancji konserwującej emulsje kosmetyczne.

W kolejnym rozdziale Doktorantka omówiła wyniki badań zawartych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.

W pierwszej publikacji (P1) pt. „*In vitro* propagation affects the composition of narrow-leaved lavender essential oils” opublikowanej w *Acta Chromatographica*, określono i porównano skład chemiczny olejków eterycznych wyizolowanych z trzech odmian lawendy wąskolistnej: ‘Elegance Purple’, ‘Blue River’ oraz ‘Munstead’, uprawianych w warunkach polowych i namnażanych w kulturach *in vitro*. Wykonano analizę metodą chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas (GC/MS), która pozwoliła na zidentyfikowanie od 92,44% do 97,71% związków w analizowanych olejkach eterycznych lawendy. W wyniku badań stwierdzono, że rozmnażanie lawend w kulturach *in vitro* prowadzi do zmiany składu chemicznego olejków eterycznych w stosunku do olejków izolowanych z tkanek roślin uprawianych w warunkach polowych.

W artykule P2 pt. „Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill. field-grown and propagated *in vitro*” opublikowanym w czasopiśmie *Folia Horticulturae* kontynuowano badania w celu określenia potencjału antyoksydacyjnego suszu oraz



aktywności antymikrobiologicznej olejków eterycznych pochodzących z roślin namnażanych w kulturach *in vitro* i uprawianych w warunkach polowych. Celem pracy było również określenie wpływu warunków uprawy na zawartość polifenoli oraz na budowę trichomów wydzielniczych, w których produkowane są olejki eteryczne. Stwierdzono istotny wpływ warunków wzrostu roślin na kształtowanie się średnicy trichomów wydzielniczych oraz na aktywność antyoksydacyjną i zawartość polifenoli - jest ona znacznie wyższa (niekiedy ponad 4-krotnie), w przypadku suszu roślin namnażanych w kulturach *in vitro* niż roślin uprawianych w warunkach polowych. W pracy wykazano ponadto, że wszystkie badane olejki wykazały aktywność antymikrobiologiczną wobec bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus*, *S. epidermidis*, Gram-ujemnych: *E. coli*, *P. aeruginosa* oraz drożdżoidalnego grzyba *C. albicans*. Olejki eteryczne izolowane z roślin namnażanych w warunkach *in vitro* charakteryzują się zwykle wyższą aktywnością antymikrobiologiczną, niż olejki wyizolowane z roślin uprawianych w warunkach polowych, jednak ich zdolność inhibicji zależna jest od badanej odmiany.

W kolejnej pracy (P3) pt. „Jasmonic acid changes the composition of essential oil isolated from narrow-leaved lavender propagated in *in vitro* cultures” opublikowanej w czasopiśmie *Natural Product Research* badano wpływ czynników stresogennych (elicytorów), takich jak kwas jasmonowy na wytwarzanie olejków eterycznych u lawendy wąskolistnej. Przeprowadzono analizę i porównano skład olejków eterycznych izolowanych z roślin lawendy wąskolistnej odmiany 'Munstead', namnażanych w warunkach *in vitro* na pożywkach uzupełnionych o dodatek 0,2, 0,5, 1 i 1,5 mg·dm<sup>-3</sup> kwasu jasmonowego z olejkami wyizolowanymi z tkanek roślin namnażanych na pożywkach bez dodatku JA. Olejki wyizolowane z lawendy namnażanej na pożywkach z dodatkiem kwasu jasmonowego charakteryzowały się większą liczbą związków monoterpenu i wzrosła ona z 14 (pożywka kontrolna) do 22 – 26 (pożywka z dodatkiem JA). Dodatek kwasu jasmonowego do pożywki spowodował zwiększenie udziału procentowego takich związków jak: borneol, eukaliptol, β-pinen czy tlenku kariofilenu. Stwierdzono, że kwas jasmonowy wpływa na skład olejku eterycznego lawendy wąskolistnej.

W artykule P4 pt. „Influence of jasmonic acid on the growth, antimicrobial and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. propagated *in vitro*” przyjętym do druku w czasopiśmie *Folia Horticulturae* opisano wpływ kwasu jasmonowego na właściwości biologiczne roślin. Określono wpływ stężenia kwasu jasmonowego na namnażanie się lawendy wąskolistnej odmiany 'Munstead' w kulturach *in vitro*. W badaniach nie zaobserwowano istotnego wpływu niższych stężeń kwasu jasmonowego (0,2 i 0,5 mg·dm<sup>-3</sup>) na kształtowanie się wysokości oraz masy roślin. Zastosowanie wyższych stężeń kwasu jasmonowego (1 i 1,5 mg·dm<sup>-3</sup>) znacząco wpłynęło na obniżenie wysokości pędów i liczby pędów oraz masy namnażanych roślin lawendy w porównaniu z pożywką kontrolną. Zbadano również wpływ zróżnicowanego stężenia kwasu jasmonowego w pożywce na aktywność biologiczną suszu roślin lawendy oceniając jego aktywność antyoksydacyjną i zawartość polifenoli. Stwierdzono znacznie wyższą aktywność antyoksydacyjną suszu lawend namnażanych na pożywkach z dodatkiem JA w stosunku do kontroli. Wyizolowane olejki eteryczne przebadano pod kątem ich aktywności antymikrobiologicznej wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. epidermidis*), Gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*) oraz

wobec komórek grzyba (*C. albicans*). Wszystkie przebadane olejki wykazały aktywność w stosunku do badanych szczepów.

Piąta publikacja (P5) pt. „Essential oil obtained from micropropagated lavender, its effect on HSF cells and application in cosmetic emulsion as a natural protective substance”, kończąca cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską została opublikowana w czasopiśmie *Natural Product Research*. Opisuje ona określenie możliwości wykorzystania olejku eterycznego pozyskanego z lawendy uprawianej w warunkach polowych oraz namnażanej w kulturach *in vitro* jako naturalnej substancji konserwującej emulsje kosmetyczne. W tym celu zbadano wpływ dodatku olejków na stabilność i czystość mikrobiologiczną emulsji kosmetycznej oraz produkcję prokolagenu I w kulturach tkankowych fibroblastów. Stwierdzono wyższe stężenie prokolagenu produkowanego przez fibroblasty pod wpływem lawendowego olejku eterycznego dla olejków eterycznych wyizolowanych z roślin lawendy namnażanej w kulturach *in vitro*, w stosunku do olejków izolowanych z roślin uprawianych w warunkach polowych.

Konstrukcja pracy jest poprawna i przejrzysta. Tematy podejmowane w kolejnych publikacjach wynikają z wyników badań uzyskanych w poprzednich pracach i są ich rozwinięciem. Przedstawione prace świadczą o dużej wiedzy Pani mgr inż. Dominiki Andrys, bardzo dobrej umiejętności dyskusji i interpretacji wyników oraz formułowania syntetycznych wniosków. Cenny jest również aplikacyjny charakter pracy, gdyż uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania roślinnych substancji o charakterze metabolitów wtórnych uzyskanych z wykorzystaniem roślinnych kultur *in vitro* do produkcji wysokiej jakości naturalnych kosmetyków.

**Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej Pani Mgr inż. Dominiki Andrys należą:**

a/ Stwierdzenie, że rozmnażanie lawendy wąskolistnej w kulturach *in vitro* prowadzi do zmiany składu chemicznego olejków eterycznych w stosunku do olejków izolowanych z tkanek roślin uprawianych w warunkach polowych. Olejki izolowane z tkanek roślin namnażanych w kulturach *in vitro* charakteryzowały się wyższym udziałem procentowym borneolu, epi- $\alpha$ -kadinolu czy  $\sigma$ -kadinenu oraz obecnością takich związków chemicznych jak: tymol, karwakrol, kusinol, cedrenol czy kalamenen nieobecnych w składzie chemicznym olejków eterycznych izolowanych z roślin uprawianych w warunkach polowych.

b/ Wykazanie, że warunki wzrostu lawendy wywarły wpływ na jej aktywność antyoksydacyjną oraz aktywność antymikrobiologiczną olejków eterycznych wyizolowanych z jej tkanek. Była ona wyższa w przypadku roślin namnażanych w kulturach *in vitro* w stosunku do lawend uprawianych w warunkach polowych.

c/ Wykazanie, że namnażanie lawendy w kulturach *in vitro* wpływa na zmniejszenie średnicy trichomów wydzielniczych, wpływając jednocześnie na zwiększenie ich liczby na spodniej stronie blaszki liściowej w stosunku do roślin uprawianych w warunkach polowych.

d/ Stwierdzenie, że dodatek kwasu jasmonowego do pożywki wpływa na zmianę składu olejku eterycznego lawendy wąskolistnej namnażanej w kulturach *in vitro*, wpływając przede wszystkim na wzrost zawartości procentowej związków monoterpenowych. Obok zmiany udziału procentowego kwasu jasmonowego wpływa również na produkcję związków



nieobecnych w olejkach izolowanych z tkanek lawend namnażanych na pożywkach bez jego dodatku.

e/ Określenie odpowiedniego stężenia kwasu jasmonowego w kulturze lawendy wąskolistnej. Dodatek do pożywek  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu jasmonowego nie miał wpływu na wysokość, liczbę pędów i masę lawendy wąskolistnej namnażanej w kulturach *in vitro*. Zwiększenie jego stężenia w pożywce powyżej  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  wpływa na ograniczenie wzrostu roślin oraz zmniejszenie się liczby wykształconych trichomów wydzielniczych.

f/ Wykazanie, że namnażanie roślin lawendy wąskolistnej na pożywkach zawierających  $0,2\text{-}1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu jasmonowego wpływa na produkcję w ich tkankach olejków eterycznych o wyższej aktywności antymikrobiologicznej. Lawenda namnażana na pożywkach z dodatkiem  $0,2\text{-}1,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu jasmonowego wykazuje również wyższą aktywność antyoksydacyjną w stosunku do roślin namnażanych na pożywkach bez dodatku kwasu jasmonowego.

g/ Stwierdzenie, że olejek eteryczny pozyskany z lawendy wąskolistnej odmiany 'Munstead' namnażanej w kulturach *in vitro* zastosowany w stężeniu  $0,1\%$  może stanowić alternatywę dla syntetycznych konserwantów stosowanych w celu zabezpieczenia stabilności emulsji kosmetycznych. Emulsja kosmetyczna z jego dodatkiem jest stabilna pod względem zapachu oraz koloru. Dodatek powyższego olejku eterycznego zabezpiecza emulsję przed rozwojem mikroorganizmów przez okres 3 miesięcy od jej sporządzenia.

Reasumując, pragnę stwierdzić, że przedstawiony cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Kultury *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.) i ich wykorzystanie do pozyskiwania metabolitów wtórnych” (“*In vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill. and their using to obtain secondary metabolites”) stanowi dobrą podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie naukowej *ogrodnictwo*.

Podczas lektury pracy nasunęło mi się jednak kilka pytań i uwag.

#### Uwagi:

1. We wstępie, celu badań oraz w opisie poszczególnych publikacji w języku polskim, wielokrotnie padają sformułowania typu: „hodowla roślinna”, „roślin hodowanych *in vitro*” etc. Proszę o wyjaśnienie dlaczego użyto tu słowa „hodowla” a nie „kultura” lub „uprawa”?
2. Proszę także o wyjaśnienie dlaczego w jednej publikacji używała Doktorantka sformułowania odnoszącego się do tych samych odmian lawendy wąskolistnej „varieties” a w innych „cultivars”? Wymaga to ujednoczenia.
3. Pisownia dotycząca nazw odmian lawendy wąskolistnej także wymaga ujednoczenia, gdyż w jednych publikacjach były pisane bez apostrofów, a w innych z apostrofami.

Pragnę zaznaczyć, że powyższe uwagi to drobne nieścisłości, głównie redakcyjne, które nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy.

## Podsumowanie

Podsumowując, niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr inż. Dominiki Andrys pt. „Kultury *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.) i ich wykorzystanie do pozyskiwania metabolitów wtórnych” (“*In vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill. and their using to obtain secondary metabolites”) spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65, poz. 595 ze zm.). Z tego względu przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani Mgr inż. Dominiki Andrys do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ze względu na fakt, że przedstawiony spójny tematycznie cykl publikacji składa się z pięciu publikacji i wszystkie z nich są z tzw. Listy Filadelfijskiej (posiadają współczynnik wpływu IF), wnioskuję także do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie powyższej rozprawy.

Kierownik Pracowni Biotechnologii  
  
dr hab. Justyna Lema-Rumińska

Bydgoszcz, 6.11.2017 r.

Dziekanat Wydziału Kształtowania  
Środowiska i Rolnictwa

Wpłynęło dnia 09.11.2017 r.

19/190/723/2017