

Dr hab. Monika Bieniasz prof. URK
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Katedra Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Recenzja pracy doktorskiej

pt "Wpływ zabiegów agrotechnicznych na plonowanie kolcowoju chińskiego (*Lycium chinense* Moll.) oraz jego wzrost w kulturach in vitro"

Autor; mgr inż. Arleta Kruczek

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. inż. Arkadiusza Telesińskiego, Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, zgodnie z uchwałą nr 50 w dniu 28 marca 2022 roku przez Senat ZUT podjętej na podstawie art. 14 ust. 1 pkt. 1 oraz art. 14 ust. 2 oraz art. 20 ust. 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.) w związku z § 3 ust. 1 pkt 1 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami dla tego typu prac.

Informacje o pracy oraz ocena strony formalnej

Pani mgr inż. Arleta Kruczek przedstawiła do recenzji pracę uprawniającą ją do dalszego postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Ireneusza Ochmiana prof. ZUT z Katedry Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego. Funkcję promotora pomocniczego sprawowała dr hab. Marcelina Krupa-Małkiewicz z Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii tego samego Uniwersytetu.

Przedstawiona do oceny praca jest zbiorem sześciu publikacji naukowych o jednolitej linii tematycznej dotyczącej kolcowoju chińskiego opublikowanych w latach 2016 – 2021. Łączna punktacja wynosi 310, w tym trzy publikacje do roku 2018, kiedy obowiązywała niższa punktacja, sumaryczny IF wynosi 5.85. W pięciu publikacjach

doktorantka jest pierwszym autorem. Wkład pracy włożony w powstawanie tych artykułów jest określony w zgodnych oświadczeniach pozostałych autorów.

Z oświadczeń wynika, że doktorantka w pięciu pracach ma wkład od 50 do 70 procent, a w jednej 30 procent. Pani mgr inż. Arleta Kruczek uczestniczyła w projektowaniu i wykonywaniu eksperymentów, przygotowywaniu materiału badawczego, prowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie i interpretacji danych, jak również w przygotowywaniu manuskryptów do druku.

We wstępnej części rozprawy, zaprezentowano następujące treści: Spis artykułów stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie, wstęp teoretyczny, cel pracy i cele badawcze, metodykę eksperymentów. Pierwsza część pracy obejmuje 16 stron. W kolejnych rozdziałach autorka przystępuje do omawiania kolejnych prac. Do pracy dołączono również wydruk wszystkich sześciu artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Wartość naukowa i merytoryczna pracy

Kolcowój chiński (*Lycium chinense* Moll.) nazywany handlowo jagodą goji jest jednym z najmłodszych gatunków owocowych, które od kilku lat pojawiają się w polskich i europejskich uprawach. Plantatorzy poszukują alternatywy, dla owoców tradycyjnych takich jak np. jabłka, gruszki, śliwy, wiśnie, czy truskawki. Poszukiwanie nowych gatunków do uprawy, jest związane z nowymi trendami w dietetyce i poszukiwaniami przez konsumentów produktów, należących do tzw. „superfood”. Kolcowój chiński (*Lycium chinense* Moll.) znany jest od tysięcy lat, wymieniany w farmakopeach starożytności europejskiej i chińskiej. Współczesna nauka, coraz częściej sięga do wiedzy zgromadzonej przez naszych przodków, wielokrotnie naukowo potwierdzając bioaktywne właściwości roślin opisywanych w starożytnych farmakopeach.

Zagadnienia podjęte w pracach badawczych mgr inż. Arlety Kruczek wpisują się w aktualne wyzwania stojące przed współczesnym sadownictwem. Wprowadzenie do uprawy nowego gatunku wymaga wielu wcześniejszych, bardzo starannych badań i prób, pozwalających na sukces agrotechniczny, uzyskanie surowca o wysokich standardach bioaktywności, a także na zadowalający wynik ekonomiczny. W dostępnej literaturze istnieje bardzo niewiele prac dotyczących uprawy tej rośliny, dlatego wszelkie eksperymenty, które są podjęte przez naukowców mają dużą wartość

poznawczą. W przedstawionej pracy autorka opisuje zagadnienia dotyczące prowadzenia roślin na plantacji, wpływu cięcia na fizjologię rośliny, właściwości fizykochemiczne oraz zawartość substancji bioaktywnych liści i owoców. Ponadto wprowadzono roślinę do kultur tkankowych opracowano protokół rozmnażania oraz składy pożywek pozwalające na uzyskanie zdrowych i dobrze ukorzenionych roślin.

We wstępie teoretycznym autorka zwięźle zaprezentowała stan wiedzy na temat badań opublikowanych w zestawie swoich publikacji. Spis literatury do wstępu teoretycznego liczy 37 pozycji z czego około 60 procent obejmuje ostatnie lata badań.

W przeprowadzonych eksperymentach zostało postawionych siedem celów badawczych takich jak;

1. porównanie wpływu cięcia na wzrost krzewów kolcowoju chińskiego odmiany, oraz określenie parametrów fizycznych owoców i ich skład chemiczny **(P1)**,
2. wytypowanie odmian, które charakteryzują się najbardziej wartościowymi owocami pod względem aktywności przeciwcukrzycowej i antyoksydacyjnej, o najwyższej zawartości polifenoli oraz o najlepszych właściwościach morfologicznych i fizykochemicznych **(P2)**,
3. porównanie właściwości fizyko-chemicznych liści i owoców goji uprawianych w sadzie oraz w kulturze *in vitro*, a także ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych liści goji, co może stanowić podstawę do wykorzystania tej rośliny jako żywności funkcjonalnej **(P3)**,
4. porównanie skuteczności różnych metod dezynfekcji nasion dwóch odmian goji 'A' i 'New Big' w kulturach *in vitro* **(P4)**,
5. opracowanie pożywki do rozmnażania pędów dwóch odmian goji w kulturach *in vitro* **(P5)**,
6. ocena proces ukorzeniania otrzymanych roślin *in vitro* i *ex vitro* **(P5)**,
7. określenie wpływu działania egzogenego 1 mM kwasu askorbinowego na wzrost i parametry biochemiczne *Lycium* w warunkach stresu wywołanego 1 mM Pb(NO₃)₂ w kulturach *in vitro* **(P6)**.

Doświadczenie agrotechniczne zostało założone na plantacji w stacji doświadczalnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego na Nizinie Szczecińskiej stąd też pochodził materiał badawczy do dalszych eksperymentów.

Pierwsza praca pt **“The influence of shrubs cutting method on yielding and quality of the goji berries (*Lycium barbarum* L.)”**.

Autorka skupiła się na analizie cięcia krzewu i wpływowi tej czynności na jakość otrzymanych owoców oraz parametry fizjologiczne krzewu. Zagadnienie to jest bardzo ważne, gdyż naturalny charakter wzrostu tej rośliny nie pozwala na uzyskanie plonu wysokiej jakości, dlatego podjęcie próby prowadzenia krzewu na 3 i 6 pędów było interesującym wyzwaniem badawczym i agrotechnicznym. Jednak w pracy wkradły się pewne skrótowe myślowe. Kolcowój chiński owocuje najlepiej na starszych pędach dwu, trzy i czteroletnich pozostawienie liczby pędów (3 lub 6 sztuk) w tym wieku jest korzystne gdyż krzew jest ażurowy i mniej podatny na infekcję patogenami grzybowymi. Z opisu doświadczenia nie ma jasności w jakim wieku były te pozostawione pędy. Metody cięcia i prowadzenia krzewów, dla każdego nowo wprowadzanego do uprawy gatunku muszą być dokładnie opracowane i wymaga to wielu doświadczeń agrotechnicznych, dlatego podjęte wyzwanie jest bardzo ważne. Autorka oceniła wysokość roślin, pole powierzchni przekroju pędów głównych, plon oraz potencjał regeneracyjny roślin, a także jakość i ilość uzyskanego plonu. Badania prowadzono w latach 2013 – 15. W pracy przedstawiono średnie z sezonów badawczych.

Uzyskane wyniki są interesujące, intensywne cięcie roślin i pozostawienie trzy lub sześć pędów znacząco wpłynęło na poprawienie takich parametrów jakościowych jak; masa owoców, ich długość, zawartość azotanów oraz kwasu l-askorbinowego. Z wielu danych literaturowych wiemy, że roślina, która ma ograniczoną agrotechnicznie liczbę pędów i dobrze wykształcony system korzeniowy, to proporcja ta wpływa korzystnie na parametry jakościowe plonu. Substancje odżywcze są przeznaczone dla ograniczonej liczby pędów, co często zwiększa parametry bioaktywne uzyskanych owoców. W wynikach można zaobserwować, że niektóre parametry nie mają takiej zależności. Doktorantka prowadziła badania w dwóch sezonach, a wyniki są przedstawione jako średnia, co może zaburzać tę zależność od strony „arytmetycznej”. Interesujące byłoby prześledzenie tej zależności w latach, z pewnością takie wyniki są zebrane przez autorkę.

Druga praca pt „**Comparison of morphological, antidiabetic and antioxidant properties of goji fruits**”.

Kolcowój (*L. chinense*), jest rośliną uprawianą powszechnie w Chinach, natomiast w Europie i w Polsce nasadzenia tego gatunku występują w ilości „galanteryjnej”, chociaż z roku na rok zainteresowanie tą rośliną zwiększa się. Z tego względu badań dotyczących jakości owoców uzyskanych w naszej szerokości geograficznej jest niewiele. Dlatego podjęte zadanie badawcze ma głębokie uzasadnienie nie tylko badawcze, ale i społeczne. Wyniki wskazują, że krzewy dobrze rosną i plonują w naszym klimacie, a skład biochemiczny jest zróżnicowany w zależności od odmiany. Autorzy publikacji wskazują, że odmiany Nr.1 i Big Lifeberry mogą być uznane za super żywność, ze względu na bogactwo polifenoli, prowitaminy A oraz kwasu *L*-askorbinowego, ponadto wykazują potencjalne działanie przeciwcukrzycowe i antyoksydacyjne. Obecność w owocach enzymów wpływających na obniżenie poziomu cukru we krwi zwiększa potencjał owoców do wykorzystywania ich w produktach typu „superfood”. Jednak stwierdzenie, że mają one działanie przeciwcukrzycowe jest za daleko idące, choć niewątpliwie potencjał taki owoce mogą mieć dlatego do takiego wniosku należałoby przedstawić szersze medyczne badania. Cenną informacją jest to, że w owocach nie wykryto obecności steroidów (α -solanina) oraz alkaloidów tropanowych (skopolamina), gdyż mają one w działanie toksyczne, a nawet niewielka ich zawartość w żywności może być alergenna. Dlatego bardzo cenne jest przebadanie odmian pod tym kątem. Z kolei odmiany New Big i Sweet Berry charakteryzują się wysokim ekstraktem, co może poprawiać smakowitość tych owoców dla konsumenta. W tej części badań cenne byłoby wykonanie testów organoleptycznych gdyż jagody tego gatunku nie cechują się dużą „smakowitością”

Trzecia praca **Health-promoting capacities of *in vitro* and cultivated goji (*Lycium chinense* Mill.) fruit and leaves; polyphenols, antimicrobial activity, macro-and microelements and heavy metals.**

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie wykorzystywaniem w diecie i suplementach diety surowców o dużej wartości bioaktywnej i składzie chemicznym uzupełniającym dietę w mikro i makroskładniki. Z tego względu wykorzystuje się często jako surowiec zielarski całe rośliny korzenie, pędy liście, kwiaty i owoce. Zadanie badawcze podjęte w trzeciej pracy miało na celu przeanalizowanie materiału

roślinnego dwóch odmian jagody goji pochodzącego z uprawy polowej oraz z warunków *in vitro*, pod kątem zawartości mikro- i makroskładników, związków polifenolowych, aktywności przeciwbakteryjnej oraz wartości odżywczej. Oceniono stężenia makroelementów i mikroelementów. Na uwagę zasługuje wysokie stężenie żelaza i miedzi akumulowane przez roślinę w liściach. Spożycie 100 g świeżych jagód goji dziennie przyczynia się do pokrycia około 30% i 35% normy dziennej dla miedzi. Choć wydaje się, że znacznie cenniejsze są związki bioaktywne, w które roślina jest bogata. W praktyce nie będziemy uzupełniać makroskładników spożywając liście jagody goji. Natomiast wspomaganie organizmu zróżnicowanymi, cennymi związkami bioaktywnymi, odbywa się w znacznie mniejszej ilości masy roślinnej. Dlatego uważam te analizy za bardzo wartościowe od strony poznawczej. Na szczególną uwagę zasługuje fakt bardzo rzetelnej analizy składu chemicznego. W załączonej publikacji oceniono zawartości 25 związków fenolowych obecnych w owocach, a także potencjał antyoksydacyjny (DPPH i FRAP). W owocach oznaczono występowanie czterech kwasów organicznych. Parametry te były oznaczane dla dwóch odmian Nr 1 i New Big.

Porównanie stężenia pierwiastków w materiale pochodzącym z *in vitro* i z sadu nie wydaje się być zasadnym, gdyż o stężeniu akumulowanych pierwiastków będzie decydował skład pożywki oraz warunki atmosferyczne w danym sezonie. Natomiast można opisać tendencję do akumulacji niektórych związków i taka analiza byłaby bardzo ciekawa, myślę że można ją przedstawić na podstawie danych zebranych przez doktorantkę.

Bardzo interesujące są wyniki dotyczące antybakteryjnego działania ekstraktu z owoców w stosunku do pięciu groźnych bakterii *E. coli*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Informacje te mogą być wykorzystane poprzez dodatek ekstraktu z jagód goji do żywności, w celu stabilizacji mikrobiologicznej i mogą być przedmiotem dalszych bardzo interesujących projektów.

Czwarta praca **The effectiveness of disinfection methods on germination of goji seeds (*Lycium barbarum* L.) in *in vitro* culture**

Rozmnażanie jagody goji w warunkach *in vitro* jest bardzo trudne, roślina ta bardzo słabo rozmnaża się wegetatywnie i nie opracowano do tego do dzisiaj żadnego protokołu. Zakładanie kultur z merystemów czy pąków jest bardzo nieefektywne, choć

w przyszłości dla podtrzymania cech nowych odmian może stać się konieczne. Interesujące byłoby podjęcie wyzwania badawczego, pozwalającego na opracowanie składu pożywki do tej formy rozmnażania. Do tego gatunku najczęściej stosuje się techniki rozmnażania z nasion. Gatunek ten jest w dużym stopniu samopłodny, dlatego nasiona pozyskiwane z plantacji jednodmianowych w dość wiernie powtarzają cechy odmiany rodzicielskiej.

Opracowanie odpowiedniego protokołu odkażania nasion przed wprowadzeniem do kultury *in vitro* jest bardzo cenne. Wiele skutecznych środków dezynfekujących pozwala na ograniczenie infekcji bakteryjnych i grzybowych, ale też zmniejsza prawdopodobieństwo startu kultury. Określenie optymalnego środka dezynfekującego i jego stężenia jest bardzo istotne. Bardzo interesujący wydaje się sposób dezynfekcji za pomocą ozonowania. Metoda ta znajduje bardzo szerokie zastosowanie w produkcji ogrodniczej, jednak i w tym przypadku musi zostać określony precyzyjnie czas traktowania i stężenie ozonu w atmosferze dezynfekowanego materiału.

Piąta praca *Micropropagation, rooting, and acclimatization of two cultivars of goji (Lycium chinense)*.

Trudności z pozyskaniem dobrze ukorzonego materiału produkowanego *in vitro* spowodowało poszukiwanie metod wzbogacenia pożywki w substancje, które mogły by wspomóc uzyskanie większej liczby ukorzonego materiału. Pożywka standardowa MS uzupełniona *meta*-Topoliną w stężeniu 0,6 mgL⁻¹ oraz WPM bez dodatku roślinnych regulatorów pozwoliły na najlepszy wzrost eksplantatów. Do ukorzenia zastosowano standardową pożywkę MS wzbogaconą o 20 ppm chitozanu co pozwoliło na bardzo wysoki procent ukorzenia roślin. Trzeba wspomnieć że ten etap produkcji roślin w *in vitro* dla wielu gatunków przysparza wielu problemów. Dodatek chitozanu miał bardzo korzystny wpływ na ryzogenezę. Jest to bardzo interesujący aspekt badań. Przeniesienie roślin ze szkła w warunki szklarniowe wiąże się z dużym szokiem fizjologicznym. Rośliny muszą przystosować się do przyswajania substancji pokarmowych z innego podłoża. Badania

W procesie aklimatyzacji *ex vitro* mieszanina 90% torfu i 10% perlitu o wysokiej wilgotności (90%) była skutecznym podłożem dla odmian goji: No 1 i New Big. Uzyskane

wyniki mogą być przydatne do poprawy efektywności mikrorozmnażania i ukorzenia roślin kolcowoju.

Szósta praca **Alleviating effects of ascorbic acid on lead toxicity in goji (*Lycium barbarum* L.) *in vitro*.**

Możliwą strategią przetrwania dla roślin w warunkach stresowych (w tym obecności na przykład metali ciężkich) jest zastosowanie niektórych związków, które mogłyby łagodzić efekt stresu. Zastosowanie kwasu askorbinowego jako antyoksydantu pośredniczy w tolerancji na metale ciężkie. Wpływ różnych antyoksydantów wpływa na poprawę odporności i adaptacji do wielu abiotycznych czynników stresowych.

Dodatek do pożywki roztworu ołowiu miał negatywny wpływ na cechy morfologiczne goji takie, jak długość pędu i korzeni jest to oczywiste, gdyż jest to pierwiastek o wysokim stopniu toksyczności. Najwięcej zmian zaobserwowano w przypadku liczby korzeni, a także wpłynął negatywnie na cały wegetatywny wzrost rośliny. Dodanie do pożywki 1 mM ASA znacznie złagodziło reakcję wywołaną przez $Pb(NO_3)_2$.

Ekspozycja eksplantatów goji na działanie 1 mM $Pb(NO_3)_2$ zmniejszyła zawartość barwników takich jak chlorofil czy karotenoidy, w porównaniu z próbą kontrolną. Dodatek do pożywki 1 mM ASA w warunkach stresu metalami ciężkimi wyraźnie zwiększył zawartość chlorofilu a i b oraz karotenoidów. Ponadto zaobserwowano, że aplikacja samego 1 mM ASA istotnie zwiększyła zawartość barwników fotosyntetycznych (takich jak chlorofil, a oraz chlorofil b) i niefotosyntetycznych (karotenoidy). Ponadto, zaobserwowano, że po zastosowaniu 1 mM ASA lub 1 mM $Pb(NO_3)_2$ zawartość proliny w siewkach goji była istotnie wyższa w porównaniu z próbą kontrolną, co jest związane z silną reakcją na stres fizjologiczny w roślinie. Jednak należy nadmienić, że kolcowój chiński nie jest hiper akumulatorem metali ciężkich, więc raczej nie będzie wykorzystywany na glebach skażonych ołowiem w celu bioremedjacji tego pierwiastka. Kwas askorbinowy zmniejsza stres związany z obecnością metalu ciężkiego i jest to wniosek czytelny i oczywisty w przedstawionych badaniach. Natomiast nie jest dla mnie czytelny cel tego eksperymentu, nie znalazłam go w załączonym manuskrypcie. Dlatego podczas obrony publicznej warto byłoby ten cel przedstawić szerzej.

Wniosek końcowy: Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Arlety Kruczek zatytułowana „**Wpływ zabiegów agrotechnicznych na plonowanie kolcowoju chińskiego (*Lycium chinense* Moll.) oraz jego wzrost w kulturach in vitro**” jest zgodna z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668) i Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2018 r., poz. 261). Uważam rozprawę za oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i przyczynek do dalszych szczegółowych badań dotyczących uprawy kolcowoju chińskiego w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Stan wiedzy na temat agrotechniki tej rośliny jest niewielki, dlatego każde doświadczenie próbujące opracować technologię w oparciu o doskonałą znajomość fizjologii rośliny jest bezcenne. Wniosuję do Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego o dopuszczenie Pani mgr inż. Arlety Kruczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Kraków dnia 8.06 2022

Dr hab. Monika Bieniasz prof. URK

