



UNIwersYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
W BYDGOSZCZY

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH
Katedra Biologii Środowiska
dr hab. Justyna Lema-Rumińska, prof. uczelni



Al. Ossolińskich 12, 85-093 Bydgoszcz, tel. (52) 34 19 000 (w.118)
e-mail:

Bydgoszcz, 12.08.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Monika Figiel-Kroczyńska

pt. „Rozmnażanie oraz jakość owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.)”

Recenzja rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały nr 1 Komisji Doktorskiej, powołanej uchwałą nr 132 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 roku, przekazanej pismem z dnia 7. czerwca 2023 r. przez Pana prof. dr hab. inż. Arkadiusza Telesińskiego, Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Moniki Figiel-Kroczyńskiej**, doktorantki Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie, przygotowana została pod kierunkiem Pana dr hab. inż. Ireneusza Ochmiana, prof. ZUT. Promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim była Pani dr hab. inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz, prof. ZUT.

Rozprawa składa się z cyklu 5 powiązanych tematycznie publikacji pod wspólnym tytułem: **Rozmnażanie oraz jakość owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.)**. W skład cyklu wchodzi artykuły naukowe opublikowane w latach 2020-2022.

Trzy artykuły (z pięciu) wchodzące w skład rozprawy posiadają tzw. współczynnik wpływu *Impact Factor* (IF), który łącznie wyniósł 2.709 (jeden artykuł w *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* oraz dwa w *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*). Pozostałe artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie: *Acta Universitatis Cuiusvis*, *Series E: Food Technology* oraz *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. Łączna liczba punktów zgodna z rokiem opublikowania prac wg listy MEiN wyniosła 450.

świadczy o istotnym wkładzie w powstanie tych prac (potwierdzają to również oświadczenia autorów). Ponadto w jednej pracy Doktorantka jest także autorem korespondencyjnym.

Praca doktorska składa się z sześciu rozdziałów. Cykl publikacji poprzedzony jest opisem składającym się ze Streszczenia w j. polskim, Abstraktu w j. angielskim, Dorobku naukowego przedstawionego w tabeli oraz sześciu rozdziałów (1 – Wstęp teoretyczny, 2 - Cel badań, 3 – Materiał i metody badań, 4 - Omówienie wyników badań, 5 - Wnioski, 6 – Literatura). Do rozprawy dołączone zostały także kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji powiązanych tematycznie i oświadczenia autorów.

Tytuł rozprawy został trafnie określony i spaja cały cykl publikacji powiązanych z tematem rozmnażania i jakości owoców borówki wysokiej.

We Wstępie Doktorantka scharakteryzowała gatunek borówkę wysoką (syn. borówka amerykańska, łac. *Vaccinium corymbosum* L.) oraz omówiła krótko historię jego hodowli oraz uprawy na świecie oraz w Polsce. Następnie przeanalizowała właściwości prozdrowotne owoców oraz występujące w nich związki bioaktywne. Ponadto Autorka omówiła problemy związane z zapotrzebowaniem producentów na wysokiej jakości materiał rozmnożeniowy i rolę mikrorozmnażania oraz badań w tym zakresie. Zastosowanie kultur *in vitro* eliminuje ograniczenia związane z tradycyjnym rozmnażaniem sadzonek, stanowiąc alternatywę dla szybkiej, pozbawionej kontaminacji produkcji genetycznie identycznych roślin przez cały rok, co zwiększa opłacalność produkcji. Odpowiednia agrotechnika wpływa również na wzrost niektórych pożądaných przez konsumentów substancji zawartych w owocach, jakimi są między innymi polifenole. W rozdziale tym zostały także poruszone zagadnienia związane z wymaganiami konsumentów oraz czynnikami (bezpiecznymi dla zdrowia i środowiska) mogącymi wpłynąć pozytywnie na jakość owoców. We Wstępie poruszono także zagadnienia związane z alternatywnymi do suszenia możliwościami przetwórstwa owoców małych, pozostających na krzewach (stanowiących około 15% zbiorów). Jako bardziej przydatne zostało zaproponowane rozwiązanie liofilizacji, która umożliwia w większym stopniu niż suszenie zachowanie wartości odżywczych oraz długie przechowywanie owoców.

Głównym celem naukowym pracy doktorskiej było opracowanie efektywnej metody mikrorozmnażania trzech odmian borówki wysokiej oraz zbadanie wpływu czynników fizykochemicznych oraz dodatków funkcyjnych pochodzenia naturalnego na wzrost i rozwój roślin w warunkach laboratoryjnych. Cele szczegółowe obejmowały: opracowanie protokołu mikrorozmnażania borówki wysokiej dla wybranych odmian; opracowanie optymalnego składu pożywki do rozmnażania wybranych odmian w kulturach *in vitro*; określenie wpływu Actisilu (Hydroplus™), dodatków organicznych i pH podłoża na mikrorozmnażanie; ocena

skuteczności ukorzenia roślin/pędów w warunkach *in vitro* oraz ich aklimatyzację do warunków *ex vitro*; analiza ekonomicznych aspektów produkcji (źródło światła, możliwość zastąpienia drogich dodatków tańszymi odpowiednikami, wykorzystanie owoców niekomercyjnych) w celu uzyskania zadowalającego zwrotu z inwestycji; ocena możliwości użycia naturalnych i ekologicznych dodatków w produkcji roślin i owoców; ocena wpływu różnych rodzajów światła na wzrost i skład fizykochemiczny; porównanie skuteczności dwóch metod przechowywania owoców; określenie wpływu oprysku chitozanem na jakość owoców; porównanie wpływu zależności wielkości owoców oraz metody przygotowania na jakość liofilizowanych owoców.

Uważam, że podjęta problematyka badawcza związana z doskonaleniem metod mikrorozmnażania borówki wysokiej oraz oceną jakości owoców jest całkowicie zasadna i posiada wysoki potencjał aplikacyjny.

W rozdziale 3 Doktorantka przedstawiła materiały i metody wykorzystane w badaniach. Badania nad mikrorozmnażaniem i aklimatyzacją mikrosadzonek przeprowadzono w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Materiał roślinny stanowiły młode, zdrowe, intensywnie rosnące pędy trzech odmian borówki wysokiej ('Elizabeth', 'Liberty' i 'Meader'), pochodzące z krzewów uprawianych na ekologicznej plantacji położonej około 60 km na wschód od Szczecina. Szczegółowo omówione zostały metody dezynfekcji pędów i inicjacji kultur tkankowych oraz namnażanie a następnie ukorzenia pędów na różnych pożywkach z dodatkiem różnych kombinacji regulatorów wzrostu.

Doświadczenie w „fitotronie” przeprowadzono w gospodarstwie towarowym produkującym sadzonki borówki wysokiej w gminie Dobrzany (woj. zachodniopomorskie). Zastosowano tu różne źródła światła m.in. lampy LED biała zimna, przy $52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosyntetycznej gęstości strumienia fotonów (PPFD), Lampa LED Flora dla roślin, światło przy $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD; lampa rtęciowa z luminoforem L 36W/84 zimna biel, światło $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD; oraz lampa rtęciowa z luminoforem TLD 36W/16, czerwona, światło $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Liofilizację owoców przeprowadzono w Katedrze Ogrodnictwa ZUT w Szczecinie. Owoce pochodziły z dwóch gospodarstw (plantacja A i B) specjalizujących się w uprawie borówki wysokiej, położonych około 25 km na wschód od Szczecina, w Puszczy Goleniowskiej.

borówki wysokiej, położonych około 25 km na wschód od Szczecina, w Puszczy Goleniowskiej.

W procesie liofilizacji i rehydratacji owoce przed suszeniem zostały wstępnie zamrożone w temperaturze -35°C przez około 1-2 godziny. Następnie jagody poddano liofilizacji. Użyto do tego celu liofilizatora Christ model Alpha 1-2. Owoce rozdrobniono w zamkniętym młynku laboratoryjnym. W celu skrócenia czasu suszenia, owoce były wcześniej:

- a. nakłuwane igłą o średnicy 1 mm na głębokość ok 3-4 mm - wykonano 6 nakłuć na obwodzie owoców małych (<6 mm), większych ($6>$) 8 nakłuć,
- b. przecięte na pół wzdłuż osi średnicy,
- c. cały owoc - kontrola.

Związki fenolowe oznaczono przy użyciu systemu UPLC-PDA-MS/MS Waters ACQUITY (Waters, Milford, MA, USA).

Stężenie proliny oznaczono według metody Batesa i in. (1973) przy użyciu spektrofotometru przy 520 nm w świeżych liściach borówki i obliczono jako $\mu\text{mol g}^{-1}$ świeżej masy. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA, produktu peroksydacji lipidów) w tkance roślinnej oznaczono metodą opisaną przez Sudhakara i in. (2001). Stężenie MDA obliczono z absorbancji przy 600, 532 i 450 nm.

Aktywność katalazy (CAT) oznaczono według procedury Lücka (1963). Zawartość pierwiastków N, P, K i Ca w liściach oznaczono po mineralizacji na mokro w H_2SO_4 , natomiast Cu, Zn, Mn i Fe oznaczono po mineralizacji w HNO_3 (65%) i HClO_4 (70%) wg IUNG 1972. Stężenie azotu całkowitego oznaczono metodą destylacji Kjeldahla (Lityński i in., 1976). Zawartość K zmierzono za pomocą atomowej spektrometrii emisyjnej natomiast zawartość Mg, Ca, Cu, Zn, Mn i Fe mierzono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu. Zawartość P oszacowano metodą kolorymetryczną.

Analizę stopnia porażenia owoców przez grzyby (drożdże i pleśnie) oparto na normie europejskiej ISO 70. Po wyhodowaniu inokulacji grzybów tworzących zarodniki próbki poddano ocenie taksonomicznej tradycyjną metodą obserwacji makroskopowej kolonii oraz obserwacji mikroskopowej zarodników i włókien.

Mikotoksyny oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – tandemowej spektrometrii masowej (HPLC-MS/MS). Barwę (kolor) liści (ze środkowej części pędu) mierzono w trybie transmisji metodą fotokolorymetryczną w systemie CIE $L^*a^*b^*$ przy użyciu spektrofotometru CM-700d (Konica Minolta, Osaka, Japonia).

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12.5 i 13.0 (StatSoft Polska, Kraków, Polska). Istotność statystyczną różnic między średnimi

określono testując jednorodność wariancji i normalności rozkładu, a następnie ANOVA z testem post hoc Tukeya. Istotność ustalono na $p < 0,05$.

W mojej opinii materiał i metody zostały właściwie dobrane i opisane przez Doktorantkę.

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

W publikacji 1 pt. „Efficient micropropagation protocol of three cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) opublikowanej w czasopiśmie *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* celem przeprowadzonych badań było opracowanie protokołu mikrorozmnażania trzech odmian borówki wysokiej. Wyniki badań wykazały istotne różnice w wartości analizowanych parametrów roślin borówki wysokiej w zależności od zastosowanego do namnażania pędów podłoża oraz jego modyfikacji. Najwyższą wartość współczynnika regeneracji pędów między 80 a 100% uzyskano dla różnych kombinacji pożywek WPM i MW. Przedstawione wyniki potwierdzają ponadto, że proces ryzogenezy *in vitro* *Vaccinium corymbosum* zależy od odmiany oraz warunków wzrostu rośliny. Opracowany protokół regeneracji *in vitro* borówki wysokiej może pomóc w optymalizacji metodyki rozmnażania innych odmian borówki wysokiej oraz roślin z gatunku *Vaccinium* i może być przydatny np. do produkcji certyfikowanego materiału rozmnożeniowego lub do celów biotechnologicznych.

W publikacji 2 pt. „Effect of Actisil (Hydroplus™), organic supplements, and pH of the medium on the micropropagation of *Vaccinium corymbosum* opublikowanej w czasopiśmie *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, stwierdzono, że efektywność mikrorozmnażania *V. corymbosum* odmiany ‘Liberty’ można poprawić poprzez dodatek do pożywki roztworu Hydroplus™ Actisil w stężeniu 200 mg dm⁻³. Zastosowanie wody kokosowej jako naturalnego kompleksu organicznego wpływa stymulująco na wzrost i rozwój roślin borówki *in vitro* i może być stosowana jako zamiennik zeatyny. Najwyższą efektywność mikrorozmnażania uzyskano na podłożu WPM o pH 5. Spośród zastosowanych związków, tylko roztwór krzemu (Hydroplus™ Actisil) wykazał łagodzące działanie negatywnych skutków wywołanych podwyższonym pH pożywki.

Publikacja 3 zatytułowana „Influence of various types of light on growth and physicochemical composition of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves, opublikowana została w *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. Dotyczyła ona wpływu światła na wzrost i rozwój roślin borówki wysokiej. Stwierdzono, że lampy LED dają około 50% oszczędności w porównaniu do stosowania fluorescencyjnych świetlówek. Ekonomia

stosowanie białego światła LED, które ma pozytywny wpływ ekonomiczny na produkcję roślinną ze względu na niskie zużycie energii elektrycznej i korzyści dla środowiska poprzez eliminację rtęci ze źródła światła. Uzyskana pod tym źródłem światła jakość roślin jest zbliżona do tej którą uzyskuje się przy świetle białym ze świetlówek fluorescencyjnych.

W publikacji 4 pt. „Effect of chitosan-based spraying on fruit quality of highbush blueberry cv. Sunrise” opublikowanej w czasopiśmie *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, dowiedzono, że opryskiwanie owoców chitozanem może być zalecane w ekologicznej uprawie borówki wysokiej w celu uzyskania jędrniejszych owoców o zwiększonych właściwościach prozdrowotnych.

W publikacji 5 pt. „The quality of freeze-dried and rehydrated blueberries depending on their size and preparation for freeze-drying”, opublikowanej w *Acta Universitatis Cibinensis, Series E: Food Technology*, potwierdzono, że owoce borówki wysokiej odmiany ‘Brigitta Blue’ polecane są do dłuższego przechowywania. Charakteryzują się grubą skórką i intensywnym nalotem woskowym, który chroni owoce przed wędnięciem. Owoce, które nie nadają się do sprzedaży ze względu na ich małe rozmiar można zamrozić lub wysuszyć. Stwierdzono, że liofilizacja jest dobrą metodą konserwacji owoców borówki wysokiej, pozwalającą na utrzymanie właściwości prozdrowotnych na wysokim poziomie.

Na podstawie przeprowadzonych badań osiągnięto założone cele badawcze, które zamieszczono w cyklu powiązanych tematycznie publikacji stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Do najważniejszych wniosków rozprawy doktorskiej Pani Mgr inż. Moniki Figiel-Kroczyńskiej należy zaliczyć:

1. Wykazanie, że uzyskanie przez producenta zadowalającego zwrotu z inwestycji, wymaga analizy każdego etapu produkcji. Począwszy od wyboru materiału roślinnego, użytej pożywki do namnażania kultur *in vitro*, aplikowanych dodatków (Hydroplus™ Actisil, chitozan, woda kokosowa), źródła światła zastosowanego, aż po zagospodarowanie niekomercyjnych owoców (liofilizacja).
2. Opracowanie protokołów mikrorozmnażania borówki wysokiej dla wybranych odmian (‘Elizabeth’, ‘Liberty’, ‘Meader’).
3. Wykazanie, że zastosowanie substancji biologicznie czynnych daje pozytywne efekty zarówno w kulturach *in vitro* jak i w uprawie polowej borówki, a także wpisuje się w

3. Wykazanie, że zastosowanie substancji biologicznie czynnych daje pozytywne efekty zarówno w kulturach *in vitro* jak i w uprawie polowej borówki, a także wpisuje się w ekologiczne trendy produktów do spożycia. Woda kokosowa jako naturalny kompleks substancji organicznych, może stanowić zamiennik dla komercyjnie stosowanej zeatyny. Komercyjny roztwór Si (Hydroplus™ Actisil) może być z powodzeniem stosowany w kulturach *in vitro* borówki wysokiej jako środek łagodzący stres wywołanym podwyższonym pH pożywki. Zastosowanie chitozanu w formie oprysku w okresie intensywnego wzrostu owoców, pozytywnie wpłynęło na ich jakość (ograniczenie wzrost patogenów grzybowych, wzrost masy owoców, poprawa jędrności i składu chemicznego).

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiony cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Rozmnażanie oraz jakość owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.)” stanowi dobrą podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

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

Uwagi i pytania:

1. W Streszczeniu pracy doktorskiej brakuje (na początku) nazwy łacińskiej określającej gatunek. Ponadto we Wstępie brakuje wyjaśnienia dla nazwy synonimowej gatunku (borówka amerykańska), która jest powszechnie używana dla określenia gatunku *Vaccinium corymbosum*.
2. W Streszczeniu pracy pojawia się określenie „fitochemikaliów” w odniesieniu do antocyjanów. Lepsze określenie byłoby tu „fitozwiązki” lub „związki bioaktywne”.
3. W pracy doktorskiej pojawiają się określenia typu: „sadzonki do hodowli przemysłowej”, „rośliny zostały przeniesione na plantację borówki,...gdzie hodowano je...” itp. Proszę wyjaśnić czy na pewno chodziło tu o „hodowlę” czy o „uprawę”?
4. Czy określenie „certyfikowany materiał wegetatywny” nie powinien brzmieć: „certyfikowany materiał rozmnożeniowy”?
5. Niektóre skróty nie zostały wyjaśnione w pracy, np. test FRAP.
6. Na stronie 10 (drugi akapit) antocyjany zostały wymienione oddzielnie od flawonoidów do których należą, jakby tworzyły odrębną grupę związków. Dlaczego?

7. W pracy zeatyna określona jest jako hormon. Jednak jest to związek już wyekstrahowany z rośliny i dodany do pożywki egzogenicznie. Czy nie powinien występować tu jako regulator wzrostu?
8. Nazwy odmian powinny być pisane z pojedynczym górnym apostrofem (wyjątek stanowią tabele i wykresy, gdzie można pominąć apostrof).
9. Jednostki wymagają ujednoczenia pisowni w pracy doktorskiej np. litry (L czy l?).
10. Wielokrotnie w pracy doktorskiej pada określenie „fitotron”. Mam jednak wątpliwość czy nie był to jednak pokój wzrostowy? Czy mogłaby się Pani do tego ustosunkować?
11. Natężenie światła wyrażone $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosyntetycznej gęstości strumienia fotonów (PPFD) pomiędzy zastosowanymi w badaniach źródłami światła różniła się (wynosiła od 60 dla lampy LED Flora dla roślin do 13 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dla lampy rtęciowej z luminoforem). Czy Pani zdaniem większe znaczenie na końcowy wynik doświadczenia miał typ lampy i spektrum światła czy też natężenie światła?
12. W publikacji 1 niektóre zdjęcia są nieczytelne, szczególnie jeśli chodzi o napisy pod zdjęciami, brakuje także odniesienia wielkości (tzw. „bar”) np. na zdjęciach mikrosadzonek.

Podsumowanie

Podsumowując, niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **Pani Mgr inż. Moniki Figiel-Kroczyńskiej pt. „Rozmnażanie oraz jakość owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.)”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (z późn. zm.) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. 2023, poz. 742). Z tego względu przedkładam wniosek do Wysokiego Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie **Pani Mgr inż. Moniki Figiel-Kroczyńskiej** do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

