



Kraków 11. 12. 2023

dr hab. Marta Libik-Konieczny

Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego*

Polska Akademia Nauk

ul. Niezapominajek 21

30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Marii Witusińskiej pt:

” Wpływ niklu na procesy związane ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem azotu w siewkach ogórka”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Marii Witusińskiej została przygotowana w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem dr hab. Ewy Gajewskiej, prof. UŁ. Prace badawcze omawiane w rozprawie dotyczyły wpływu niklu (Ni) na funkcjonowanie roślin ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.) w uprawie hydroponicznej, wpisując się w główny nurt zainteresowań naukowych Promotorki, tj. odpowiedzi roślin uprawnych na działanie metali ciężkich.

Nikiel jest pierwiastkiem naturalnie występującym w niewielkich ilościach w glebie i wodach powierzchniowych, gdzie dostaje się w wyniku procesu wietrzenia skał i ostatecznie jest pobierany przez rośliny głównie poprzez system korzeniowy. Nikiel został zakwalifikowany jako jeden z mikroelementów niezbędnych do optymalnego wzrostu i rozwoju roślin, pełniąc istotną rolę w różnych procesach metabolicznych. Ze względu na wzmożoną działalność antropogeniczną, stężenie niklu w środowisku znacznie przekracza obecnie poziom zbliżony do naturalnego, co powoduje zaburzenia w jego przyswajaniu przez rośliny, a tym samym prowadzi do wielu niekorzystnych efektów. Wykazano, że toksyczne stężenia niklu mogą zaburzać podstawowe procesy metaboliczne i hamować wzrost roślin. Z tego powodu badania naukowe skupiające się na funkcjonowaniu roślin uprawnych w warunkach wysokiego stężenia niklu wydają się być szczególnie istotne z punktu widzenia rolnictwa i ekologii.

Doktorantka postawiła sobie za cel pracy poznanie mechanizmów fitotoksyczności niklu na przykładzie roślin ogórka siewnego, zakładając, że jego szkodliwe działanie będzie dotyczyć indukcji stresu oksydacyjnego oraz zaburzeń w metabolizmie azotowym. Badania mające na celu weryfikację postanowionego celu pracy obejmowały: pomiary parametrów wzrostowych roślin i wydajności fotochemicznej fotosyntezy, wizualizację reaktywnych form tlenu w liściach, analizę stężenia wybranych związków będących wyznacznikami stresu oksydacyjnego, pomiary aktywności wybranych elementów systemu antyoksydacyjnego oraz aktywności enzymów związanych z metabolizmem azotowym, a także ekspresji wybranych genów kodujących te enzymy. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała kilka wniosków, z których najważniejsze w mojej opinii są: (1) organospecyficzny wpływ niklu na rośliny ogórka siewnego w uprawie hydroponicznej obejmujący hamowanie wzrostu korzeni i akumulację metalu w tym organie, (2) zaburzenia w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego pod wpływem zastosowanych stężeń niklu, przejawiające się obniżeniem zawartości barwników fotosyntetycznych i zmniejszeniem wydajności fotochemicznej fotosystemu II, (3) indukcja stresu oksydacyjnego objawiającego się wzrostem ilości anionorodnika ponadtlennego i nadtlenu wodoru w liściach, co prowadzi do zwiększenia ilości produktów peroksydacji lipidów i wzrostu przepuszczalności błon plazmatycznych, (4) zakłócenia w funkcjonowaniu systemu antyoksydacyjnego, obejmujące zmiany w aktywności wybranych enzymatycznych antyoksydantów oraz w ilości i profilu antyoksydantów nieenzymatycznych, takich jak związki fenolowe, (5) zaburzenia w metabolizmie azotowym, poprzez rozregulowanie funkcji enzymów odpowiedzialnych za pobieranie, transport i przemiany azotu, zarówno na poziomie aktywności, jak i ekspresji genów kodujących te enzymy.

Praca doktorska, w której Doktorantka zaprezentowała wyniki swojej działalności naukowej ma klasyczną formę rozprawy naukowej. Jest podzielona na rozdziały typowe dla rozpraw eksperymentalnych tj. Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literatura. Główny tekst pracy poprzedzony jest Spisem treści, Wykazem stosowanych skrótów oraz zestawieniem Źródeł finansowania badań. Rozprawa liczy 160 stron bez spisu literatury, który z kolei obejmuje 287 pozycji cytowanego piśmiennictwa, z czego wiele to pozycje nie starsze niż kilka lat, a ich dobór nie budzi zastrzeżeń. Tekst został uzupełniony 79 rycinami i 4 tabelami, które skutecznie wspierają opis badanego zagadnienia i dokumentują uzyskane rezultaty. Rozprawa została napisana poprawnym językiem, tekst jest starannie edytowany, choć, co nieuniknione, można znaleźć nieliczne błędy literowe, interpunkcyjne i stylistyczne, które jednak nie mają wpływu na jakość merytoryczną pracy. Spośród uwag o charakterze redaktorsko-językowym moje największe zastrzeżenie budzi nazwa „orzeszki

ziemne” użyta w rozdziale Dyskusja str 125. Jest to nazwa potoczna rośliny Orzacha podziemna (*Arachis hypogaea* L) i taki termin należałoby stosować w opracowaniu naukowym.

Rozdział „Wstęp” prezentuje obszernie informacje niezbędne dla czytelnika do zrozumienia naukowego kontekstu projektu doktorskiego. Największą część tego rozdziału zajmują informacje na temat stresu oksydacyjnego i sytemu antyoksydacyjnego przedstawione na podstawie podręcznikowej wiedzy z ilustracjami zaczerpniętymi z prac przeglądowych. Jak podaje Doktorantka, ilustracje te zostały zmodyfikowane. Jednak w mojej ocenie nie mogą być uznawane za autorski pomysł Doktorantki, bowiem w większości modyfikacja polegała na przetłumaczeniu angielskich nazw na język polski. Nieuzasadnione jest włączenie podrozdziałów opisujących oksydacyjne uszkodzenia białek oraz oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych. Chciałabym prosić o wyjaśnienie jaki był cel szczegółowego opisu tych zagadnień w kontekście badań, które prowadziła Pani Doktorantka. W mojej ocenie, brakuje spójności między poszczególnymi podrozdziałami wstępu, co uniemożliwia czytelnikowi skoncentrowanie się na istotnym problemie badawczym, jaki postawiła sobie Doktorantka. Cel pracy przedstawiony przez Doktorantkę nie jest wystarczająco precyzyjny. Doktorantka ograniczyła się do trzech punktów, z których tylko w pierwszym punkcie można znaleźć właściwie opisany cel badań i planowane metody jego osiągnięcia. Pozostałe dwa punkty (punkt 2 i 3) nie spełniają, w mojej ocenie, standardów celów naukowych. Może to wynikać z braku sformułowania hipotezy badawczej oraz braku jasno określonych oczekiwań co do rezultatów badań. Zalecałabym połączenie informacji zawartych w tych trzech punktach w celu sformułowania klarownej hipotezy, którą Doktorantka miała zamiar zweryfikować w trakcie swoich badań.

Rozdział "Materiały i metody" jest dosyć drobiazgowy, ponieważ opisuje liczne metody wykorzystane w projekcie doktorskim. Opis poszczególnych procedur laboratoryjnych w mojej opinii jest zbyt obszerny, dla przykładu rozdzielenie opisu pomiaru aktywności enzymatycznej na części „zasada metody” i „wykonanie pomiaru” jest niepotrzebne, zwłaszcza, że opis zasady metody w wielu przypadkach jest niepełny. Zastanawia mnie również w jakim celu do przygotowania ekstraktów białkowych przeznaczonych do zmierzenia aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych dodawano askorbinian? Podobnie, opis zasady metody RT-qPCR nie wydaje się być potrzebną informacją. Zamiast tego, Doktorantka powinna była zamieścić informacje dotyczące zaprojektowanych sekwencji starterów wykorzystywanych w analizie. Zwykle takie dane przedstawia się w tabeli wraz z informacją o sposobie projektowania starterów lub źródłem publikacyjnym, z którego pochodzą te dane. Warto także zauważyć, że brakuje informacji dotyczących sposobu przygotowania materiału roślinnego. Stwierdzenie "...tkankę liści i korzenia suszono" (rozd. Metody str. 52) wymaga precyzyjniejszego opisu, czy materiał roślinny był poddawany liofilizacji czy innemu procesowi (np. w jakiej temperaturze ten proces przebiegał i w

jakim czasie o ile używano suszarki laboratoryjnej). Moje wątpliwości budzi również materiał roślinny, na którym pracowała Doktorantka. Opisano bowiem materiał jako siewki ogórka, podczas gdy zarówno zdjęcia materiału roślinnego jak i późniejsze opisy badań wskazują, że Doktorantka pracowała na młodych roślinach, które posiadały już wykształcone liście właściwe. Siewka to według definicji struktura powstała zaraz po wykiełkowaniu z nasiona, wykorzystująca do wzrostu materiały zgromadzone w nasionie.

Rozdział "Wyniki" jest stosunkowo obszerny, co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę szeroki zakres prac eksperymentalnych. Uzyskane rezultaty są przedstawione w czytelny sposób. Wyniki każdego badania zostały prawidłowo opisane i zilustrowane za pomocą rycin. Wyjątek stanowi jedynie rycina 35, która jest wg mojej opinii mało czytelna. Myślę, że podczas przygotowania manuskryptu do publikacji uwzględniającej wyniki zaprezentowane na tej rycinie należałoby pomyśleć o innej formie ich przedstawienia.

W dyskusji uzyskanych wyników, Doktorantka wydzieliła cztery podrozdziały, odpowiadające postawionym celom badań. Rezultaty badań zostały porównane z wynikami doświadczeń prowadzonych w ostatnich latach przez naukowców na różnych gatunkach roślin. W tej części rozprawy zabrakło jednak informacji czy na podstawie uzyskanych wyników oraz opublikowanych już danych literaturowych Doktorantka zaobserwowała ogólny trend w mechanizmach reakcji roślin z różnych grup taksonomicznych na stres spowodowany absorpcją i akumulacją niklu?

Wnioski przedstawione przez Panią Doktorantkę w 10 punktach są klarowne. Niemniej jednak, oczekiwałam, aby konkluzje były bardziej skoncentrowane na podsumowaniu i wyjaśnieniu mechanizmów, które prowadzą do szkodliwych efektów działania niklu na rośliny ogórka siewnego, zamiast jedynie opisu poszczególnych wyników doświadczeń.

W rozdziale „Literatura” nie widzę powodu, aby przypisywać cyfry do poszczególnych prac naukowych, które zostały usystematyzowane alfabetycznie. W tekście głównym cytowane są według nazwiska pierwszego autora, a nie według numeru przypisanego w tym rozdziale. Aczkolwiek, muszę zaznaczyć, że z punktu widzenia recenzenta, stanowi to duże ułatwienie.

Ostatnia uwaga dotyczy angielskiej wersji streszczenia pracy, którą Doktorantka zatytułowała „Abstract”. W mojej opinii, jest to niewłaściwy tytuł dla formy, którą przedstawiła Pani Witusińska. Abstrakt to zazwyczaj skrót, który koncentruje się na kluczowych elementach zawartych w pracy naukowej. Tymczasem, informacje napisane przez Doktorantkę w wersji angielskiej są tłumaczeniem poprzedzającego ten rozdział streszczenia i powinny być też tak zatytułowane. W związku z tym, „Summary” byłoby bardziej odpowiednim tytułem.

Lektura przedstawionej do recenzji rozprawy nasunęła mi pytanie, na które chciałabym, aby Pani Doktorantka odpowiedziała podczas publicznej obrony swojej pracy. Odpowiedź roślin na

stres metalami ciężkimi obejmuje nie tylko indukcję stresu oksydacyjnego, ale także nadmierną produkcję reaktywnych form azotu, co nazywane jest stresem nitrozacyjnym. Ponadto, istnieje przekonanie, że istnieje ścisła współpraca pomiędzy reaktywnymi formami tlenu i azotu w indukcji odpowiedzi roślin na stres. Czy mogłaby Pani omówić kluczowe mechanizmy związane z rolą reaktywnych form azotu w reakcjach roślin na stres metalami ciężkimi? Ponadto, jak Pani uważa, zrozumienie tych mechanizmów może przyczynić się do poprawy tolerancji roślin na stres metalami ciężkimi?

Wniosek końcowy:

Mgr Witusińska wykazała się biegłością w różnych technikach laboratoryjnych, odpowiednim poziomem wiedzy teoretycznej, a także zdolnościami analizy dużych ilości danych doświadczalnych i syntezy obserwacji naukowych oraz prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Moim zdaniem praca doktorska przedstawiona do oceny spełnia kryteria wymagane dla rozprawy doktorskiej (zgodnie z artykułem 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dziennik Ustaw z 2022 r., poz. 574, z późn. zm.) i zwracam się do **Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne** o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Marii Witusińskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

dr hab. Marta Libik-Konieczny – profesor Instytutu