

Lublin, 13 listopada 2023 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. (081) 537 50 64
email: mwojcik@umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Aleksandry Marii Witusińskiej
pt. „Wpływ niklu na procesy związane ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem azotu
w siewkach ogórka”

wykonanej w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin
na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
pod kierunkiem dr hab. Ewy Gajewskiej, prof. UŁ

Procesy naturalne i działalność antropogeniczna przyczyniają się do wzbogacenia środowiska w metale ciężkie, co niesie ze sobą negatywne konsekwencje dla funkcjonowania ekosystemów i zdrowia człowieka. Obecność toksycznych stężeń metali, w tym niklu (Ni), w glebie obniża jakość i ilość plonów, a w skrajnych przypadkach eliminuje zanieczyszczone tereny z wykorzystania na cele rolnicze. Rośliny uprawiane na zanieczyszczonych terenach mogą stać się źródłem przenikania metali do łańcuchów troficznych, na szczycie których stoi człowiek. Dlatego poznanie mechanizmów toksyczności metali oraz odporności na metale w roślinach uprawnych jest interesującym i ważnym zagadnieniem badawczym podejmowanym przez naukowców na całym świecie. W tym kontekście uważam, że podjęta w ocenianej rozprawie doktorskiej tematyka badawcza, jak również model roślinny wybrany do badań są jak najbardziej właściwe i uzasadnione. Celem pracy była ocena odpowiedzi siewek ogórka, który jest popularną rośliną uprawną na całym świecie, na toksyczność niklu. Rośliny uprawiano hydroponicznie w kontrolowanych warunkach fotoperiodu, temperatury i wilgotności powietrza na pożywcę kontrolnej lub w obecności 10 μ M Ni przez 2-3 tygodnie. Analizowano wzrost roślin, parametry stresu oksydacyjnego oraz mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, pobieranie i metabolizm azotu, wydajność fotosyntezy, profil lipidów i związków fenolowych. Zastosowany układ eksperymentalny jest dobrze zaplanowany i poprawny, wykorzystane metody analityczne są bardzo różnorodne i adekwatne do postawionych celów, co pozwoliło na uzyskanie rzetelnych i wartościowych wyników.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania formalne stawiane pracom eksperymentalnym. Treść dysertacji, obejmującej 183 strony maszynopisu, została podzielona na 9 rozdziałów, poprzedzonych wykazem stosowanych



skrótów. Zamieszczone na końcu pracy streszczenia w języku polskim i angielskim wyodrębniono jako oddzielne rozdziały (Rozdział 7 i 8). Dokumentację pracy stanowi w sumie 79 rycin oraz 4 tabele. Wszystkie rozdziały dysertacji zostały przedstawione poprawnie, z zachowaniem odpowiednich proporcji, dostarczając wszelkich niezbędnych informacji, wskazując na orientację Pani mgr Aleksandry Witusińskiej w problematyce badawczej oraz umiejętność prowadzenia wywodu naukowego.

Rozdział 1. – „Wstęp” (38 stron maszynopisu) przedstawia bardzo logicznie poprowadzoną i przejrzystą przedstawioną syntezę wiadomości, które stanowią doskonałe wprowadzenie do badań prezentowanych w pracy. Rozdział ten został podzielony na cztery podrozdziały, w których dodatkowo wyróżniono podpunkty precyzujące zagadnienia omawiane w ramach tych podrozdziałów. Na początku Doktorantka przedstawiła źródła, stężenia i formy niklu w środowisku, a następnie dokładnie omówiła pozytywny i negatywny wpływ tego pierwiastka na rośliny. W kolejnych dwóch podrozdziałach wzorowo i wyczerpująco przedstawiła zagadnienie stresu oksydacyjnego w roślinach i mechanizmy obronne roślin przed tym stresem. Opisała reaktywne formy tlenu (RFT) i procesy, w których są generowane, negatywne oddziaływanie RFT na lipidy, białka i kwasy nukleinowe, a także enzymatyczne i nieenzymatyczne elementy systemu antyoksydacyjnego roślin. Na zakończenie przedstawiła metabolizm azotu w roślinach, ze szczególnym uwzględnieniem roli poszczególnych enzymów uczestniczących w przemianach i asymilacji pobranych form azotu. Niewątpliwą zaletą tego rozdziału są schematy (7), które w bardzo przejrzysty i graficznie estetyczny sposób ilustrują omawiane zagadnienia. Opisy i ilustracje przedstawione w tym rozdziale stanowią doskonały materiał dydaktyczny.

Rozdział 2. przedstawia „Cel pracy”. Po krótkim wprowadzeniu wyjaśniającym zasadność podjęcia badań wpływu niklu na siewki ogórka, sformułowano w trzech punktach cele pracy. Głównym celem przeprowadzonych badań było poznanie mechanizmów toksycznego działania niklu na szereg procesów fizjologicznych i biochemicznych, związanych przede wszystkim ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem azotu w różnych organach roślin ogórka (korzenie, starsze i młodsze liście), w zależności od czasu ekspozycji na ten metal. Cele pracy zostały właściwie sformułowane. Cele szczegółowe przedstawiają kolejne badane parametry, których analiza w takiej sekwencji została przedstawiona w kolejnych rozdziałach dysertacji.

W rozdziale 3. „Materiały i metody”, Autorka przedstawiła przebieg eksperymentu, opisała również szczegółowo metody badania parametrów morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych roślin, a także metody molekularne oraz stosowane analizy statystyczne. Wszystkie procedury i metody badawcze, począwszy od założenia hodowli roślinnych, aż po kolejne przeprowadzane analizy materiału roślinnego zostały opisane precyzyjnie, w sposób pozwalający na ich odtworzenie. Zastosowane metody badawcze są adekwatne do założonych celów. Należy podkreślić szeroki wachlarz metod analitycznych wykorzystanych w badaniach, w tym m.in.: spektrometria absorpcji atomowej do określenia profilu pierwiastków w organach roślin; konduktometryczny pomiar integralności błon komórkowych; fluorescencja chlorofilu *a* do określenia sprawności aparatu fotosyntetycznego; spektrofotometryczne analizy stężenia barwników fotosyntetycznych, poziomu fenoli czy aktywności enzymów; chromatografia cieczowa (LC) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) sprzężoną z tandemową spektrometrią mas do analizy profilu lipidów oraz HPLC do oznaczenia profilu związków fenolowych; histochemiczne analizy akumulacji RFT; wreszcie analiza profilu ekspresji



wybranych genów związanych z metabolizmem azotu przy użyciu nowoczesnych metod molekularnych. Opis i wielość metod badawczych wskazuje również na wielki nakład pracy włożony w przeprowadzenie doświadczeń.

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona prawidłowo i czytelnie przedstawiona na rycinach i w tabelach.

Rozdział 4. – „Wyniki” stanowi najobszerniejszą, liczącą 48 stron część dysertacji. Wyodrębniono w nim aż 14 podrozdziałów, zawierających dodatkowe podpunkty. Mimo tak olbrzymiej ilości uzyskanych wyników, Autorka przedstawiła je w sposób systematyczny, logiczny i czytelny, w oparciu o liczne ryciny (70) i trzy tabele. Wykresy zostały przygotowane bardzo starannie, a konsekwentne stosowanie ich układu i kolorystyki we wszystkich analizach bardzo ułatwia śledzenie wyników i porównywanie poszczególnych parametrów w danych warunkach eksperymentalnych. Bardzo podoba mi się zestawienie wyników analizy zawartości anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru w postaci skanów wybarwionych liści oraz wykresów na Ryc. 31.

W rozdziale 5. „Dyskusja”, podzielonym dla większej przejrzystości na cztery podrozdziały, Autorka dokonała wielostronnej analizy i interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do tych opublikowanych w literaturze światowej. W kolejnych podrozdziałach przeanalizowała wpływ niklu na wzrost siewek, procesy pro- i antyoksydacyjne, poziom i profil związków fenolowych oraz metabolizm azotu. Dyskusja została przeprowadzona w sposób bardzo dojrzały, bez zbędnych powtórzeń wyników i w nawiązaniu do stawianych celów badawczych. Na zakończenie każdego podrozdziału dyskusji Autorka dokonała syntetycznego podsumowania i interpretacji najważniejszych osiągnięć, co wskazuje na doskonałą orientację w problematyce pracy, umiejętność krytycznego myślenia i wyciągania wniosków na podstawie wyników wielu przeprowadzonych przez siebie analiz. Dowodzi to również, że dobór parametrów do analiz i metod badawczych nie był przypadkowy, a miał prowadzić i prowadził do wyjaśnienia mechanizmów toksycznego działania niklu na siewki ogórka oraz wskazania mechanizmów obronnych.

Rozdział 6. – „Wnioski” zawiera 10 punktów przedstawiających najważniejsze osiągnięcia, sformułowane poprawnie i zgodnie z postawionymi celami badawczymi. Moim zdaniem Doktorantka zbyt skromnie odniosła się do swoich osiągnięć, nie uwypuklając swoich nowatorskich dla nauki wyników, jak choćby analiza wczesnych produktów peroksydacji lipidów w roślinach od wpływu niklu, co nie było wcześniej badane.

Wykaz piśmiennictwa (Rozdział 9. – „Literatura”) liczy aż 287 pozycji literatury, w tym tylko 7 pozycji literatury polskojęzycznej. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni, bardzo dobrze powiązany z tematyką pracy. Za wartościowe uważam odwołania do literatury źródłowej z połowy 20. wieku (m.in. Hoagland i Arnon, 1950), jak również wykorzystanie literatury najbardziej aktualnej, opublikowanej w ostatnich latach.

Przeprowadzone badania toksyczności niklu w siewkach ogórkach były kompleksowe i wielowątkowe, i dostarczyły wielu wartościowych dla nauki wyników. Mają one bardzo dużą wartość poznawczą, jednak nie prowadzą bezpośrednio do ewentualnego ich praktycznego wykorzystania.



Wśród najważniejszych, spośród długiej listy, osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy należy wymienić:

- potwierdzenie na podstawie licznych i różnorodnych badań, że nikiel wykazuje wielostronne działanie toksyczne na rośliny, a u podstaw jego toksyczności leży m.in. indukcja stresu oksydacyjnego i zaburzenia w pobieraniu i metabolizmie azotu, co skutkuje zahamowaniem procesu fotosyntezy i wzrostu roślin;
- pionierskie doniesienia, że nikiel wywołuje w roślinach oksydacyjne uszkodzenie lipidów oraz podanie profilu lipidów błonowych (wczesnych i końcowych produktów peroksydacji, klas fosfolipidów), a także stwierdzenie wzrostu stopnia nienasycenia fosfolipidów pod wpływem niklu, skutkujące zaburzeniem integralności i funkcjonalności błon;
- wykazanie, że nikiel powoduje zmianę profilu związków fenolowych i wzrost aktywności peroksydaz klasy III (GPOX, SPOX), co może zwiększać potencjał antyoksydacyjny siewek ogórka (np. wzrost stężenia kwasu chlorogenowego), ale również w sposób bezpośredni ograniczać toksyczność tego pierwiastka poprzez chelatowanie metalu przez związki fenolowe lub unieruchamianie w ścianie komórkowej na skutek jej zwiększonej lignifikacji;
- wykazanie zmiany aktywności poszczególnych enzymów zaangażowanych w metabolizm azotu, a zwłaszcza potencjalnej roli NADH-GOGAT i NADH-GDH w syntezie glutaminy w warunkach stresu niklu.

Warto podkreślić, że Autorka swobodnie posługuje się językiem polskim i używa fachowej terminologii, a styl pisania jest gładki i przyjemny dla czytelnika. Praca jest napisana wyjątkowo starannie i estetycznie, jednak przy tej objętości tekstu nie udało się uniknąć kilku drobnych pomyłek i nieścisłości, jak również bardzo nielicznych błędów natury edytorskiej lub stylistycznej (twarde spacje, przecinki, kropki).

Z obowiązku recenzenta podaję poniżej kilka przykładów takich błędów, niedociągnięć czy nieścisłości:

- Rys. 27 (str. 87) – w opisie osi Y „Chlorofil *a/b*” nie powinno podawać się jednostki (stosunek chlorofilu *a* do *b* niweluje jednostkę); z kolei na Rys. 29 (str. 88) brakuje jednostki przy parametrze QY na osi Y.
- W tabelach 3 i 4 (str. 108-111) dobrze byłoby wyjaśnić, jakie wartości są wyróżnione kolorem czerwonym i zielonym.
- W tekście pojawia się pewna niekonsekwencja używania nazw pierwiastków, czasem są pisane pełną nazwą, a czasem symbolem (dotyczy np. niklu/Ni, kadmu/Cd).
- Zabrakło wyjaśnienia kilku skrótów, np. NRT i AMT (str. 44), HPLC.
- W spisie literatury większość tytułów czasopism jest pisana w formie skróconej, ale pojawiają się też pełne nazwy czasopism; brak kursywy w nazwie łacińskiej gatunku (np. poz. 83); w poz. 128 zabrakło nazwy czasopisma.



Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań czy uwag, na które chciałabym poznać odpowiedzi/opinie Doktorantki:

- Mimo, że cel pracy jest jasno sformułowany, zabrakło mi hipotezy badawczej, która mogłaby być zweryfikowana poprzez przeprowadzone badania. Czy mogłabym prosić o sformułowanie takiej hipotezy/hipotez?
- Na str. 138 pojawiło się stwierdzenie „... w liściach będącej hiperakumulatorem kapusty rzepak ... [Nouairi i wsp., 2006]”, a na stronie 141 „Porównawcze badania reakcji na stres Cd u kapusty rzepak (gatunek wrażliwy) i kapusty sitowatej (hiperakumulator) wykazały.... [Nouairi i wsp., 2006]”. Zachodzi tu sprzeczność informacji dotyczącej hiperakumulatorowych właściwości kapusty rzepak (*Brassica napus*). Chciałabym się dowiedzieć, czy *B. napus* jest rzeczywiście hiperakumulatorem metali (jakich?), na czym polega zjawisko hiperakumulacji, zwłaszcza w odniesieniu do niklu i jakie główne mechanizmy odpowiadają za hiperakumulację tego metalu w roślinach.
- Na str. 141 pojawiło się kolejne zdanie, w które wkradł się błąd: „... wyniki badań przeprowadzonych na wykluczającym i hiperakumulującym gatunku rzodkiewnika pospolitego [Seregin i wsp., 2023]”. Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) nie jest hiperakumulatorem. Czy chodziło Pani o dwa badane w tej pracy gatunki rzodkiewnika o odmiennych właściwościach: *A. lyrata* i *A. halleri*? Który z nich jest hiperakumulatorem, a który „wyklucza” metale? Na czym polega strategia wykluczania metali?
- Ciekawi mnie, jakie dalsze kierunki/perspektywy badań mogą wyłonić się z przeprowadzonych w niniejszej pracy badań i na podstawie uzyskanych wyników.
- Czy przeprowadzone badania / uzyskane wyniki mogą mieć aspekt aplikacyjny?

Podsumowanie i uwagi końcowe

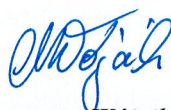
Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka bardzo dobrze wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celu pracy. Wobec niezwykle szerokiego zakresu prezentowanych badań, bardzo wartościowych wyników, które stanowią oryginalne rozwiązanie problemu toksyczności niklu w roślinach, a także rzetelnej dokumentacji, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Witusińskiej.

Na podstawie analizy przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że Doktorantka wykazała się rozległą wiedzą teoretyczną dotyczącą zagadnień związanych z toksycznością metali w roślinach, stresem oksydacyjnym, metabolizmem azotu, profilem lipidów i związków fenolowych, wpisujących się w dyscyplinę nauki biologiczne. Doktorantka opanowała bardzo szeroki warsztat badawczy, przeprowadziła liczne praco- i czasochłonne badania, a także zaprezentowała umiejętność starannej dokumentacji oraz poprawnej interpretacji uzyskanych wyników. Doskonale dobrała i wykorzystała literaturę fachową. Uważam, że jest przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, od etapu planowania badań, poprzez ich przeprowadzenie i opracowanie wyników.



Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). W związku z powyższym, przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Witusińskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą. Praca prezentuje wyróżniający się poziom biorąc pod uwagę bardzo szeroki i kompleksowy zakres wysokiej jakości badań, z zastosowaniem różnorodnych i nowoczesnych metod i narzędzi badawczych. Doktorantka umie łączyć klasyczne i zaawansowane metody badawcze, a uzyskane dzięki nim wyniki, profesjonalnie przedstawione i zinterpretowane, wnoszą nową wiedzę w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.



Dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS

