

dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska
Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

pt.: "Zmiany właściwości owoców buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) zachodzące w trakcie procesu pobudzania"

wykonanej przez **mgr Chrystiana Chomontowskiego**

pod kierunkiem prof. dr hab. Sławomira Podlaskiego na Wydziale Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

1. Uwagi ogólne

Wartość materiału siewnego jest jednym z podstawowych czynników decydujących o efektywności produkcji rolniczej. Jakość nasion zależy od wielu czynników egzogennych wśród, których istotną rolę odgrywają zabiegi uszlachetniania. Pobudzanie nasion prowadzi do przyspieszenia i wyrównania wschodów, co wynika z istoty samego zabiegu związanego z kontrolowaną hydratacją nasion, gwarantującą rozpoczęcie I i II fazy kiełkowania, lecz niewystarczającą do zakończenia kiełkowania *sensu stricto*, czyli pojawienia się korzenia zarodkowego. Zatem, pozytywny wpływ kondycjonowania na kiełkowanie, wschody i wzrost roślin jest wynikiem wcześniejszego zainicjowania i zwiększonej aktywności metabolicznej w nasionach przed ich siewem do gruntu oraz w siewkach w początkowym okresie ich wzrostu.

Przedstawiona do oceny praca doktorska wykonana została z użyciem materiału siewnego buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.), który stanowią botaniczne owoce, nazywane w dalszej części recenzji nasionami buraka cukrowego. Badania te stanowią część projektu finansowanego przez NCBiR, kierowanego przez promotora pracy – prof. dr hab. Sławomira Podlaskiego.

Niewątpliwym atutem recenzowanej pracy jest próba podjęcia analizy efektów procesu pobudzania nasion wykonana na różnym etapie rozwoju ontogenetycznego rośliny. Autor opisał zmiany fizyczne, biochemiczne i molekularne obserwowane w czasie kiełkowania nasion, przeprowadził analizę przebiegu wschodów i wzrostu siewek buraka cukrowego w warunkach kontrolowanych i polowych i opisał efekt końcowy: plon korzeni i technologiczny plon cukru. Dodatkowych informacji dostarcza wykorzystanie w pracy nasion charakteryzujących się zróżnicowanym wigorem (niskim lub wysokim), które pobudzano, stosując dwie technologie: Quick Beet i Quick Beet 1. Recenzowana dysertacja jest

przykładem połączenia badań podstawowych i stosowanych, gdyż podejmując próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów pobudzania nasion opisuje jednocześnie rolniczy efekt stosowania tego zabiegu.

Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że Autor podjął badania w ważnej dziedzinie nauki, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

2. Uwagi formalne

Forma rozprawy doktorskiej mgr Chrystiana Chomontowskiego spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim. Dysertacja liczy 148 stron, opatrzona jest tytułem i streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, co czyni jej tematykę dostępną dla szerszej rzeszy czytelników. Poza zasadniczą treścią zawiera: informację o źródłach finansowania badań, podziękowania, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, a także wykaz tabel, rysunków i fotografii. Główna treść rozprawy została podzielona na osiem rozdziałów: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz spis literatury.

Rozdział "**Przegląd literatury**" (liczący 16 stron) jest teoretycznym wprowadzeniem prezentującym aktualny stan wiedzy na temat budowy nasion buraka cukrowego, zabiegów pobudzania nasion i roli reaktywnych form tlenu (ROS) oraz komórkowego systemu modulującego stężenie ROS w regulacji kiełkowania nasion. Rozdział ten jest napisany jasno i spójnie logicznie, chociaż w moim odczuciu zbyt ogólnie. Ta część pracy jest ilustrowana jedną kolorową ryciną. Większość cytowanych prac pochodzi z ostatnich 15 lat i świadczy o znajomości literatury.

„**Cel pracy**” to kolejny, tym razem bardzo krótki, rozdział rozprawy. Wyróżniono pięć celów szczegółowych podjętych badań polegających na określeniu wpływu procesu pobudzania nasion buraka cukrowego na: 1. fizykochemiczne właściwości owocni, 2. biologiczne właściwości nasion, 3. przebieg procesu kiełkowania w warunkach laboratoryjnych, 4. wschody oraz wzrost i rozwój roślin w warunkach polowych i kontrolowanych w fitotronie, 5. końcowy plon korzeni i technologiczny plon cukru.

Należy podkreślić, że postawione cele zostały zrealizowane, o czym świadczy analiza dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej.

Część „**Materiały i metody**” (15 stron) tradycyjnie zawiera dane na temat materiału roślinnego, warunków doświadczeń oraz zastosowanych testów i metod, które w omawianym przypadku zostały właściwie dobrane i pozwoliły na uzyskanie odpowiedzi na postawione w celu pytania/problemy.

Rozdział „**Wyniki**” obejmuje 65 stron tekstu i zawiera obszerną dokumentację przeprowadzonych doświadczeń prezentowaną w postaci 48 rysunków i 23 Tabel. Wyniki w większości przedstawione są jasno i nie budzą większych wątpliwości.

W rozdziale „**Dyskusja**” (liczącym 8 stron) doktorant omawia otrzymane wyniki na tle badań innych autorów. Ten rozdział został podzielony na podrozdziały odnoszące się do poszczególnych zadań badawczych, co oceniam pozytywnie. Jednak brak odnośników do adekwatnych wykresów lub tabel nie ułatwia zrozumienia i porównania wyników własnych z danymi innych autorów. W rozdziale "Dyskusja" zabrakło też schematów lub tabel zbiorczych podsumowujących w sposób syntetyczny otrzymane wyniki - to pozwoliłoby na podkreślenie i wyróżnienie nowatorskich aspektów dysertacji.

W dysertacji Autor zamieścił także rozdział „**Wnioski**”, który zawiera 5 sformułowanych wniosków wynikających z uzyskanych wyników przeprowadzonych badań.

Rozdział „**Literatura**” (13 stron), obejmuje 140 pozycji, odzwierciedla dobrą znajomość dziedziny badań. Na uwagę zasługuje fakt rzetelnego przygotowania tej części dysertacji, w której jest stosunkowo mało błędów edytorskich. Te które udało mi się zauważyć zostały zaznaczone w dostarczonym manuskrypcie.

3. Uwagi merytoryczne i szczegółowe

Wśród **osiągnięć** Autora omawianej pracy na podkreślenie zasługuje przede wszystkim:

- 1) wykazanie, że proces pobudzania nasion powoduje zmianę właściwości fizycznych owocni, co prowadzi do zwiększenia przepływu wody przez owocnię do nasion w trakcie kiełkowania,
- 2) przeprowadzenie kompleksowej analizy wpływu pobudzania nasion na funkcjonowanie komórkowego enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego,
- 2) wykazanie zmian cyklu komórkowego i zwiększonej aktywności metabolicznej nasion pobudzanych, decydujących o poprawie podstawowych parametrów kiełkowania w warunkach laboratoryjnych,
- 3) wykazanie, że pobudzanie nasion wpływa pozytywnie na zdolność i szybkość wschodów w warunkach polowych i kontrolowanych w fitotronie, a szybsze wschody skutkują intensywnym przyrostem świeżej masy roślin oraz zwiększeniem powierzchni asymilacyjnej liści,
- 4) wykazanie, że poddanie materiału siewnego zabiegom pobudzania w końcowym efekcie przekłada się na zwiększenie technologicznego plonu cukru.

Osiągnięcia te nie tylko pogłębiają znajomość biologii buraka cukrowego, pozwalając na lepsze zrozumienie fizjologii wzrostu i rozwoju roślin tego gatunku, ale stanowią również istotny element prac nad poznaniem molekularnych i biochemicznych podstaw pobudzania nasion.

Recenzowana rozprawa zasługuje na pozytywną ocenę merytoryczną, napisana jest w zasadzie poprawnym językiem. Choć Autorowi nie udało się uniknąć pewnych błędów, niezręczności językowych i potknięć redakcyjnych, które nie wpływają jednak na ogólną pozytywną ocenę wartości

pracy. W dalszej części recenzji poza omówieniem merytorycznej wartości dysertacji wskazałam jej słabsze punkty oraz fragmenty które wymagają wyjaśnienia lub uzupełnienia.

Moim zdaniem we **wstępie literaturowym** zbyt skrótowo opisano stosowane w praktyce zabiegi pobudzania nasion. Tych informacji brakuje tym bardziej, że w rozdziale dyskusja powołując się na dane literaturowe autor nie podaje jakie zabiegi pobudzania stosowano, a w wielu przypadkach ma to istotne znaczenie. W przeglądzie literatury brakuje też wzmianki o otoczkowaniu nasion - tym bardziej że taki materiał siewny stosowany był przez Autora w części doświadczeń polowych. Uważam, że rozdział dotyczący ROS i systemu antyoksydacyjnego powinien poprzedzać rozdział o pobudzaniu nasion. Pozwoliłoby to na uniknięcie w tekście szeregu powtórzeń i generalnie ułatwiło opis funkcjonowania tego systemu w nasionach. Także, rola ROS w regulacji kiełkowania nasion została omówiona bardzo skrótowo, chociaż literatura na ten temat jest bardzo obszerna. Szkoda, że Doktorant nie sięgnął do prac (również przeglądowych) na ten temat, opublikowanych po 2010 roku. W związku z niewystarczającą w moim odczuciu ilością informacji dotyczących samego zabiegu pobudzania nasion prosiłabym o dokładne omówienie stosowanych powszechnie technologii pobudzania nasion.

W tej części dysertacji znajdują się też pewne nieścisłości np. na str. 35 podana jest informacja że Tommasi i in. 2002 wykazali zmiany stężenia GSSG podczas imbibicji nasion sosny, podczas gdy praca została wykonana na nasionach miłorzębu.

Na str. 22 Doktorant opisując właściwości owocni pisze, że zawiera ona wielocukry które mogą zaburzać "wydalanie" CO₂, sadzę że chodziło raczej o wydzielanie CO₂.

Niewłaściwe jest stosowanie wyrażenia "wysokie stężenie hamowało kiełkowanie nasion" (np. str. 23 itd.). To nie stężenie lecz substancja podana w odpowiednim np. wysokim stężeniu wywołuje efekt fizjologiczny.

Nie rozumiem co autor miał na myśli pisząc, że obecność w owocni dużej ilości inhibitorów kiełkowania spowodowała wprowadzenie do hodowli zabiegu uszlachetniania polegającego na płukaniu nasion (str. 23). Proszę o wyjaśnienie, podejrzewam że w tym przypadku nieprawidłowo zastosowano słowo hodowla.

Na str. 28 doktorant pisze o "pamięci pobudzania, która polega m.in. na wywołaniu stresu, który hamuje powstawanie korzenia zarodkowego". Sadzę że autor miał na myśli wzrost (wydłużanie komórek) korzenia, gdyż jako taki korzeń zarodkowy występuje w prawidłowo wykształconych nasionach.

Na wyróżnienie zasługuje natomiast bogate spektrum metod wykorzystanych przez Doktoranta i opisane w rozdziale **Materiały i metody**. Wynika ono z szerokiego spojrzenia na efekty jakie wywołuje pobudzanie nasion. Spojrzenie to wymagało użycia zarówno podstawowych metod z zakresu

biologii molekularnej, biochemii, cytologii jak też badań typowo rolniczych - związanych np. z analizą plonu.

W celu wykonania fizjologiczno-biochemicznej charakterystyki materiału roślinnego autor użył klasycznych metod analitycznych. Zastosował metody spektrofotometryczne oznaczania zawartości związków fenolowych, aktywności enzymów (katalazy, dysmutazy nadadtlenkowej, peroksydazy) regulujących zawartość ROS w komórkach, metodę spektrofluorymetryczną oznaczania H_2O_2 w apopląście. Analizę cyklu komórkowego wykonano metodą cytometrii przepływowej. Ekspresję genów kodujących katalazę, reduktazę glutationową, peroksydazę, dysmutazę nadadtlenkową wykonano metodą qPCR. Parametry wzrostu siewek zostały oznaczone klasycznymi metodami używanymi w fizjologii roślin. Fizyczne właściwości owocni buraka cukrowego badano przy użyciu metody stosowanej w analizie budowy materiałów ceramicznych, co stanowi o nowatorstwie metodycznym dysertacji. Zawartość cukru w korzeniach buraka została oznaczona w laboratoriach Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego, jednak z rozdziału Materiały i Metody nie wynika, czy doktorant uczestniczył w oznaczeniach, czy otrzymał dane na podstawie których dokonał stosownej analizy.

Opisy metodyczne są w większości wystarczająco szczegółowe, za wyjątkiem opisu oznaczenia ekspresji genów. W tym miejscu brakuje informacji jakie dokładnie geny analizowano i jakie były sekwencje starterów do reakcji RT-qPCR wraz z podaniem ich charakterystyki. Nie podano też danych dotyczących programu termicznego reakcji RT-qPCR. W wynikach nie ma informacji o stabilności ekspresji wybranego genu referencyjnego.

Pragnę też zwrócić uwagę, że oznaczano zawartość H_2O_2 w apopląście, a nie zawartość "apoplastowego" H_2O_2 i warto byłoby podać odnośnik literaturowy dotyczący stosowanej metody.

W opisie oznaczenia zawartości białka wkraśl się błąd, gdyż wynika z niego, że krzywą wzorcową wykonano dla objętości końcowej próby wynoszącej 2 ml, natomiast próby badane miały objętość 1 ml.

Z kolei na str. 47 podano, że molowy współczynnik absorpcji ϵ wynoszący $39,40 M^{-1} cm^{-1}$, odnosi się do katalazy, podczas gdy odnosi się on do H_2O_2 i podobnie współczynnik o wartości $26,6 mM^{-1} cm^{-1}$, odnosi się do tetragwajakolu, a nie do POx, (ponadto, jeśli jako substrat stosowano pyrogalol to powinien być stosowany współczynnik dla purpulo galiny równy $2,47 mM^{-1} cm^{-1}$).

Rozdział **Wyniki** zawiera wykresy i tabele prezentujące uzyskane dane, ich opis, a także krótkie podsumowanie. Ułatwia to zrozumienie prezentowanych wyników, chociaż w niektórych przypadkach podsumowania powinny raczej znaleźć się w rozdziale dyskusja. Wykresy są przejrzyste i dobrze skonstruowane, chociaż na rysunkach od 2 do 9 dwukrotnie umieszczono jednostkę w której określano czas kiełkowania (h). Tabela posiada tytuł, po którym nie umieszcza się znaku kropki (ta uwaga dotyczy całej pracy, także tabel w części "Materiały i Metody".

Na str. 64 w podsumowaniu doktorant pisze, że pobudzanie nasion powoduje wymywanie z owocni nieorganicznych związków mineralnych uważanych za inhibitory - ale to stwierdzenie nie wynika z prezentowanych danych (Tabela 4), które sugerują raczej, że niski wigor sprzyja zwiększeniu elektroprzewodnictwa ekstraktów z owoców, natomiast samo pobudzanie nie ma na ten parametr wpływu. Na kolejnej stronie (65) autor dysertacji stwierdza, że wigor nasion miał wpływ na udział odpadniętych wieczek, nie wiem skąd taki wniosek bo w Tabeli 5, dla nasion niepobudzanych o niskim jak i wysokim wigorze podano zerową ilość odpadniętych wieczek. Owszem, po pobudzaniu nasiona o wysokim wigorze miały więcej odpadniętych wieczek niż nasiona o wigorze niskim, ale nie wiadomo, czy wynika to z pobudzania czy jest związane z wigorem.

Na str. 66 autor powinien używać sformułowania "oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych", a nie "zawartości całkowitych związków fenolowych", podobna uwaga dotyczy oznaczenia całkowitej aktywności peroksydaz, a nie jak napisano w dysertacji aktywności całkowitych peroksydaz (str. 76).

Zawartość H_2O_2 w apoplacie oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych oznaczano w nasionach, które nie były poddane imbibicji, nazwano je "suche". Uważam, że użycie tego sformułowania nie jest to do końca poprawne, gdyż w czasie przygotowania do oznaczeń materiał doświadczalny ulegał uwodnieniu np. do oznaczeń H_2O_2 prowadzono 15 min preinkubację nasion w buforze K-fosforanowym.

W rozdziale dotyczącym lokalizacji $O_2^{\cdot-}$ w tekście podano nieprawidłową numerację fotografii. Proszę też o wytłumaczenie dlaczego fotografie obrazujące lokalizację $O_2^{\cdot-}$ po 48 i 72 h kiełkowania są niebieskie, a po 24 h białe. Ponadto, na zdjęciach brak podziałki. Jest to prosta obserwacja i można było powtórzyć barwienia, tak aby można było porównywać otrzymane wyniki, zresztą w takiej jakości jak są prezentowane zdjęcia nie będą mogły być użyte do ewentualnej publikacji.

Na str. 72 Doktorant pisze, że w nasionach poddanych pobudzaniu w czasie kiełkowania obserwuje się większą zawartość białka rozpuszczalnego niż w nasionach niepobudzanych - nie do końca zgadzam się z takim stwierdzeniem patrząc na przedstawione dane (rys. 15-18). Trudno zresztą o uogólnienie, bo dane z poszczególnych lat bardzo się różnią.

Wyniki, szczególnie oznaczeń biochemicznych (aktywności enzymatyczne) uzyskane w poszczególnych latach bardzo się różnią, tak że w niektórych przypadkach trudno mówić nawet o kierunku zmian wywoływanych przez pobudzanie nasion. Ten aspekt nie został wystarczająco wyjaśniony w dyskusji, prosiłabym o ustosunkowanie się do tej uwagi.

W przypadku części wyników biochemicznych nie pokazano opracowania statystycznego, natomiast analiza przebiegu kiełkowania nasion i wzrostu roślin w laboratorium, fitotronie i w warunkach polowych została przedstawiona i opisana bardzo szczegółowo, także z opracowaniem statystycznym.

W pracy nie znalazłam wyjaśnienia dlaczego część doświadczeń wykonano stosując nasiona otoczkowane. Proszę o ustosunkowanie się do tej uwagi

W odniesieniu do rozdziału **Dyskusja**, który jest stosunkowo zwięzły i nie obejmuje wszystkich wykonanych analiz nasunęły mi się dwa główne pytania:

1) Dlaczego nie przedyskutowano wyników dotyczących ekspresji genów kodujących enzymy systemu antyoksydacyjnego w kontekście oznaczonych aktywności enzymatycznych. Prosiłabym o skomentowanie tych wyników.

2). Jaki był powód oznaczenia ekspresji genu kodującego reduktazę glutationową, jeśli nie oznaczono aktywności tego enzymu?

W całej pracy Autor niepotrzebnie używa określenia "poziom wigoru" (np. str. 25), "poziom aktywności enzymu" wystarczyło napisać wigor, lub aktywność enzymu. Autor wprowadza też skrót, które potem w tekście pracy stosuje w ograniczonym zakresie. Dotyczy to przede wszystkim ROS (nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy), które w tekście pojawiają się albo w formie symbolu albo całej nazwy, mimo że powinny pojawiać się jako symbol.

Inne niezręczności językowe oraz drobne błędy edytorskie i interpunkcyjne zaznaczono w tekście dostarczonej pracy doktorskiej.

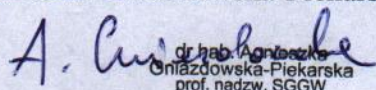
4. Wniosek końcowy

Dobrze oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską. Uważam, że jest ona opracowaniem naukowym, które wnosi wiadomości pozwalające lepiej poznać skomplikowany mechanizm pobudzania nasion, a także praktyczny efekt końcowy stosowania tego zabiegu. Część eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i wykonana odpowiednio metodycznie. Godna uznania jest różnorodność przeprowadzonych analiz. Postawione przez Doktoranta cele badawcze zostały w całości zrealizowane.

Uwagi krytyczne nie umniejszają znaczenia rozprawy doktorskiej mgr Chrystiana Chomontowskiego, należy je traktować jako podstawę do dyskusji oraz wyraz troski o lepszą formę opracowania wyników do przyszłych publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „Zmiany właściwości owoców buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) zachodzące w trakcie procesu pobudzania” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2004 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. 2003r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), w związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie jej Autora **mgr Chrystiana Chomontowskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska


dr hab. Agnieszka
Gniazdowska-Piekarska
prof. nadzw. SGGW