



Łódź, 30 V 2019 r.

**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Prof. dr hab. Małgorzata M. Posmyk

Katedra Ekofizjologii Roślin

tel. +48 42 635 44 22

e-mail: malgorzata.posmyk@biol.uni.lodz.pl

RECENZJA
rozprawy doktorskiej

pt. „Mechanizm fitotoksycznego oddziaływania *m*-tyrozyny na wzrost korzeni siewek pomidora”

wykonanej przez mgr inż. Joannę Olechowicz

pod kierunkiem Prof. dr hab. Renaty Bogatek-Leszczyńskiej.

w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolnictwa i Biologii,

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

1. Uwagi ogólne

Intensywne rolnictwo pociągnęło za sobą nadmierną chemizację, czego skutkiem jest zanieczyszczenie środowiska syntetycznymi, trudno- lub nie- biodegradowalnymi substancjami. Obecnie obserwuje się pozytywny zwrot w kierunku poszukiwania alternatywnych metod ekologicznej uprawy i ochrony roślin. Identyfikuje się naturalne substancje - biostymulatory, które mają na celu zwiększenie potencjału rozwojowego odmiany hodowlanej, a także podejmuje się próby stosowania naturalnych negatywnie działających związków allelopatycznych zamiast syntetycznych herbicydów.

Oceniana dysertacja doktorska wpisuje się w nurt badań związanych ze zjawiskiem allelopatii.

Zastosowanie roślin o wysokim potencjale allelopatycznym lub otrzymanych z nich związków - allelopatin - jako alternatywnych środków ochrony roślin jest podstawą szeregu programów zrównoważonego rozwoju rolnictwa i zintegrowanej produkcji. W związku z powyższym, zagadnienie oddziaływań allelopatycznych pomiędzy roślinami stało się ostatnio przedmiotem intensywnych badań wielu pracowni biochemii i fizjologii roślin. Prace te dotyczą głównie interakcji związków allelopatyczny kontra chwast, znacznie rzadziej bada się efekty toksycznych allelopatin wobec roślin uprawnych. Natomiast wyjaśnienie mechanizmów ich działania na poziomie fizjologicznym, strukturalnym, biochemicznym i molekularnym będzie nie tylko ważnym etapem poznania fenomenu allelopatii, ale także stworzy możliwość poszukiwania metod zwiększenia odporności roślin uprawnych na związki allelopatyczne, co być może ukierunkowałoby ich efektywność jedynie na chwasty.

Przedłożona do recenzji praca doktorska obejmuje badania efektów działania *meta*-tyrozyny (*m*-Tyr) - związku allelopatycznego zidentyfikowanego m.in. u kostrzewy (*Festuca rubra* L.) - na wzrost korzeni siewek pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.). Autorka podjęła próbę wyjaśnienia mechanizmów działania *m*-Tyr na poziomach: fizjologicznym, strukturalnym, biochemicznym i molekularnym. Biorąc zatem powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.

2. Uwagi formalne

Forma rozprawy spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim. Praca liczy 163 strony formatu A4. Opatrzona jest tytułem i streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, co czyni temat rozprawy dostępnym także dla szerszej rzeszy czytelników. Poza zasadniczą treścią zawiera: stosowne oświadczenia, podziękowania, spis treści oraz spisy rysunków i tabel, wykaz stosowanych skrótów, a także zgodę autorki na udostępnianie pracy.

Zasadnicza treść została podzielona na siedem rozdziałów: wstęp - stanowiący przegląd literatury w temacie, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski, oraz bibliografię.

Wstęp jest teoretycznym wprowadzeniem prezentującym uwarunkowania historyczne oraz aktualny stan wiedzy na temat allelopatii. Autorka podaje definicje, wymienia typy allelopatii, wskazuje związki o charakterze allelopatycznym, omawia mechanizmy uwalniania allelopatin do środowiska i ich wpływ na rośliny oraz ekosystem. Wszystko to związane jest i warunkuje potencjał praktycznego wykorzystania allelopatii, o czym również traktuje jeden z podrozdziałów wstępu. Następnie Autorka scharakteryzowała *meta*-tyrozynę - badany allelozwiązek kostrzewy - uwzględniając jej właściwości chemiczne, lokalizację, biosyntezę i szlaki degradacji w środowisku. Kolejne podrozdziały wstępu są ściśle związane z przeprowadzonymi badaniami, a więc traktują o: stresie oksydacyjnym, reaktywnych formach tlenu (RFT), ich funkcjach i regulacji ich poziomu w tkankach roślin, a także regulacji wzrostu przez RFT oraz fitohormony (auksyny i etylen). Bardzo interesująca jest część przeglądu poświęcona ekspansynom - białkom warunkującym rozluźnianie i wydłużanie ścian komórkowych. Autorka opisała ich rodzaje i budowę. Wykazała się wiedzą na temat struktury kodujących je genów oraz hormonalnej regulacji ekspresji genetycznej.

Wstęp jest napisany jasno i spójnie logicznie. Donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianym zakresie. Większość cytowanych prac pochodzi z ostatnich lat i świadczy o dobrej znajomości literatury. Mam jednak jedną uwagę - przyczynek do dyskusji - oraz pytanie dotyczące tej części.

Zapewne fakt, że przedmiotem badań był związek allelopatyczny ograniczający wzrost roślin spowodował, że Autorka dość swobodnie stosowała zamiennie terminy allelozwiązek (-ki) z fitotoksyna (-y). Nie jest to ściśle biorąc pod uwagę definicje allelopatii przytoczone na stronach 24-25, w których mówi się o potencjalnie pozytywnym albo negatywnym biochemicznym oddziaływaniu - więc nie każdy allelozwiązek jest toksyną. Dyskusyjne jest również zdanie: „*Fitotoksyny w zależności od charakteru oddziaływań mogą być zaliczane do stymulatorów bądź inhibitorów procesów zachodzących w organizmie roślinnym (niskie stężenie allelozwiązku przeważnie stymuluje wzrost rośliny, natomiast wysokie hamuje przebieg niektórych procesów) (Gomes i inni 2017)*”(str. 26).

Ponadto na str. 36 czytamy: „*Działanie syntetycznych herbicydów w dużej mierze polega na zakłóceniu przebiegu podstawowych procesów życiowych roślin, tj.: fotosynteza, oddychanie, podziały komórkowe. W sprzedaży dostępne są również preparaty, których mechanizm działania zbliżony jest do naturalnej auksyny (AUX) (Gniazdowska 2007).*” - proszę wyjaśnić związek tych zdań, jeśli istnieje (?).

W rozdziale **cel pracy** krótko wskazano potrzebę wyjaśniania mechanizmu działania *m*-Tyr. Zaproponowano dwuliściennego pomidora, jako uprawną roślinę modelową do badań. Przyjęto hipotezę, że fitotoksyczne działanie *m*-Tyr na wzrost korzeni pomidora może dotyczyć następujących aspektów: (I) jej wpływu na status red-ox w tkankach, (II) zaburzeń w bilansie hormonalnym, w szczególności między auksynami i etylenem oraz w efekcie (III) modyfikacji elastyczności ścian komórkowych za którą odpowiadają głównie ekspansyny oraz RFT. Autorka wskazała także jakimi technikami badawczymi realizowała poszczególne etapy badań, a zaplanowała eksperymenty na wszystkich poziomach organizacji, a więc o charakterze fizjologicznym, biochemicznym, oraz molekularnym.

Część **materiały i metody** tradycyjnie zawiera dane na temat materiału roślinnego, warunków i schematu doświadczeń oraz zastosowanych testów i metod, które w omawianym przypadku zostały właściwie dobrane i umożliwiły analizę postawionych zadań/problemów. W pracy odnajdujemy opisy doświadczeń fizjologicznych (kietkowanie nasion, wzrost siewek, pomiary ich świeżej i suchej masy, obserwacje grawitropizmu korzeni w hodowli *in vitro*, test integralności błon, pomiar intensywności oddychania), szeroką gamę biochemicznych

testów obrazujących status red-ox w tkankach (detekcja różnych RFT oraz oznaczenia aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych: SOD, CAT, POX), metody oznaczania hormonów roślinnych (immunoenzymatyczną ELISA zawartości IAA i chromatograficzną HPGC emisji etylenu), oraz opis molekularnej analizy transkrypcji wybranych genów kodujących ekspansyny i Rboh, metodą półilościowego RT-PCR. Opisy metodyczne są szczegółowe i w znakomitej większości pozwalają na stosunkowo łatwe powtórzenie doświadczeń bez sięgania do wyjściowej literatury - co jest dużą zaletą i stanowi o wartości dysertacji jako materiału źródłowego.

Niestety, pewien „bałagan” zauważyłam w rozdziałach 3.2 i 3.3 (str. 71). W opisie testów kiełkowania (3.2) nie podano liczby nasion objętych badaniem. Natomiast przy opisie pomiaru długości siewek (3.3) oprócz braku ich liczby, nie ma też informacji o zastosowanych w badaniu stężeniach *m-Tyr*, a ponadto, to w tym rozdziale powinien znaleźć się fragment informujący, iż „do dalszych analiz wytypowano dwa roztwory *m-Tyr*: 0,05 i 0,25 mM, gdyż hamowały wzrost korzeni siewek pomidora odpowiednio o 50 i 100% w stosunku do kontroli” (patrz wyniki str. 91) Omyłkowo fragment ten wklejono do rozdziału 3.2 o kiełkowaniu. Ponadto, proszę o wyjaśnienie, skąd wiadomo, że (cytując kontynuację rzeczzonego fragmentu) „roztwór o wyższym stężeniu nie powodował uszkodzeń letalnych” (str. 71) - skoro wyższych stężeń nie stosowano, a ponadto jeśli 0,25 mM *m-Tyr* hamowała wzrost korzeni w 100%, to wyższa jej dawka prawdopodobnie właśnie powinna powodować silniejsze uszkodzenia.

Moją wątpliwość wzbudził także nieprecyzyjny opis metody oznaczania IAA (ELISA). Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie pryncypiów tej metody, a także doprecyzowanie jakie przeciwciała były stosowane, co było znacznikiem w teście i dlaczego w oznaczeniu stosowano roztwory: „prób/standardów IAA/metylowanego IAA” (str. 78-79)?

Co prawda, liczba powtórzeń/prób statystycznych ($n \geq 9$) w jakiej zostały wykonane badania oraz zastosowane analizy upoważniają Autorkę rozprawy do wyciągania jednoznacznych wniosków, to jednak sugerowałabym w przyszłych publikacjach stosowanie metody analizy wariancji (odpowiednio, jedno- lub wieloczynnikowej) i następnie testów *post hoc* umożliwiających porównanie istotności różnic między wszystkimi danymi względem siebie, a nie tylko w stosunku do jednej kontroli.

W rozdziale ‘wyniki’ zawarta jest dokumentacja prowadzonych doświadczeń w postaci 26 wykresów (w tym 8 uzupełnionych fotogramami rozdziałów elektroforetycznych produktów amplifikacji transkryptu badanego genu), 1 tabeli i 3 tablic ze zdjęciami. Udokumentowano wszystkie zaplanowane i przeprowadzone testy fizjologiczne, analizy biochemiczne oraz analizy transkrypcji genetycznej RT-PCR, wybranych genów ekspansyn i Rboh.

Wśród osiągnięć Autorki na podkreślenie zasługuje **wyjaśnienie przyczyn zahamowania wzrostu korzeni** po działaniu *m-Tyr* na siewki pomidora. Doktorantka stwierdziła m.in. że: (I) *m-Tyr* jest allelotoksyną prooksydacyjną, prowadzącą do nadmiernej akumulacji RFT (H_2O_2 oraz O_2^-), (II) wygenerowany allelopatyną stres oksydacyjny aktywuje system enzymów AOX - głównie CAT i POX, (III) jednak dla utrzymania funkcji sygnałnej ROS zmianom ulega także ekspresja genów kodujących Rboh (\uparrow), (IV) rozchwianie równowagi red-ox skutkuje prawdopodobnie zmianą struktury ścian komórkowych, o czym świadczą też zmiany w ekspresji genów kodujących EXP.

Osiągnięcia te nie tylko pogłębiają znajomość biologii badanej rośliny użytkowej, pozwalając na lepsze zrozumienie fizjologii kiełkowania i rozwoju młodej siewki, ale stanowią również istotny, nowatorski element prac nad poznaniem mechanizmów reakcji roślin na obecność wybranego związku allelopatycznego - *m-Tyr*.

W rozdziale ‘dyskusja’ (liczącym 18 stron) Doktorantka omawia otrzymane wyniki na tle badań innych autorów. Uważam, że ten rozdział jest dobrze napisany, dyskusja jest zajmująca i stanowi mocny filar ocenianej pracy. Autorka uwzględnia liczne aktualne prace, jak i opracowania starsze, które są jednak ‘klasyką’ dla badań allelopatii. W krótkim, półtora-stronicowym rozdziale ‘podsumowanie i wnioski’, Autorka zawarła/wypunktowała swoje najistotniejsze obserwacje i spostrzeżenia.

Bardzo obszerna **bibliografia**, obejmująca 304 pozycje, odzwierciedla szerokie zapoznanie się Doktorantki z eksplorowaną dziedziną badań. Ponad 1/3 cytowanych prac, to publikacje z ostatniego dziesięciolecia.

3. Uwagi szczegółowe

Recenzowana rozprawa zasługuje na dobrą ocenę pod względem merytorycznym, napisana jest w zasadzie poprawnym językiem z przejrzystą dokumentacją. Jednakże Autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów, niezręczności językowych i drobnych potknięć redakcyjnych. Przytaczam je poniżej tytułem przykładu i z obowiązku recenzenta.

Niepotrzebnie stosowano różne skróty jednej nazwy np: C i Cys, F i Phe, S i Ser, W i Trp.

Ten sam skrót SOD wykorzystano/tłumaczono w różny sposób (str. 16 i 17).

Skrót AUX / IAA powinien zostać rozdzielony na AUX - naturalna auksyna i IAA - kw. Indolilo-3-octowy (str.15).

W tekście stosowane są jednostki ml i dm³ - a powinny być ujednolicone: ml i L albo cm³ i dm³.

Wirowanie podawano w rpm a lepiej byłoby w g.

Str. 30 - jest „...koniugacja polegająca na przyłączeniu innego związku, np. węglowodoru w procesie glikozylacji” - glikozylacja to przyłączanie węglowodanów (cukrów).

Str. 35 - jest „jednostronny” - powinno być: jednostajnym.

Str. 35 - jest „...uznawanego za wrażliwy po zastosowaniu letalnej dawki herbicydu” - powinno być: ...uznawanego za wrażliwy względem letalnej dawki herbicydu.

Str. 39 - jest „...reoksydację (ponowne utlenianie) plastochinonu A” - precyzyjniej byłoby plastochinolu A.

Str. 43 - jest „... pod względem chemicznym stanowi aminokwas niebiałkowy ...” - lepiej byłoby: jest aminokwasem niebiałkowym.

Str. 46 - drugie zdanie mówi: „Nagromadzenie allelozwiązku w tkankach ssaków stanowi wskaźnik stresu oksydacyjnego, jest również jest miarą zaawansowania procesu starzenia się komórek” - jeśli syntetyzują go ssaki to nie jest to w tym aspekcie allelozwiązek.

Str. 53 - Tabela 1.2. nie ma cytacji w tekście.

Str. 56 - Peroksydaza gwajakolowa [E.C. 1.11.1.7] - ta nazwa czasem jeszcze funkcjonuje (niestety) lecz *de facto* nie ma takiej peroksydazy u roślin. Test z gwajakolem, pirokatecholem lub pirogallolem jako substratami określa aktywność peroksydaz niespecyficznych, które mogą reagować z różnymi donorami polifenolowymi. Poprawnie zostało to ujęte w metodyce na str. 77-78.

Str. 61 - jest „paków” - powinno być: pąków.

Str. 66 - po pierwszym zdaniu powinna być podana literatura, w istniejącym układzie nie wiadomo kto analizował... Autorka?

Str 71 (i wielokrotnie później) - oznaczenie zerowego dnia powinno być pisane bez kropki po liczbie zero.

Str. 73 - jest „...przenoszono na wodę destylowaną...” - powinno być: do wody destylowanej.

Str. 74 - jest „Długość korzeni siewek pomidora oznaczono...” - powinno być: mierzono.

Str. 78 - przy oznaczeniu IAA nie zbierano „ekstraktu enzymatycznego” tylko ekstrakt bądź izolat IAA.

Str. 79 - nie „poprzez odpipetowanie do studzienek” tylko: dodanie do studzienek.

Str. 87 - jest „przybarwień” zamiast przebarwień.

Str. 105 - zwrot „w wyniku krótkotrwałej kultury” to nieprecyzyjny skrót myślowy.

Str. 109 - w pierwszym zdaniu brakuje informacji nt. transkrypcji czego ? (*LeEXPA2*).

4. Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Uważam, że jest ona dobrym opracowaniem naukowym oraz wnosi nowe odkrycia pozwalające lepiej poznać skomplikowany mechanizm zjawiska allelopatii. Część eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i metodycznie odpowiednio wykonana. Godna podkreślenia jest różnorodność przeprowadzonych testów i analiz, bogaty warsztat metodyczny, szczególnie zastosowanie nowoczesnych metod immunochemicznych i molekularnych podczas realizacji zadań badawczych. Postawione przez Doktorantkę cele zostały zrealizowane.

Pomimo pewnych uwag krytycznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, niniejszym stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. **„Mechanizm fitotoksycznego oddziaływania *m*-tyrozyny na wzrost korzeni siewek pomidora”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i określone w stosownych przepisach ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym, **wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie jej Autorki - mgr Joanny Olechowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



.....
Prof. dr hab. Małgorzata M. Posmyk