



Prof. dr hab. Iwona Ciereszko

Białystok, 30.11.2023 r.

Pracownia Fizjologii Roślin

Katedra Biologii i Ekologii Roślin

Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

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

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry M. Witusińskiej, doktorantki Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej prowadzonych przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Gajewskiej, prof. UŁ w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin UŁ. Praca ta jest kontynuacją tematyki naukowej realizowanej w latach wcześniejszych przez Panią Promotor. Doktorantka, wykorzystując różnorodne techniki badawcze, przeprowadziła analizy zmian procesów wzrostowych i metabolicznych w liściach i korzeniach siewek ogórka, po podaniu chlorku niklu do pożywki w kulturach roślin. Doktorantka starała się wyjaśnić mechanizm toksycznego działania Ni na siewki ogórka, gatunku charakteryzującego się niską tolerancją na ten metal, a zwłaszcza funkcje składników systemu antyoksydacyjnego oraz gospodarki azotowej roślin doświadczalnych w odpowiedzi na zastosowany czynnik stresowy.

Rozprawa doktorska mgr A. Witusińskiej ma układ typowy dla pracy eksperymentalnej, obejmuje 183 strony wydruku, zawiera rozdziały: Wstęp (38 stron), Cel pracy (jedna strona), Materiał i metody (25 stron), Wyniki (47 stron), Dyskusja (31 stron) i Wnioski (jedna strona), a także Spis stosowanych skrótów (3,5 strony). Rozprawa doktorska jest starannym opracowaniem napisanym w języku polskim, zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy umieszczono spis 287 pozycji cytowanego piśmiennictwa (w większości angielskojęzyczne prace oryginalne).

Wstęp rozprawy doktorskiej jest dobrze opracowanym rozdziałem, który został podzielony na trzy główne części tematyczne, z których każda posiada szereg podrozdziałów. Doktorantka scharakteryzowała, w pierwszej kolejności, procesy związane z pobieraniem i transportem niklu, opisała zarówno korzystny, jak i toksyczny wpływ niklu na rośliny, przeanalizowała także

oddziaływania niklu na wzrost, morfologię roślin, na gospodarkę mineralną oraz procesy metaboliczne (fotosyntezę). W kolejnej części przedstawiła definicję stresu oksydacyjnego, opisała reaktywne formy tlenu (RFT) i miejsca ich generowania w komórkach roślinnych, a także zaprezentowała negatywne skutki nadmiaru RFT w postaci możliwych uszkodzeń lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Doktorantka szczegółowo omówiła składniki systemu antyoksydacyjnego roślin: enzymatycznego (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa, peroksydazy klasy III i peroksydaza glutationowa) oraz nieenzymatycznego (askorbinian, glutation, tokoferole, karotenoidy, związki fenolowe). Ostatnia część Wstępu to prezentacja aspektów związanych z gospodarką azotową roślin i charakterystyka enzymów: reduktazy azotanowej i azotynowej, następnie enzymów cyklu GS-GOGAT (syntetazy glutaminowej i glutaminianowej) a także dehydrogenazy glutaminianowej, syntetazy asparaginowej i aminotransferaz (alaninowej i asparaginianowej). Uważam, że zaprezentowane we Wstępie informacje dobrze wprowadzają w tematykę naukowych zainteresowań Doktorantki. Omawiane treści zostały zobrazowane schematami - rozdział zawiera siedem przydatnych rycin (nie ma natomiast tabel). Generalnie nie mam wielu uwag krytycznych do tego rozdziału pracy doktorskiej. Nasuwa się tylko sugestia, iż powinno się podać więcej danych o transporcie Ni przez błony komórkowe, w tym: jakie transportery błonowe są zaangażowane w przemieszczanie i czy są specyficzne względem Ni, co wiadomo o ich strukturze i ekspresji. Ponadto należałoby szerzej omówić procesy transportu jonów azotowych, niestety, wprowadzenie do ostatniej części Wstępu dotyczącej gospodarki azotowej pozostawia pewien niedosyt (str. 44). Uważam, że warto cytować prace przeglądowe polskich grup badawczych na ten temat, zwłaszcza opublikowane w ostatnich latach, np. w czasopiśmie Kosmos 2010 (59, 1/2:211), 2016 (65, 3:414), 2017 (66, 2:185), czy Edukacji Biologicznej i Środowiskowej 2018 (2:19). Stwierdzam jednak, iż rozdział Wstęp ocenianej rozprawy doktorskiej jest interesujący, dobrze napisany, trafnie uwzględnia najważniejsze dane i zawiera zasób informacji wystarczający do dalszego śledzenia wyników pracy i ich interpretacji. Zwraca uwagę znajomość specjalistycznej literatury z tematyki związanej z pracą doktorską, ponadto wiele cytowanych prac opublikowano w ciągu ostatnich kilku lat. Rozdział Wstęp został poprzedzony obszernym spisem stosowanych skrótów (ułatwiających podążanie za podawanymi informacjami), podano także źródła finansowania badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Cele recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały sprecyzowane i określone jako: i) poznanie mechanizmów fitotoksycznego działania niklu na wzrost i funkcjonowanie siewek ogórka (m.in. na generowanie reaktywnych form tlenu i aktywność systemów antyoksydacyjnych, profil fosfolipidów i związków fenolowych, metabolizm azotowy); ii) określenie wpływu Ni na badane parametry w różnych organach roślinnych, w zależności od stadium rozwojowego, a także czasu traktowania Ni.

Analizując rozprawę i uzyskane wyniki badań, można stwierdzić, że postawione cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

Rozdział przedstawiający materiał doświadczalny i metodykę został podzielony na 18 podrozdziałów opisujących: materiał roślinny, analizy wzrostowe, fizjologiczne, biochemiczne, instrumentalne, zawierają one szczegółowe informacje o zastosowanych metodach. W badaniach wykorzystano siewki ogórka (*Cucumis sativus* L.) odmiany Cezar rosnące trzy tygodnie w kulturach hydroponicznych, na pożywce kontrolnej lub z dodatkiem chlorku niklu (10 μ M), w warunkach kontrolowanych w pomieszczeniu fitotronowym. Doktorantka przeprowadziła badania zarówno z użyciem nieuszkodzonych roślin, suszonych próbek, jak homogenatów z liści oraz korzeni. Doktorantka wykonała analizy parametrów wzrostowych, pomiary konduktometryczne, fluorymetryczne, barwienia histochemiczne, szereg oznaczeń spektrofotometrycznych, zastosowała spektrometrię absorpcji atomowej, ponadto wykorzystwała techniki chromatograficzne i spektrometrii mas: HPLC, HPLC-MS oraz LC-MS, a także analizy RT-qPCR. Doktorantka, między innymi, oznaczyła spektrofotometrycznie 15 aktywności białek enzymatycznych w różnych ekstraktach: ośmiu enzymów zaliczanych do systemu antyoksydacyjnego, w tym dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy i peroksydazy oraz siedmiu enzymów związanych z metabolizmem azotu: reduktazy azotanowej (NR), reduktazy azotynowej (NiR), syntetazy glutaminowej (GS), dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), syntazy glutaminianowej (GOGAT), aminotransferazy alaninowej (AlaAT) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AspAT). Doktorantka szczegółowo opisała metody oznaczeń, co wskazuje na samodzielne przeprowadzenie doświadczeń. Przeprowadziła i opisała także oznaczenia ilości jonów azotanowych (NO_3^-) oraz jonów amonowych (NH_4^+) a także zawartości glutaminianu. Doktorantka dokonała ponadto analiz profilu ekspresji genów dla białek enzymatycznych związanych z metabolizmem azotowym (NR, NiR, GS, GOGAT i GDH) i opisała szczegółowo kolejne etapy: izolację RNA, pomiar stężenia i ocenę czystości RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji oraz warunki RT-qPCR. Zastosowany w pracy doktorskiej układ eksperymentalny, metody badań i materiał roślinny zostały odpowiednio opisane i dobrane do realizacji założonych celów i nie budzą moich zastrzeżeń. Należy podkreślić, iż szeroki zakres użytych metod i różnorodnych technik badawczych jest atutem ocenianej rozprawy doktorskiej. Nasuwają się jednak pewne uwagi do tego rozdziału: brakuje danych o producencie/nazwie „zestawu komercyjnego” do oznaczeń (str. 70, 71), nie podano nazwy firmowej skanera (str. 52, 55), wirówki (np. str. 53, 56, 58, 63), brakuje nazwy fabrycznej spektrofotometru (str. 61-63) czy kolorymetru (str. 68, 72), nie przedstawiono także listy starterów (RT-PCR, str. 75). Uważam, że należałoby uwzględnić opis wstępnych badań, np. dotyczących testowania stężeń związków niklu. Brakuje informacji o stosowanych roślinach doświadczalnych, np. pochodzenia nasion, kryteriów wyboru odmiany (Cezar),

czy testowano inne odmiany (może np. wykazują inną wrażliwość na Ni), nie podano jakich używano pojemników wzrostowych (ile siewek rośło w pojemniku), jak często wymieniano płynną pożywkę, w jaki sposób była ona przewietrzana (str. 51). Przegląd omawianego rozdziału, łącznie z wynikami prezentowanymi w następnej części rozprawy doktorskiej, pozwala jednak stwierdzić, że mgr Aleksandra M. Witusińska dobrze opanowała i zastosowała aktualne metody badawcze biologii eksperymentalnej roślin w pracy własnej.

Rozdział opisujący wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej został podzielony na 14 podrozdziałów. Rozdział Wyniki zawiera łącznie 70 rycin i trzy obszerne tabele; prezentowane wykresy są czytelne i możliwe do porównania. Doktorantka przedstawiła zawartości niklu, magnezu, żelaza, manganu, potasu i sodu w badanym materiale, dane dotyczące wpływu Ni na procesy wzrostowe siewek ogórka i parametry związane z fotosyntezą (barwniki i wydajność fotosyntetyczną), a także z przepuszczalnością błon plazmatycznych. Doktorantka przeprowadziła analizę poziomu stresu oksydacyjnego po traktowaniu Ni - zaprezentowała efekty histochemicznej detekcji nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego, a także peroksydacji lipidów (zawartość aldehydu malonowego, MDA). W kolejnym etapie scharakteryzowała klasy fosfolipidów (w większości fosfatydylocholiny, PC) oraz stopień nienasylenia fosfolipidów. Przedstawiła wyniki ekstrakcji i analiz oksylipin (wczesnych produktów peroksydacji) oraz aktywności antyoksydantów enzymatycznych po traktowaniu Ni: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy askorbinianowej (APX), peroksydazy glutationowej (GSH-Px) i peroksydaz klasy III (GPOX, SPOX). Ponadto oznaczyła aktywność S-transferazy glutationowej (GST) i amoniakolizy L-fenylalaniny (PAL) oraz przedstawiła szczegółowy profil związków fenolowych. Doktorantka w następnej części zaprezentowała wyniki analiz oddziaływania Ni na aktywności enzymów uczestniczących w gospodarce azotowej roślin: reduktazy azotanowej i azotynowej, syntetazy glutaminowej i syntazy glutaminianowej (cykl GS-GOGAT), a także dehydrogenazy glutaminianowej i dwóch aminotransferaz oraz zawartości jonów azotanowych, amonowych i kwasu glutaminowego w liściach i korzeniu ogórka. Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Ostatnia rycina w rozdziale Wyniki dotyczy ekspresji genów kodujących białka enzymatyczne, kluczowe dla gospodarki azotowej (NR, NiR, GS, GOGAT i GDH). Należy stwierdzić, że opis wyników badań w ocenianej rozprawie doktorskiej jest poprawny i logiczny. Po fragmentach omówienia wyników cytowane są właściwe ryciny lub tabele, które opatrzone są odpowiednimi podpisami i/lub legendą. W pracy eksperymentalnej uzyskano szereg ciekawych i często nowych wyników. Doktorantka potwierdziła hamujący wpływ niklu na wzrost siewek i niektóre procesy fizjologiczne, obserwowany przez innych badaczy. Do interesujących wyników uzyskanych w pracy doktorskiej należy zaliczyć wykazanie, że: i) odpowiedzi siewek ogórka na stres wywołany obecnością Ni są zależne od organu rośliny; ii) stres

oksydacyjny, po podaniu Ni, wynika z hamującego działania tego metalu na aktywność CAT i SOD; iii) peroksydazy klasy III uczestniczą w procesie usuwania RFT i dostosowaniu do warunków stresowych; iv) obecność Ni wpływa na poziom wczesnych oraz końcowych produktów peroksydacji lipidów, a także modyfikuje zawartość poszczególnych klas fosfolipidów i zwiększa stopień nienasycenia v) Ni wywołuje zmiany w zawartości i profilu związków fenolowych; vi) Ni wpływa na pobieranie azotanów i aktywności enzymów uczestniczących w przemianach azotu; vii) po traktowaniu Ni następuje wzrost zarówno ekspresji genu *GDH* jak i aktywności dehydrogenazy glutaminianowej (NADH-GDH). Po analizie rozdziału prezentującego wyniki eksperymentów mogę stwierdzić, iż sposób przedstawienia i opis wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej nie budzą zastrzeżeń. Nasuwa się kilka drobnych sugestii: brakuje informacji o zawartości wody w tkankach (lub wskaźnika RWC), po traktowaniu Ni. Należy żałować, że nie oznaczono zawartości H₂O₂ oraz askorbinianu i glutationu. Uważam, że należałoby dokładniej opisać wyniki analiz ekspresji genów zaangażowanych w gospodarkę azotową w analizowanym materiale (str. 124).

Dyskusja jest obszernym rozdziałem rozprawy doktorskiej, w którym trafnie analizowano wyniki badań własnych i porównano z danymi opublikowanymi przez inne grupy badawcze. Doktorantka omówiła wpływ niklu na procesy wzrostowe i fizjologiczne siewek ogórka i innych roślin, następnie - na procesy pro-oksydacyjne i antyoksydacyjne oraz na skład ilościowy i jakościowy związków fenolowych. Ostatnia część Dyskusji poświęcona została aspektom oddziaływań Ni na procesy pobierania i asymilacji azotu w komórkach roślinnych. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano wnioski, będące logicznym następstwem przeprowadzonych badań. Zaprezentowane oraz dyskutowane wyniki badań przyczyniają się niewątpliwie do poszerzenia wiedzy o mechanizmach toksycznego oddziaływania niklu na rośliny. Generalnie oceniana rozprawa doktorska dobrze wpisuje się we współczesne, wieloaspektowe rozważania dotyczące możliwości odpowiedzi roślin użytkowych na zanieczyszczenia - oddziałujące na ich kondycję, wzrost i produktywność. Nie nasuwa się wiele uwag dotyczących rozdziału Dyskusja w ocenianej rozprawie. Prezentowane wyniki własne nie znikają na tle danych literaturowych i są podkreślone w odpowiednim stopniu (choć warto czasami cytować własne ryciny). Żałuję jednak, iż w tym obszernym rozdziale zabrakło schematu lub tabeli z podsumowaniem wyników, co ułatwiłoby powiązanie poszczególnych wątków pracy (aczkolwiek przydatne są krótkie podsumowania podrozdziałów). Uważam, że rozdział Dyskusja powinien zawierać szersze omówienie zmian w ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm azotowy oraz bardziej staranne wprowadzenie (str. 125) i nieco inne zakończenie (np. wskazanie badań, które należy uzupełnić/kontynuować, str. 155). Wiemy, że nie zawsze obserwowanym zmianom ekspresji genów towarzyszą odpowiednie zmiany poziomu białek i ich aktywności, Interesuje mnie, czy Doktorantka rozważała badanie poziomu wybranych białek zaangażowanych w metabolizm azotowy (z udziałem

przeciwiał, np. z firmy Agrisera). Czy takie badania były już wykonywane przez innych badaczy w warunkach zbliżonych do stosowanych? Myślę, iż warto uzupełnić dyskusję o te aspekty w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Należy jednak stwierdzić, iż problematyka badawcza z zakresu zainteresowań została opanowana. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematyki i terminologii naukowej, potrafiła właściwie zinterpretować wyniki własnych eksperymentów i umiejętnie analizować opublikowane prace innych badaczy. W niektórych fragmentach Dyskusji starała się także krytycznie ustosunkować do wyników badań własnych, a jest to ważne w pracy naukowej. O doświadczeniu mgr A. Witusińskiej jako badacza, świadczy również opublikowana praca, w której jest współautorką, jak również udział w stażach, projektach naukowych i konferencjach. Oczekuję, że na obronie rozprawy doktorskiej mgr A. Witusińska, oprócz odpowiedzi na wcześniejsze sugestie/pytania, uzupełni dane o areale upraw ogórków i znaczeniu w gospodarce (poziomie spożycia) oraz przedstawi informacje o glebach, na których ogórki są uprawiane, np. czy stwierdzono by zawierały nadmierne stężenia związków niklu? W ocenianej pracy badano liście i korzenie siewek – a co z owocami, które spożywamy - czy mogą zawierać znaczące ilości Ni (mimo barier transportowych)? Chciałabym, aby Doktorantka podała także informacje o tym, czy po podaniu Ni do podłoża występują symptomy innego stresu wtórnego, jakim jest stres osmotyczny lub wodny, poza stresem oksydacyjnym? Zaprezentowane wyniki barwienia materiału roślinnego z DAB i NBT wskazały na potencjalnie wysoką zawartość RFT w okolicach wiązek przewodzących – jaka może być tego przyczyna? Oczekuję także wskazania, które aspekty badań własnych warto kontynuować i uzupełnić w najbliższej przyszłości.

Rozprawa doktorska mgr A. Witusińskiej jest napisana poprawnym językiem naukowym, bez większych błędów. Praca jest odpowiednio zredagowana, prawidłowo cytowane są publikacje naukowe innych autorów a spis literatury jest ujednolicony. Nie znalazłam uchybień w strukturze rozprawy doktorskiej. Uważam, iż przedstawiona do recenzji praca jest estetyczną i staranną rozprawą doktorską, którą generalnie czyta się z przyjemnością. Znalaziono jednak pewne niedociągnięcia, np. nadmierny „skrót myślowy” (str. 44), cyt.: „roślin strączkowych, które mogą wiązać azot atmosferyczny...”. W tekście rozprawy doktorskiej stwierdzono także drobne błędy literowe, choć nieliczne (na stronach: 11, 16, 17, 22, 30, 38, 42, 43, 48, 49, 55, 63, 64, 70, 74, 76, 80, 85, 89, 96, 116, 125, 140, 142, 151, 154, 155). Spis literatury składający się z ponad 22 stron (str. 161-183) należy uznać za dość starannie opracowany fragment pracy doktorskiej - znalaziono drobne błędy w nazwach czasopism i ich skrótach, a także literówki (np. str. 161, 162, 165, 167, 170, 172, 173, 174, 181), brakuje ponadto w spisie pracy: Green i Sambrook 2012 (cytowanej na stronie 74). Podsumowując,

chciałabym podkreślić, że wymienione uwagi krytyczne nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej mgr A. Witusińskiej.

Wniosek końcowy

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry M. Witusińskiej wpisuje się w zakres dyscypliny nauki biologiczne (dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych), jest aktualna naukowo, wymagała samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i zawiera oryginalne rozwiązania problemów badawczych. Stwierdzam, iż oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r., z późniejszymi zmianami). Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy, dobrze opanowała współczesne metody badawcze, uzyskane wyniki są oryginalne a dyskusja została prawidłowo przeprowadzona ze znajomością wiedzy teoretycznej w dyscyplinie i terminologii naukowej. Stwierdzam, jako recenzent, że praca doktorska mgr Aleksandry M. Witusińskiej zatytułowana: „Wpływ niklu na procesy związane ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem azotu w siewkach ogórka” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występuję zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry M. Witusińskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Białystok, 30.11.2023 r.

Iwona Ciereszko

Prof. dr hab. Iwona Ciereszko
Katedra Biologii i Ekologii Roślin
Wydział Biologii UwB