



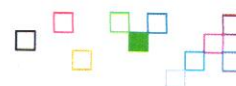
Lublin, 22 marca 2019 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Biologii i Biochemii
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 inż. Aleksandry Koźmińskiej**

pt. „Analiza porównawcza odpowiedzi pokrewnych gatunków roślin na suszę oraz na zasolenie – użyteczny model badania mechanizmów tolerancji na stres”
wykonanej w Zakładzie Botaniki i Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Roślin i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Hanus-Fajerskiej

Stres suszy, wywołany brakiem lub niskim poziomem opadów lub niewystarczającym poziomem nawadniania, stanowi jeden z najpoważniejszych problemów w produkcji roślinnej w skali całego świata. Do tej pory uważano, że problem suszy dotyczy rejonów o klimacie suchym i półsuchym, ale ostatnie lata pokazują, że ocieplenie klimatu, spowodowane głównie działalnością człowieka, pociąga za sobą znaczne anomalie pogodowe i poważne deficyty opadów również w rejonach klimatu umiarkowanego. Szacuje się, że suszą dotkniętych jest ok. 45% obszarów użytkowanych rolniczo, a dodatkowo blisko 20% terenów poddanych nawadnianiu jest uważanych za zasolone. Susza i zasolenie gleb są przyczyną ubytku areалу gleb uprawnych, dochodzącego nawet do 50% rocznie. Biorąc pod uwagę fakt, że światowa populacja ludności stale rośnie, rośnie również zapotrzebowanie na produkcję rolniczą, co w zestawieniu z malejącą powierzchnią obszarów rolnych stanowi bardzo poważne wyzwanie dla naukowców i osób odpowiedzialnych za rolnictwo. Jedynym racjonalnym rozwiązaniem tego problemu jest selekcja i wprowadzanie na tereny dotknięte suszą i zasoleniem gatunków/odmian/linii roślin tolerancyjnych na te stresy. W tym kontekście, podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących oceny tolerancji roślin na stres suszy i zasolenia, określenia markerów stresu oraz mechanizmów odporności roślin na te stresowe czynniki środowiska jest zagadnieniem nie tylko interesującym poznawczo lecz również ważnym ze względów praktycznych. W mojej ocenie, zarówno tematyka badawcza, jak również gatunki roślin wykorzystane do badań zostały dobrane właściwie, a wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są interesujące i wartościowe.



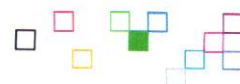
Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór 4 publikacji opublikowanych w latach 2017-2019 w czasopismach z bazy JCR. Łączny współczynnik oddziaływania IF tych prac wynosi 6,392, a sumaryczna liczba punktów MNiSW – 100. Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, liczba współautorów waha się od 6 do 8. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w dwóch pracach jest również autorem korespondencyjnym. Udział Doktorantki w powstaniu tych prac jest wiodący, na poziomie 45-60%, co zostało potwierdzone pisemnymi oświadczeniami współautorów. Wyjaśnienia wymaga natomiast zakres analiz biochemicznych wykonywanych w ramach badań przez Doktorantkę, ponieważ dokładnie taki sam wkład, polegający na „wykonaniu analiz biochemicznych”, został również zadeklarowany przez innych współautorów, a mianowicie przez dr. Mohamada Al Hassana (publikacja pierwsza, opublikowana w Journal of Applied Botany and Food Quality, 2017; publikacja druga – South African Journal of Botany, 2018; publikacja czwarta – Scientia Horticulturae 2018). W trzeciej publikacji (Sustainability, 2019), dr Mohamad Al Hassan deklaruje udział w wykonaniu analiz biochemicznych. Chciałabym się dowiedzieć, jakie konkretnie analizy biochemiczne były wykonywane przez Doktorantkę.

Przedstawione do oceny prace przedstawiają analizę porównawczą odpowiedzi na stres suszy i zasolenia różnych gatunków roślin z rodzaju *Calendula* (nagietek), *Silene* (lepnica) i *Sedum* (rozchodnik). Wybór gatunków jest bardzo dobrze uzasadniony, podyktowany był ich różną wrażliwością na stresy suszy i zasolenia opisaną w literaturze, różnym pochodzeniem geograficznym i zróżnicowanymi środowiskami życia, a także znaczeniem dla człowieka (np. *Calendula* jako ceniona roślina zielarska i dodatek do żywności, *Sedum* jako tolerancyjne na abiotyczne czynniki stresowe rośliny ozdobne, polecane m.in. do stosowania w obszarach miejskich, w tym w systemach zielonych dachów). Dla wszystkich badanych gatunków stosowano zbliżone warunki eksperymentalne (uprawa w warunkach szklarniowych na jednakowych typach podłoża, poziom zasolenia 50-150 mM NaCl w przypadku *C. officinalis* lub 150 i 300 mM NaCl w przypadku *Silene*, stres suszy wywołany brakiem podlewania przez 5 tygodni w przypadku *Silene* lub 4 tygodnie w przypadku *Sedum*). We wszystkich roślinach ze wszystkich wariantów eksperymentalnych analizowano parametry wzrostu (wysokość pędu, świeża/sucha masa), procentową zawartość wody, stężenie barwników fotosyntetycznych, jonów nieorganicznych (głównie Na⁺, K⁺, Cl⁻), wybrane markery stresu oksydacyjnego, takie jak poziom MDA (marker peroksydacji lipidów) oraz wybranych nieenzymatycznych antyoksydantów (flawonoidy, całkowita pula związków fenolowych), a także zawartość proliny i cukrów rozpuszczalnych – osmolitów o kluczowym znaczeniu w tolerancji roślin na obydwa czynniki stresowe. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka zaproponowała uniwersalne markery biochemiczne występowania stresu suszy i zasolenia w roślinach oraz tolerancji tych stresów.

Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest bardzo przejrzysty i poprawny przy tego typu formacie pracy, opartym na monotematycznym cyklu publikacji.

Rozdział I stanowi **wykaz publikacji** wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z ich danymi bibliometrycznymi.

W krótkim, dwustronicowym **streszczeniu (Rozdział II)**, Autorka zwięźle przedstawiła cele pracy doktorskiej oraz najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane w kolejnych publikacjach.



Przedstawiony na kolejnych ośmiu stronach **Wstęp teoretyczny (Rozdział III)**, jest podzielony na 4 podrozdziały, w których omówiono kolejno: 1) negatywny wpływ suszy i zasolenia na produkcję roślinną; 2) zaburzenia procesów fizjologicznych roślin indukowane tymi czynnikami stresowymi; 3) mechanizmy tolerancji roślin na suszę i zasolenie; 4) znaczenie badań porównawczych w ocenie wrażliwości roślin na czynniki stresowe i w selekcji gatunków/odmian/populacji tolerancyjnych. Prezentowane zagadnienia są poparte adekwatną literaturą oraz dwoma ilustracjami, przedstawiającymi przygotowane przez Autorkę schematyczne porównania odpowiedzi roślin na stres suszy i zasolenia.

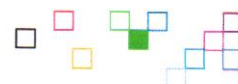
Nie mogę niestety zgodzić się ze stwierdzeniem przedstawionym na str. 6 „*Wczesne reakcje roślin na stres suszy i zasolenia są bardzo zbliżone ze względu na fakt, że oba stresory wywołują fizjologiczny deficyt wody zwany suszą fizjologiczną (Munns, 2002)*”. Pojęcie „susza fizjologiczna” odnosi się do zjawiska, kiedy woda jest obecna w środowisku wzrostu rośliny, ale nie może być pobrana ze względu na niski potencjał wody w roztworze glebowym (spowodowany np. dużym zasoleniem), niedostatek tlenu lub niską temperaturę. Tak więc susza fizjologiczna zdecydowanie występuje przy stresie zasolenia, natomiast absolutnie nie odnosi się do warunków deficytu wody w glebie, czyli suszy.

Mimo to uważam, że zamieszczone we Wstępie dane zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, wskazujący na dobre przygotowanie Doktorantki do realizacji własnych zamierzeń badawczych. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy i wskazują na celowość przeprowadzenia badań podjętych w ramach doktoratu.

Cele pracy (Rozdział IV) zostały sformułowane logicznie i poprawnie, jako rozwinięcie i uszczegółowienie postawionych hipotez roboczych.

Rozdział V prezentuje zwięzłe **omówienie wyników**, przedstawionych w kolejnych publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Autorka, po krótkim wprowadzeniu odnoszącym się do celowości i metodyki badań, płynnie połączyła informacje z poszczególnych manuskryptów, uwypuklając najważniejsze osiągnięcia poszczególnych eksperymentów. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka wyciągnęła bardzo logiczne i adekwatne **wnioski**, przedstawione w **Rozdziale VI**, zatytułowanym **Podsumowanie**. Na uznanie zasługuje krytyczne podejście Doktorantki do uzyskanych wyników i dostrzeganie zależności, które można było sprecyzować w bardzo konkretnych wnioskach ogólnych. W rozdziale tym, udało się Autorce uniknąć zbędnego powtarzania czy streszczania wyników, co świadczy o Jej dużej dojrzałości naukowej. Wśród najważniejszych osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy, wymienionych we wnioskach, należy wymienić:

- wskazanie uniwersalnego markera stresu zasolenia w badanych gatunkach – jest nim akumulacja jonów Na^+ , natomiast tolerancja zasolenia jest związana z utrzymaniem odpowiedniej homeostazy jonowej, a zwłaszcza niezakłóconego poziomu jonów K^+ ;
- wykazanie, że zawartość barwników fotosyntetycznych odzwierciedla poziom tolerancji na stres suszy, przy czym wzmożona degradacja barwników wskazuje na obniżoną tolerancję na ten stres, a ich wysoka konstytutywna zawartość, stwierdzona zwłaszcza w rodzaju *Sedum*, może być jednym z czynników warunkujących podwyższoną tolerancję gatunków tego rodzaju na suszę;
- stwierdzenie, że akumulacja proliny nie jest związana z poziomem tolerancji na stres zasolenia, natomiast wzrost akumulacji proliny może być wskaźnikiem występowania tego



stresu u roślin; jednocześnie wysokie stężenie proliny może wpływać na zwiększoną tolerancję stresu suszy.

Uważam, że wniosek dotyczący MDA jest nieprecyzyjnie sformułowany i przez to nie wnosi istotnej informacji. MDA (jako produkt peroksydacji lipidów i wskaźnik stresu oksydacyjnego) nie może być uznany „za uniwersalny marker tolerancji suszy...” – nie sama obecność tego związku lecz jego zwiększona bądź obniżona synteza może wskazywać na poziom stresu oksydacyjnego wywołanego przez stres suszy i dopiero w połączeniu z innymi parametrami opisującymi poziom tolerancji można mówić o jego roli w tym stresie (tzn. poprzez porównanie stężenia MDA w roślinach o zróżnicowanej tolerancji). Poprosiłabym Doktorantkę o rozwinięcie tego wniosku i wyjaśnienie, co miała na myśli formułując go.

Rozdział VII przedstawia **wykaz literatury** cytowanej w poprzednich rozdziałach. Liczy 73 pozycje, wszystkie anglojęzyczne, w przeważającej większości opublikowane w ostatnich latach. Są to głównie artykuły opublikowane w czasopismach naukowych z bazy JCR, jak również rozdziały w monografiach i jedno źródło internetowe. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w badanej tematyce i umiejętności korzystania ze źródeł literaturowych. Moja uwaga dotyczy niejednolitego sposobu cytowania literatury ('W' lub 'In' w odniesieniu do rozdziałów w monografiach, niejednolita pisownia redaktorów monografii, wolumen lub nie, czasem wielkie litery w tytułach, kropki, odstępki itp.). Zauważyłam również kilka rozbieżności pomiędzy literaturą cytowaną w tekście i przedstawioną w spisie lub niepełne dane bibliograficzne:

- pozycja Ashraf M., Akram N.A. 2009 – na str. 8 jest odniesienie do Ashaf i in. 2009;
- pozycja Blum A. 2011 – niepełne dane bibliograficzne (brak czasopisma lub wydawnictwa?);
- pozycja Carillo P. – brak wydawnictwa;
- pozycja Jaleel C.A. – w tekście na str. 7 jest Jallel i in.;
- pozycja Talukdar D. 2013 – w tekście na str. 11 jest Talukdar i in. 2013;
- pozycja Volkov V., 2003 – w tekście na str. 11 jest Volkov i in. 2013.

Doktorantka przedstawiła również swój dorobek naukowy (**Rozdział VIII**), w skład którego, oprócz czterech publikacji stanowiących integralną część rozprawy doktorskiej, wchodzi 10 publikacji naukowych, w tym dwie w czasopismach z bazy JCR, jeden rozdział w monografii polskojęzycznej i jeden rozdział w monografii anglojęzycznej oraz 15 doniesień konferencyjnych. Opisową część rozprawy doktorskiej zamyka streszczenie w języku angielskim (**Rozdział IX**).

Zasadnicza część rozprawy doktorskiej (**Rozdział X**) to zestaw czterech publikacji. Stanowią one spójny tematycznie cykl badań dotyczących reakcji roślin na stres zasolenia (publikacja I), suszy (publikacja IV) oraz porównanie reakcji tych samych gatunków na stres suszy i zasolenia (publikacja II i III) z wykorzystaniem tych samych parametrów wzrostu jako miary tolerancji/wrażliwości i markerów biochemicznych do oceny ich odpowiedzi obronnych. Prace te prezentują wysoki poziom, łącząc w sobie badania o charakterze podstawowym, wskazując jednocześnie na ich potencjał aplikacyjny. Ponieważ stres suszy i zasolenia często współwystępują w środowisku i wywołują podobne objawy toksyczności w roślinach, związane z wewnętrznym deficytem wody i zakłóceniem gospodarki jonowej, uważam badania łączące w sobie odpowiedzi roślin na te dwa rodzaje stresów za bardzo wartościowe. Sekwencja tych prac również świadczy o rozwoju naukowym Doktorantki i dążeniu do rozwiązania konkretnego



problemu badawczego. Wychodząc od badania gatunku o umiarkowanym poziomie tolerancji na zasolenie (*Calendula*), poprzez analizę porównawczą tolerancji na suszę i zasolenie różnych gatunków z rodzaju *Silene*, a następnie porównując odpowiedzi fizjologiczne czterech populacji tego samego gatunku (*Silene vulgaris*) na te czynniki stresowe, Autorka zakończyła swoje eksperymenty skupiając się na porównaniu odpowiedzi fizjologicznej czterech gatunków roślin gruboszowatych, sukulentów z rodzaju *Sedum*, znanych ze swojej zdolności do zasiedlania siedlisk suchych, odpornych na stres deficytu wody.

Mimo, że przedstawione prace przed opublikowaniem przeszły przez proces recenzji, nie udało się ustrzec pewnych błędów, na przykład w pracy trzeciej (Sustainability 2019) podano nieprawidłowy wzór do obliczania zawartości wody w roślinie (zabrakło przeliczenia na świeżą masę w mianowniku).

Część opisowa pracy jest napisana starannie, chociaż nie udało się Autorce uniknąć kilku drobnych pomyłek i nieścisłości, jak również nielicznych błędów natury edytorskiej lub stylistycznej (literówki, podwójne spacje, nieprawidłowo umieszczone lub brakujące przecinki). Z obowiązku recenzenta wymienię tylko jedną poważniejszą pomyłkę – na stronie 14 (7. wers pierwszego akapitu) pojawiły się jony Cl^+ zamiast jonów Cl^- .

Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i wartościowych wyników uzyskanych w pracy, przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Koźmińskiej.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka znakomicie wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celu pracy. Uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i nowatorskie, i wnoszą istotny wkład w poznanie odpowiedzi niespokrewnionych ze sobą roślin o różnym poziomie tolerancji, jak również roślin spokrewnionych ze sobą na poziomie rodzaju czy gatunku, na stres suszy i zasolenia. Wierzę, że opublikowane prace stanowiące integralną część rozprawy doktorskiej, w których powstaniu Doktorantka miała wiodącą rolę, znajdą uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym, czego dobrym zwiastunem może być cytowanie pracy opublikowanej w 2018 roku przez autorów spoza grona współautorów tej publikacji.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 roku, poz. 1852 oraz z 2015 r., poz. 249 i 1767). W związku z powyższym, przedkładał Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Koźmińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując jednocześnie wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Margareta Dęciak

