

Warszawa, 7.04.2022 r.

Prof. dr hab. Anna Mięka
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Hornyák
pt. „Rozwojowe i fizjologiczne mechanizmy aborcji kwiatów kształtujące plon nasion
gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum* Moench.)”, wykonanej w Uniwersytecie
Rolniczym im. Hugona Kollataja w Krakowie, pod kierunkiem naukowym prof. dr hab.
inż. Agnieszki Płazek oraz promotora pomocniczego dr inż. Przemysława Kopcia

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną recenzji jest pismo z dnia 3 marca 2022 r., wystosowane przez prof. dr hab. inż. Marcina Rapacza, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollataja w Krakowie. Celem recenzji jest stwierdzenie czy przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017, poz. 1789).

2. Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Hornyák obejmuje zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie pięciu, oryginalnych, anglojęzycznych artykułów naukowych. Prace ukazały się w latach 2019-2021 (trzy pochodzą z 2020 r.) w czasopismach naukowych notowanych w bazie JCR, mieszczących się w pierwszym kwartylu (Q1), tj.: *International Journal of Molecular Sciences* (trzy prace), *Photosynthetica* i *Crop and Pasture Science*. Ich wskaźniki bibliometryczne (roczny IF) mieszczą się w przedziale od 1,570 do 5,542. Sumaryczny roczny współczynnik oddziaływania jest wysoki i wynosi 18,832, zaś 5-letni IF=23,701.

Artykuły stanowiące recenzowaną rozprawę są 6-, 7- (3 prace) i 8-autorskie. W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej – drugim, w pozostałych dwóch - piątym z kolei. W jednej z prac ma Ona przypisany status autora korespondencyjnego. Wyraźnie zaznaczony został indywidualny i wyodrębniony wkład Doktorantki w powstanie ocenianych artykułów, co jest zgodne z zapisami w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Zgodnie z oświadczeniami współautorów, Doktorantka we wszystkich pięciu pracach brała udział w wykonywaniu części badań eksperymentalnych w zakresie: prowadzenia doświadczeń w komorze fitotronowej, pobierania materiału roślinnego do dalszych badań, prowadzenia analiz fizjologicznych, proteomicznych i mikroskopowych. W czterech pracach uczestniczyła ponadto w interpretacji uzyskanych wyników i wizualizacji danych. W jednej pracy brała udział w tworzeniu jej koncepcji, przygotowywaniu manuskryptu do opublikowania, jak

również korespondowała z redakcją i recenzentami. **Moje wątpliwości budzi włączony w skład rozprawy, w zakresie analizy zawartości białek szoku cieplnego, artykuł nr 3 [Płażek i in. 2020; „Synthesis of heat-shock proteins HSP-70 and HSP-90 in flowers of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) under thermal stress”]**. Zgodnie z deklaracją, Doktorantka zebrała materiał roślinny do analiz proteomicznych, nie brała w nich jednak udziału. Nie uczestniczyła również w opracowywaniu rezultatów badań i interpretacji uzyskanych wyników. Wyniki tych analiz nie powinny zatem zostać włączone do rozprawy doktorskiej mgr M. Hornyák, co ma miejsce m.in. jako rozdział 7.1.4 (str. 22) oraz jako pkt. 2 podsumowania w rozdziale 8 (str. 27). Udział Doktorantki w powstaniu tej publikacji był skoncentrowany na pomiarach fluorescencji chlorofilu *a* i analizie tych wyników oraz wykonaniu obszernych doświadczeń mikroskopowych. W tym zakresie wykorzystanie publikacji w niniejszej dysertacji znajduje umocowanie prawne.

Strukturalnie, przedłożona do oceny dysertacja składa się z części formalnej zawierającej: streszczenie polsko- i anglojęzyczne, oświadczenia i umowy licencyjne, podziękowania, spis treści, wykaz używanych skrótów i terminów oraz wykaz prac wchodzących w skład rozprawy. Na kolejnych 25 stronach, Doktorantka pokrótce omówiła badane zagadnienia zachowując układ typowy dla tego typu opracowań. Opis ten zawiera: streszczenie (w dwóch językach), wstęp, hipotezy i cel badań, opis metod badawczych, omówienie najważniejszych wyników, podsumowanie i wnioski oraz cytowaną literaturę. Następnie zostały załączone artykuły stanowiące dysertację, a po nich oświadczenia Autorki i współautorów. Tytuł rozprawy doktorskiej Pani mgr M. Hornyák w pełni oddaje treść i cel pracy. Hipotezy badawcze zostały postawione prawidłowo, cel zdefiniowany jasno i zwięźle, a wyniki badań omówione umiejętnie. W opracowaniu, 35 pozycji literaturowych zostało zacytowanych poprawnie.

Oceniana praca doktorska została wykonana w ramach badań realizowanych w projekcie finansowanym przez NCN (OPUS 13), którego kierownikiem była prof. dr hab. Agnieszka Płażek. Pani mgr inż. Marta Hornyák była zatrudniona zatem w granie promotora jako doktorant-stypendysta.

Podsumowując, chociaż wymienione wyżej uchybienie wyklucza wykorzystanie części wyników zawartych w artykule trzecim, to liczba i wartość pozostałych publikacji oraz zadeklarowany zakres udziału Doktorantki w tych pracach, rekompensują tę stratę. Stwierdzam zatem, że z formalnego punktu widzenia, rozprawa nie budzi zastrzeżeń i spełnia ustawowe wymagania do ubiegania się o stopień doktora w oparciu o współautorskie publikacje.

3. Ocena merytoryczna

Przedmiot rozprawy, cel i znaczenie

Dynamiczny przyrost populacji ludzkiej, w połączeniu z rosnącymi jej potrzebami, wymaganiami i umiejętnościami wdrażania coraz nowocześniejszych technologii, doprowadziły na przestrzeni stuleci do zawężenia puli spożywanych roślin. Obecnie podejmuje się starania w kierunku odwrócenia tego trendu i urozmaicenia diety ludzkiej poprzez poszerzenie liczby uprawianych gatunków. Jednakże by mogły być one wykorzystywane na dużą skalę, ich uprawa wielkotowarowa musi być opłacalna. Obiektem badań przedstawionej rozprawy doktorskiej jest gryka, której liczne zalety skłaniają do używania w przemyśle spożywczym i paszowym, w farmacji i ziołolecznictwie. Skład chemiczny nasion gryki jest

podobny do składu zbóż, lecz nie zawierają one glutenu, są bogate w błonnik pokarmowy i rutynę, mają wysoką zawartość białka i dobrze zbilansowany skład aminokwasowy. Ponadto, produkty uboczne jej przerobu znajdują także jeszcze inne zastosowania. Niedostateczne zawiązywanie nasion w stosunku do liczby kwiatów wytwarzanych przez grykę ogranicza plonowanie, a tym samym możliwości jej powszechnej uprawy. Doktorantka w swojej rozprawie podjęła się wyjaśnienia podstaw zjawiska aborcji kwiatów gryki, które znacząco ogranicza plon nasion tej rośliny. Problem wzrostu typu niesamokończącego, który reprezentuje gryka, dotyka także wielu innych ważnych gospodarczo roślin użytkowych np. lubinu, bobiku czy kukurydzy. Z tego względu podjęty przez Doktorantkę problem, którego celem była analiza rozwojowych i fizjologicznych mechanizmów aborcji kwiatów kształtujących plon nasion *Fagopyrum esculentum* uważam za cenny.

Zastosowane metody badawcze i najważniejsze osiągnięcia

Doktorantka przedstawiła hipotezy badawcze, w których założyła, że na przebieg procesów embriologicznych negatywny wpływ mają wysoka temperatura oraz niedobór składników pokarmowych i konkurencja o asymilaty pomiędzy licznie produkowanymi kwiatami a zawiązywanymi nasionami w trakcie całego cyklu wegetacyjnego. Hipotezy te Autorka sukcesywnie i z powodzeniem zweryfikowała pozytywnie w kolejnych opublikowanych artykułach. W badaniach zostały wykorzystane: polska odmiana gryki „Panda” i ród hodowlany PA15 (odmiana „Korona”). Użyte odmiany, w warunkach stresu termicznego, wykazują odpowiednio 4,7 i 3,2 razy więcej zdegenerowanych woreczków zalążkowych, co wskazuje na ich różną tolerancję na stres. W konsekwencji odmiany te charakteryzują się bardziej lub mniej niestabilnymi plonami nasion.

W pierwszej pracy (Płażek i in. 2019) wykluczono negatywny wpływ podwyższonej z 20 °C do 30 °C temperatury na żywotność pyłku gryki co wskazuje, że zawiązywanie nasion zależy przede wszystkim od wadliwego rozwoju gametofitu żeńskiego. Następnie, używając metody parafinowej przygotowywania skrawków roślinnych do mikroskopii świetlnej, udokumentowano zaburzenia występujące pod wpływem stresu termicznego w rozwoju woreczka zalążkowego i określono ich odsetek. Materiał do badań pobierano z dwumiesięcznych roślin uprawianych w kontrolowanych warunkach fitotronowych, których kwitnienie rozpoczyna się około 4 tygodnia od wysiewu nasion i trwa 30-60 dni. Z badań wynika, że u odmiany „Panda” aborcji pod wpływem wyższej temperatury ulega w sumie ponad 40% pąków i otwartych kwiatów, zaś u odmiany „Korona” wskaźnik ten jest prawie dwa razy niższy. Przeanalizowanie profilu hormonalnego wykazało, że temperatura 30°C przyspiesza biosyntezę kwasu abscysynowego (ABA) i salicylowego w kwiatach genotypu „Panda”, co uprawnia do wnioskowania, że stres temperaturowy stymuluje proces starzenia i obumierania kwiatów, których gotowość do zapłodnienia i tak jest bardzo krótka.

Kolejna praca (Hornyák i in. 2020) jest rozwinięciem badań nad wpływem stresu termicznego, lecz tym razem w zakresie jego wpływu na aktywność fotosyntetyczną. Zastosowano szereg metod badawczych, które pozwoliły na określenie kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, intensywności wymiany gazowej, zawartości rozpuszczalnych węglowodanów, wycieku elektrolitów jako parametru przepuszczalności błon komórkowych oraz zawartości ABA i jasmonianów. Dzięki takiemu podejściu możliwe było wskazanie cech, które różnicują oba genotypy w reakcji na stres termiczny. Analiza uzyskanych rezultatów pokazała, że mimo, iż wyższa temperatura stymulowała wzrost wegetatywny obu genotypów, to liście bardziej

wrażliwej na wysoką temperaturę odmiany „Panda” asymilowały dwukrotnie więcej CO₂, wykazywały większy wzrost fotosyntezy netto, mniejszą intensywność transpiracji, słabszą redukcję zawartości rozpuszczalnych węglowodanów, większą zawartość jasmonianów i mniejszą ABA niż liście kontrolne. Rośliny odmiany „Korona” nie reagowały na stres termiczny wzmożoną biosyntezą ABA, a w przypadku jasmonianów odnotowano spadek ich zawartości.

Głównym celem następnej pracy (Płażek i in. 2020) zdefiniowanym przez autorów było sprawdzenie czy białka szoku cieplnego (HSP-90 i HSP-70) pełnią ochronną rolę u gryki narażonej na stres termiczny podczas rozwoju mikrospor, ziaren pyłku i woreczków zalążkowych. Ze względu na to, że analizy Western Blot oraz wizualizacja i interpretacja uzyskanych zmian w zawartości białek zostały wykonane bez udziału Doktorantki, pomijam omawianie tutaj tych wyników jako elementu jej sukcesu. Należy jednak zwrócić uwagę na poruszony w tej pracy inny ważny problem, zrealizowany w pełni przez mgr M. Hornyák. Dotyczy on badań nad kinetyką fluorescencji chlorofilu *a* w liściach położonych najbliżej kwiatostanów w kontekście wpływu tego parametru na zawiązywanie nasion i zamieranie zarodków z powodu niedożywienia. Te powiązania nie zostały dostatecznie omówione. **Proszę zatem Doktorantkę o rozwinięcie tego zagadnienia w czasie publicznej obrony.**

W czwartej publikacji (Hornyák i in. 2020) autorka skoncentrowała się na określeniu zależności pomiędzy przebiegiem procesów embriologicznych, profilem hormonalnym kwiatów i efektywnością plonowania odmian „Panda” i „Korona”. Dla zweryfikowania hipotezy, że rośliny o krótszym okresie kwitnienia mogą dawać wyższy plon nasion, autorzy rozwinęli system uprawy *in vitro* i *in planta*, w którym modyfikowano dostępność substancji odżywczych oraz regulowano liczbę kwiatów. Badania pokazały, że pozbawienie kwiatów składników pokarmowych prowadzi do pogorszenia ich jakości i obumierania woreczków zalążkowych. Potwierdziły również silną dodatnią korelację między liczbą kwiatów a ich obumieraniem oraz ujemną korelację tego parametru z liczbą nasion i ich wypełnieniem. Analiza fitohormonów pokazała, że badane odmiany różnią się pod względem zawartości hormonów odpowiedzialnych za wabienie owadów. Kwiaty „Panda” gromadzą znacznie większe ilości kwasu salicylowego (który podnosząc temperaturę stymuluje uwalnianie lotnych związków), zaś kwiaty „Korona” produkują głównie kwas jasmonowy (który nadaje im atrakcyjny zapach). **Czytając tę pracę zastanawiam się, czy podniesienie plonu gryki byłoby możliwe do osiągnięcia poprzez zastosowanie do jej uprawy bardziej żyznych gleb? Jak ten parametr może wpływać na rozwój i plonowanie gryki?**

W ostatniej publikacji (Kopeć i in. 2021) Doktorantka podjęła się scharakteryzowania zmian w profilach białkowych zachodzących pod wpływem stresu termicznego w kwiatach i liściach dwóch badanych odmian gryki. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej, otrzymane plamki białkowe przeanalizowano komputerowo, a następnie poddano je identyfikacji za pomocą spektrometrii masowej. Efektem tych badań jest zidentyfikowanie białek różnicujących odpowiedź na stres cieplny dwóch odmian gryki zwyczajnej o różnej wrażliwości na traktowanie wysoką temperaturą oraz wskazanie białkowego markera wrażliwości gryki na ten stres (izoforma X2 syntazy indolo-3-glicerolo-fosforanu). **W związku z tym osiągnięciem chciałabym zapytać jak można wykorzystać dalej wiedzę o białkowym markerze wrażliwości gryki na stres termiczny w dalszych badaniach oraz w praktyce?**

Wszystkie prace przytoczone powyżej są dobrze napisane, wyniki zawierają element nowatorski, są poprawnie zinterpretowane i przedyskutowane. Wyniki są podparte dobrze dobranymi i przeprowadzonymi testami statystycznymi, takimi jak dwuczynnikowa analiza wariancji, test Duncana, test zgodności chi-kwadrat. Na szczególne wyróżnienie zasługują starannie wykonane obrazy mikroskopowe, za pomocą których Autorka rejestrowała zaburzenia w rozwoju woreczków zalążkowych pod wpływem różnych analizowanych czynników.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki w przedstawionej dysertacji uważam:

- 1) opisanie po raz pierwszy profilu zmian hormonalnych zachodzących w czasie rozwoju i przekwitania kwiatów,
- 2) określenie białkowego markera wrażliwości gryki na stres wysokiej temperatury,
- 3) wskazanie stresu troficznego jako głównej przyczyny niskiego plonowania roślin gryki zwyczajnej.

Na koniec chciałabym prosić Doktorantkę o rozwinięcie zagadnienia, **która z badanych przez Doktorantkę odmian może być polecana do dalszych modyfikacji cech użytkowych i dlaczego? Jakie metody są obecnie wykorzystywane najczęściej do uzyskiwania nowych odmian gryki i jakie narzędzia/techniki mogą przynieść największe i najszybsze korzyści w przyszłości? Czy takie badania są obecnie prowadzone na świecie?**

4. Podsumowanie

Wysoko oceniam wartość merytoryczną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, znaczenie podjętego problemu, sposób jego rozwiązania oraz wartość uzyskanych wyników. Praca wnosi nowe, istotne dla nauki odkrycia, które jednocześnie mogą znaleźć wykorzystanie w przyszłym doskonaleniu metod uprawy *Fagopyrum esculentum* i modyfikowaniu gryki w kierunku pozyskiwania roślin o nowych, ulepszonych cechach użytkowych. Pozytywnie oceniam również kompetencje Doktorantki i jej indywidualny wkład w rozwiązanie podjętego problemu. Niniejsza dysertacja dowodzi, że mgr inż. Marta Hornyák posiada umiejętność stawiania problemów badawczych, planowania badań, formułowania hipotez i celów badawczych, a także ich rozwiązywania i konfrontowania z wynikami badań uzyskanych przez innych badaczy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane tego typu pracom określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789). Uwzględniając obowiązujące przepisy prawne przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marty Hornyák do dalszych etapów przewodu doktorskiego, celem nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie nauki rolniczej w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

prof. dr hab. Anna Miłkuła