

Poznań, 10.04.2020

Prof. UPP dr hab. Tomasz Kleiber
Katedra Żywienia Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Zgorzelecka 4, 60-198 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Mariyi Halka pt.: "Wpływ jodu mineralnego, jodosalicylanów i jodobenzoesanów na wybrane biochemiczne i molekularne mechanizmy zachodzące w roślinach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.)"

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Sylwestra Smolenia, prof. UR z Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie, we współpracy z promotorem pomocniczym dr inż. Małgorzatą Czernicką z Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Mariyi Halka ma formę opracowania składającego się z 5 publikacji (z kopiami) stanowiącymi jednotematyczny cykl, w którym pierwszym autorem jest Doktorantka, sumaryczny IF wynosi 9,647, a punktacja wg MNiSW 215 pkt (wg wykazu). Udział Doktorantki w poszczególnych pracach wynosił od 35 do 55%. Prace te były pracami wieloautorskimi, zatem udział Doktorantki należy uznać na znaczący, dokumentujący zaangażowanie w prowadzone prace badawcze i przygotowanie manuskryptów. Na uwagę i podkreślenie zasługuje dotychczasowy bardzo duży dorobek naukowy Doktorantki, na który składa się współautorstwo: 5 pracy oryginalnych (w tym 1 w recenzji; oprócz prac stanowiących rozprawę doktorską) oraz 17 doniesień konferencyjnych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska traktuje o możliwości zastosowania różnych nośników jodu do biofortyfikacji pomidora w ten pierwiastek oraz ich wpływie na wybrane biochemiczne i molekularne mechanizmy zachodzące w roślinach. Struktura ocenianej pracy jest standardowa, zgodna z wymogami pisania rozpraw doktorskich. Wprowadzenie stanowi bardzo wartościowy przegląd literatury, podzielony na 5 podrozdziałów, w którym Doktorantka przedstawiła kwestie związane z biogeochemią jodu w przyrodzie, jego funkcjami w organizmie ludzi, źródłami jodu, problemem jego deficytu w diecie, jak również biofortyfikacją roślin w ten pierwiastek. Przedstawiła ponadto zagadnienia związane z funkcją i metabolizmem kwasu salicylowego w roślinie. Przegląd literatury stanowi doskonałe wprowadzenie do tematu rozprawy i aktualnego stanu wiedzy w przedmiotowym zakresie tematycznym rozprawy. Jest on przygotowany bardzo starannie, zawiera cytowania 106 pozycji literatury (wg wykazu).

W kolejny rozdziale Doktorantka syntetycznie przedstawiła cele pracy, którymi było określenie możliwości pobierania organicznych związków jodu (jodosalicylanów oraz jodobenzoesanów) przez rośliny pomidora w różnych stadiach rozwojowych: w fazie siewek, fazie uprawy rozsady (wzrostu wegetatywnego) oraz w okresie uprawy na miejscu stałym tj. od momentu posadzenia do owocowania. Nadrzędnym celem pracy było porównanie efektywności pobierania i akumulowania jodu po aplikacji organicznych związków jodu w postaci kwasu 5-jodosalicylowego (5-ISA), kwasu 3,5-dijodosalicylowego (3,5-diISA), kwasu 2-jodobenzooesowego (2-IBeA), kwasu 4-jodobenzooesowego (4-IBeA) i kwasu 2,3,5-trijodobenzooesowego (2,3,5-triIBeA), w porównaniu do form mineralnych: jodku potasu (KI) lub jodanu potasu (KIO₃). Celem było również określenie wpływu badanych związków na wzrost, rozwój, stan fizjologiczny oraz skład chemiczny roślin pomidora oraz sprawdzenie wpływu badanych związków na procesy metaboliczne tego pierwiastka oraz kwasu salicylowego. Cel ten realizowano poprzez analizę ekspresji wybranych genów zaangażowanych w szlaki metaboliczne jodu i kwasu salicylowego w roślinach.

Doktorantka sformułowała 3 hipotezy badawcze, które poddała weryfikacji. Zakładały one, iż:

- Dostępność oraz preferencje do pobierania jodu przez pomidora w dużej mierze zależą od formy chemicznej tego pierwiastka,
- Jod egzogeny w postaci organicznych związków: jodosalicylanów i jodobenzoesanów może być pobierany oraz akumulowany przez rośliny pomidora, jednakże w zależności od fazy rozwojowej rośliny mogą wykazywać one różną wrażliwość na te związki,
- Jodosalicylany oraz jodobenzoesy mogą być metabolizowane w szlakach typowych dla jodu (dotychczas poznanych jedynie w niewielkim stopniu dla mineralnych form jodu) oraz kwasu salicylowego w roślinach pomidora.

Doktorantka przedstawiła wreszcie 1-stonnicowy syntetyczny plan zrealizowanych badań, w którym podała liczbę doświadczeń, badane kombinacje oraz publikacje, w których zamieszczono wyniki – co ułatwia orientację w treści rozprawy.

Doktorantka/wraz z pozostałymi Współautorami wykorzystali nowoczesne metody badawcze, w pełni porównywalnymi do stosowanych w ośrodkach zagranicznych. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowoczesnej aparatury analityczno-pomiarowej do wykonania analiz laboratoryjnych. Powyższe znajduje potwierdzenie w opublikowaniu prac stanowiących rozprawę w renomowanych czasopismach naukowych.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. **Halka M.**, Smoleń S., Ledwożyw-Smoleń I., Sady W. 2019. *Comparison of effects of potassium iodide and iodosalicylates on the antioxidant potential and iodine accumulation in young tomato plants*. Journal of Plant Growth Regulation. **on line first**, punktacja MNiSW₂₀₁₉: 70, IF₂₀₁₉: 2,179; udział Doktorantki 50%,
2. **Halka M.**, Smoleń S., Ledwożyw-Smoleń I. 2019. *Antioxidant potential and iodine accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings as the effect of the*

application of three different iodobenzoates. Folia Horticulturae (manuskrypt w procesie ewaluacji); punktacja MNiSW₂₀₁₉: 20, IF₂₀₁₈: 0,532; udział Doktorantki 55%,

3. **Halka M.**, Klimek-Chodacka M., Smoleń S., Barański R., Ledwożyw- Smoleń I., Sady W. 2018. *Organic iodine supply affects tomato plants differently than inorganic iodine*. Physiologia Plantarum. 164(3): 290–306; punktacja MNiSW₂₀₁₈: 35; IF₂₀₁₈: 3,000; udział Doktorantki 35%,
4. **Halka M.**, Smoleń S., Ledwożyw-Smoleń I., Sady W. 2019. *Iodosalicylates and iodobenzoates supplied to tomato plants affect the antioxidative and sugar metabolism differently than potassium iodide*. Folia Horticulturae. 31(2): 385–400; punktacja MNiSW₂₀₁₉: 20; IF₂₀₁₈: 0,532; udział Doktorantki 50%,
5. **Halka M.**, Smoleń S., Czernicka M., Klimek-Chodacka M., Pitala J., Tutaj K. 2019. *Iodine biofortification thorough expression of HMT, SAMT and S3H genes in Solanum lycopersicum L.* Plant Physiology and Biochemistry. 144 (2019): 35–48; punktacja MNiSW₂₀₁₉: 70; IF₂₀₁₉: 3,404; udział Doktorantki 50%

W przekazanych do recenzji materiałach zamieszczono streszczenia prac składających się na rozprawę doktorską.

Celem pracy nr I było porównanie pobierania mineralnej formy jodu (KI), a także jodu organicznego – jodosalicylanów przez młode rośliny (od fazy siewek do fazy kilku liści właściwych). Badano jodek potasu /KI/, kwas 5-jodosalicylowy /5-ISA/; kwas 3,5-dijodosalicylowy /3,5-diISA/, a SA był obiektem porównawczym do jodosalicylanów. W badaniach nie wykazano negatywnego wpływu badanych związków na wzrost oraz rozwój roślin. Uzyskanie roślin o większej zawartości jodu, po aplikacji KI i obu jodosalicylanów świadczyło o tym, że badane związki mogą być pobierane przez rośliny już od wczesnych faz rozwojowych. W opinii Doktorantki/Współautorów jodosalicylany mogą być rozważane jako nośnik jodu do roślin przy opracowywaniu protokołów ich biofortyfikacji w jod.

Celem pracy nr II było porównanie pobierania oraz akumulacji jodu przez siewki po aplikacji jodobenzoasnow: kwasu 2-jodobenzoowego (2-IBeA), kwasu 4-jodobenzoowego (4-IBeA) i kwasu 2,3,5-trijodobenzoowego (2,3,5-triIBeA) w porównaniu do mineralnej formy KI oraz określenie wpływu związków na wzrost oraz potencjał antyoksydacyjny siewek. Badane związki jodu powodowały zwiększenie jego zawartości w liściach, pędach i korzeniach, a wzrost ten był wprost proporcjonalny do intensywności jego aplikowania. Wykazano, iż mineralna forma gromadzona była głównie w nadziemnej części roślin, a jodobenzoasany w systemie korzeniowym. Negatywnie na wzrost roślin wpłynął jedynie 4-IBeA (10, 25 i 50 μM I), a 2-IBeA powodował zwiększenie biomasy siewek. Wykazano, że aplikacja 2,3,5-triIBeA w stężeniu 5, 10, 25 μM I prowadziła do zwiększenia biomasy liści, ale zwłaszcza w najwyższym stężeniu 50 μM I, rośliny miały nieprawidłowy wzrost. Autorka/autorzy podają, iż badane związki wywierały istotny wpływ na zawartość AA oraz DHA. Stwierdzono, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych zależała od dawki oraz formy aplikowanego związku. Duży wzrost aktywności peroksydazy askorbinianowej (APX) (odpowiednio o 50 i 60% w relacji do kontroli) wykazano po aplikacji

KI. Jodobenzoesy powodowały obniżenie aktywności APX. Aplikacja 2-IBeA, 4-IBeA oraz 2,3,5-triIBeA powodowała obniżenie aktywności katalazy (CAT), a w przypadku KI na obniżenie aktywności tego enzymu wpłynęła jedynie dawka 25 μM I. Wykazano, iż zastosowanie mineralnej formy KI (5, 10 i 25 μM I), a także formy organicznej w postaci 2-IBeA znacznie obniżyło aktywność peroksydazy gwajakolowej (POX) w liściach. Reasumując na podstawie przedstawionych badań stwierdzono, iż stan fizjologiczny roślin, a także badane parametry były w dużej mierze zależne od formy i stężenia aplikowanego związku jodu.

Celem pracy nr III było porównanie efektywności pobierania oraz akumulacji jodu przez rośliny w fazie produkcji rozsady. Badania obejmowały aplikację mineralnej formy jodu w postaci KI oraz kilku aromatycznych związków organicznych jodu – jodosalicylanów oraz jodobenzoesanów. Celem badań było również sprawdzenie wpływu badanych związków na ekspresję wybranych genów związanych z metabolizmem jodu oraz kwasu salicylowego w roślinach. Wykazano, że działanie toksyczne miały jedynie 3,5-diISA (3,5-dijodosalicylowy) i 4-IBeA (kwas 4-jodobenzoesowy), a w mniejszym stopniu BeA (kwas benzoesowy). Wszystkie badane związki jodu powodowały wzrost jego zawartości w roślinach. Wykazano, że najefektywniej pobieraną i transportowaną do nadziemnych części roślin formą była mineralna KI, która w większej mierze gromadzona była w części nadziemnej. Po aplikacji jodosalicylanów i jodobenzoesanów jod w mniejszym stopniu był transportowany do nadziemnych części roślin i generalnie kumulował się w korzeniach. Stwierdzono, że gromadzenie jodu w liściach po aplikacji KI było odmienne w porównaniu do form organicznych tzn. prawie równomiernie akumulowała się we frakcji organelli i w ścianie komórkowej. W przypadku form organicznych dominowało wiązanie jodu z frakcją organelli komórkowych. Stwierdzono wzrost poziomu ekspresji genu *HMT* (odpowiadającego za metylację jodu) w liściach roślin traktowanych wyłącznie organicznymi związkami jodu. Nie wykazano wpływu badanych kombinacji na wzrost zawartości SA w liściach i korzeniach roślin. SA z rośliny może być ulatniany w procesie metylacji, zachodzącym z udziałem enzymu *SAMT*, a także być przekształcany do innych metabolitów. Stwierdzono ponadto wzrost ekspresji genu *SAMT* po traktowaniu roślin BeA, 3,5-diISA, 2-IBeA oraz 4-IBeA. Z kolei istotny w stosunku do kontroli wzrost poziomu ekspresji genu *S3H* stwierdzono jedynie po aplikacji 3,5-diISA, co prawdopodobnie wiąże się z mechanizmem obronnym przed hyperakumulacją tego związku lub produktów jego metabolizmu w roślinach.

Celem pracy nr IV było określenie wpływu nośników jodu w kontekście indeksu tolerancji oraz stanu fizjologicznego roślin opisanego m.in. zawartością cukrów rozpuszczalnych i związków fenolowych, a także aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Negatywny wpływ na wzrost oraz rozwój roślin wykazały jedynie 3,5-diISA oraz 4-IBeA. Badane związki jodu powodowały wzrost zawartości tego pierwiastka w roślinach. Najlepiej pobierana i łatwo transportowana do nadziemnych części roślin była forma jodkowa (KI). Jod aplikowany w postaci aromatycznych związków jodoorganicznych był w dużo mniejszym stopniu transportowany z korzeni do pędów i liści. Doktorantka/Współautorzy stwierdzili, iż porównując pomiędzy sobą korzenie i nadziemne części roślin należy zwrócić uwagę na zbliżoną zawartość jodu w systemie korzeniowym oraz nadziemnych częściach roślin traktowanych organicznymi związkami jodu. W przypadku KI większą zawartość jodu oznaczono w pędach oraz liściach niż w systemie korzeniowym roślin. Wykazano, iż aplikacja

testowanych związków nie miała wpływu na zawartość kwasu askorbinowego (AA) w liściach i korzeniach oraz kwasu dehydroaskorbinowego (DHA) w liściach. Wykazano ponadto istotny wpływ aplikowanych związków na zawartość DHA w korzeniach. Poszczególne związki jodu miały odmienny wpływ na aktywność enzymów w liściach i korzeniach, zatem można mówić o specyficznym działaniu poszczególnych związków niż ogólnym działaniu jodu jako pierwiastka. Doktorantka/Współautorzy wykazali ponadto istotny wzrost zawartości glukozy i fruktozy (ale nie sacharozy) w liściach roślin po aplikacji wszystkich związków jodoorganicznych. Testowane związki jodu nie wpłynęły na zawartość fenylopropanoidów, flawonoidów oraz antocyjanów w liściach pomidora. Praca ta jest jeszcze w trakcie procesu wydawniczego.

Celem pracy nr V było porównanie pobierania jodu po aplikacji mineralnych i organicznych jego związków przez rośliny będące w fazie owocowania. Aplikacja testowanych związków jodu odbywała się przez cały okres uprawy na miejscu stałym, bezpośrednio do podłoża (perlitu) w formie związków mineralnych KI oraz KIO_3 oraz organicznych jako jodosalicylany (kwas 5-jodosalicylowy /5-ISA/, kwas 3,5-dijodosalicylowy /3,5-diISA/) oraz jodobenzoesy (kwas 2-jodobenzoowy /2-IBeA/, 4-jodobenzoowy /4-IBeA/ i kwas 2,3,5-trijodobenzoowy /2,3,5-triIBeA/). Negatywny wpływ na wzrost i plonowanie roślin wykazano w przypadku aplikacji 2,3,5-triIBeA – związek ten należy do opisywanych w literaturze inhibitorów transportu auksyn. Jod, po aplikacji obu związków mineralnych, jak i organicznych pobierany był przez korzenie roślin oraz transportowany do nadziemnych, wegetatywnych części rośliny, a także do owoców. Wykazano, iż gromadzenie jodu w ogonkach liściowych i liściach, korzeniach i owocach było zależne od jego źródła. Reasumując badane związki mogą być wykorzystywane w procesie biofortyfikacji roślin pomidora w jod. Stwierdzono, że jod może być akumulowany w poszczególnych kompartmentach komórek roślinnych. W komórkach owoców był głównie gromadzony był w organellach komórkowych, następnie w ścianach komórkowych, a w najmniejszym stopniu we frakcji rozpuszczalnej komórek (cytozolu). Stwierdzono pobranie i akumulację aplikowanych egzogennych jodosalicylanów i jodobenzoesanów w liściach, korzeniach i owocach pomidora. Doktorantka/Współautorzy stwierdzili również ich obecność w roślinach kontrolnych, co świadczy że jodosalicylany i jodobenzoesy mogą być naturalnie syntetyzowane w roślinach pomidora. Stwierdzenie tego faktu jest ważnym osiągnięciem przeprowadzonego przez Doktorantkę cyklu badań. Przeprowadzono również analizę porównawczą zawartości jodosalicylanów i jodobenzoesanów w korzeniach, liściach i owocach pomidora z ich zawartością w korze wierzby (*Salix cortex*). Wykazano obecność wszystkich analizowanych związków w korze wierzby, a ich zawartość była większa niż u pomidora traktowanego SA, BeA i organicznymi związkami jodu. Związki jodu wywierały wpływ na ekspresję genu *HMT*, odpowiadającego za ułatnianie jodu z roślin do atmosfery w formie metylowanej. Aplikowane związki jodu miały również wpływ na metabolizm SA w roślinie. Egzogenne jodosalicylany i jodobenzoesy prawdopodobnie podlegały w roślinach (a zwłaszcza w korzeniach) procesom metabolizmu polegającym na dejodynacji, a następnie na metylacji SA lub syntezy pochodnych tego kwasu przez enzym kodowany przez gen *S3H*.

Wartościowe uzupełnienie cyklu monografii stanowią zamieszczone w przekazanych materiałach dane niepublikowane. Dokumentują one wpływ badanych związków jodu oraz samego SA i BeA na parametry jakościowe owoców, takie jak: zawartość suchej masy, likopenu, witaminy C, cukrów (fruktozy i glukozy), a także ekstraktu oraz kwasowości ogólnej. Mogą one z pewnością posłużyć jako dane do sporządzenia kolejnej wartościowej publikacji

Rozdziałem świadczącym o dużej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki jest Dyskusja (8 stron). Skonfrontowano w niej wyniki badań własnych z literaturą, w zakresie:

- Wpływu testowanych związków jodu na wzrost i rozwój roślin pomidora,
- Pobierania oraz akumulacji jodu przez rośliny pomidora w różnych stadiach rozwoju,
- Metabolizmu kwasu salicylowego po aplikacji związków jodu do roślin pomidora.

Osiągnięciem ocenianej rozprawy doktorskiej jest wykazanie, iż mineralne (KI i KIO₃) oraz organiczne związki jodu tj. jodosalicylany i jodobenzoesy mogą stanowić cenne źródło jodu w procesie biofortyfikacji pomidora w jod. Określono optymalną dawką związków jodoorganicznych (25 μM I) oraz termin ich aplikacji (uprawa na miejscu stałym od fazy kwitnienia do fazy owocowania). Wykazano, że najlepiej pobieraną i akumulowaną formą jodu w owocach pomidora był 2-IBeA. Na podstawie przeprowadzonych badań określono wreszcie, iż w procesie biofortyfikowania pomidora w jod unikać powinno się stosowania 2,3,5-triIBeA ze względu na jego negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin w każdej z testowanych faz rozwojowych rośliny. Co interesujące poznawczo, jak wyliczyła Doktorantka, spożycie 100 g owoców pomidora wzbogaconych w jod za pomocą 2-IBeA mogłoby pokryć ok. 37,5% RDA (*ang. recommended dietary allowance*). Z punktu widzenia praktycznego istotne jest wykazanie braku negatywnego wpływu jodu na parametry jakościowe owoców pomidora. Biofortyfikowane owoce mogą być dla konsumenta produktem wartościowym nie tylko ze względu na wyższą zawartość jodu, ale i możliwe szerzej pojmowane właściwości prozdrowotne, związane ze zwiększoną zawartością jodosalicylanów i jodobenzoesanów.

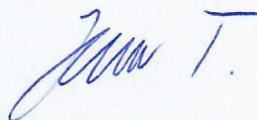
Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca stanowi wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Praca charakteryzuje się dużą wartością poznawczą i praktyczną w zakresie biofortyfikowania jodem pomidora.

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie wspomnianego problemu naukowego przy użyciu właściwie dobranej metodyki badawczej. Otrzymane wyniki wnoszą oryginalny wkład do rozwoju wiedzy z zakresu żywienia roślin, w szczególności poprawy wartości prozdrowotnej plonów pomidora. Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy, mają na uwadze zapisy Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r. (poz. 1789), stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska mgr Marii Halki pt. „Wpływ jodu

mineralnego, jodosalicylanów i jodobenzoesanów na wybrane biochemiczne i molekularne mechanizmy zachodzące w roślinach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.)” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marii Halka stosowną nagrodą. Uzasadnienie dla takiego wniosku stanowi wnikliwość podjętych badań, ich nowatorstwo – biorąc pod uwagę aspekt biochemiczny oraz molekularny – oraz znaczenie, zarówno naukowe jak i w szczególności aplikacyjne – w kontekście konieczności ograniczenia spożycia soli kuchennej. Poznanie możliwości biofortyfikowania jodem pomidora, z uwagi na wolumen spożycia owoców może mieć ważne znaczenie praktyczne i prozdrowotne dla konsumentów.



Prof. UPP dr hab. Tomasz Kleiber