UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Zakład Fizjologii Roślin

dr hab. Sławomir Borek, prof. UAM
Zakład Fizjologii Roślin
Wydział Biologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Ciak
pt. „Zmiany profilu wybranych metabolitów polarnych w kiełkujących nasionach i siewkach grochu (*Pisum sativum* L.) pod wpływem stresów abiotycznych"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Lesława Bernarda Lahuty
w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 18 grudnia 2020 r. informujące o powierzeniu mi obowiązków recenzenta wyżej wymienionej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Ciak przygotowana jest według klasycznego opracowania monograficznego. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz następujące rozdziały: Wstęp (3 strony), Przegląd literatury (19 stron), Cel pracy (1 strona), Materiał i metody (13 stron), Wyniki (62 strony), Dyskusja (24 strony), Wnioski (1 strona) i Spis literatury (473 pozycje). Integralną częścią rozprawy jest Aneks (75 stron). Łącznie rozprawa doktorska, wraz z Aneksem, liczy 249 stron i zawiera: 7 Tablic, 66 Tabel (w tym 65 numerowanych i 1 nienumerowana), 1 Schemat i 39 Rycin. W rozprawie zamieszczono informację o częściowym finansowaniu badań ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach Programu Wieloletniego (2016-2020) pt. „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju" (Uchwała Rady Ministrów z 15 grudnia 2015 r.) oraz ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu „Zaawansowane biokompozyty dla gospodarki jutra BIOG-NET" realizowanego w programie TEAM NET.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html

Rozprawa doktorska mgr Moniki Ciak dotyczy aktualnych i szeroko badanych na świecie zagadnień dotyczących reakcji roślin na różne czynniki stresowe. Tego rodzaju badania mają bardzo duże znaczenie, gdyż oprócz zdobywania nowej wiedzy dotyczącej funkcjonowania organizmów roślinnych, pozwalają też skuteczniej tworzyć nowe odmiany roślin uprawnych, które cechują się nie tylko lepszymi ilościowymi i jakościowymi parametrami plonowania, ale pozwalają też na wykorzystanie nowych terenów dotychczas nienadających się pod uprawy ze względu na zbyt duże nasilenie czynników stresowych. Doktorantka do swoich badań wybrała kiełkujące nasiona i siewki rośliny uprawnej jaką jest groch (*Pisum sativum* L.), a głównym podejściem metodycznym w badaniach były analizy metabolomiczne, a dokładniej, zmiany w profilach metabolicznych związków polarnych. W celu określenia zmian w metabolomie organów nasion suchych, spęczniałych i kiełkujących, oraz w organach siewek grochu zastosowana została chromatografia gazowa (GC-FID) i chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS). Tego rodzaju podejście metodyczne można wykorzystać do opisu stanu organizmu zarówno podczas normalnego wzrostu i rozwoju, jak i w warunkach odziaływania szerokiego spektrum czynników stresowych. Doktorantka w swoich badaniach skupiła się na określeniu zmian w profilach metabolicznych nasion i siewek grochu w warunkach deficytu wody, stresu osmotycznego, niskiej temperatury, oraz oddziaływana nanocząstek i jonów srebra. Oprócz zmian w podstawowych parametrach wzrostowych kiełkujących nasion i siewek grochu i zmian w metabolomie w trakcie działania czynników stresowych, badania objęły też procesy regeneracji zachodzące po ustąpieniu czynników stresowych, a w niektórych doświadczeniach ten aspekt rozbudowany był o cykliczne aplikowanie czynnika stresowego i badanie procesu regeneracji. Uważam, że zaprezentowane w rozprawie doktorskiej mgr Moniki Ciak wyniki są nowatorskie i wartościowe. Na szczególną uwagę zasługują te, które dotyczą zmian zachodzących w profilach metabolicznych po ustąpieniu czynników stresowych, gdyż tego rodzaju danych w literaturze fachowej jest wyraźnie mniej niż tych dotyczących reakcji roślin w trakcie działania czynnika stresowego. Wszystkie wyniki uzyskane przez Doktorantkę wzbogacają wiedzę z zakresu reakcji grochu zwyczajnego zarówno podczas działania jak i po ustąpieniu abiotycznych czynników stresowych i mają one duży potencjał publikacyjny.

Pierwszym rozdziałem rozprawy doktorskiej mgr Moniki Ciak jest Wstęp. W rozdziale tym Doktorantka krótko, ale treściwie, zarysowała utylitarny problem związany z deficytem białka roślinnego we współczesnej hodowli zwierząt i rosnącymi wymaganiami dotyczącymi ilości i jakości żywności dla człowieka. Autorka wskazuje na rośliny bobowate, w tym groch, które wraz z upowszechnieniem ich uprawy z powodzeniem mogłyby być bardzo dobrym źródłem białka roślinnego do produkcji zarówno paszy dla zwierząt jak i żywności dla człowieka. 2

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html

Rozdział kończy się ogólnym zarysowaniem i uzasadnieniem celów badawczych. Następny rozdział – Przegląd literatury – zawiera szczegółowe dane opisujące groch nie tylko w ujęciu botanicznym, ale przede wszystkim w aspekcie użytkowym. Szczegółowo opisana jest wartość odżywcza i prozdrowotna nasion grochu oraz wady i zalety grochu jako rośliny uprawnej. Szczegółowo opisane są też reakcje grochu na działanie wybranych biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. Rozdział ten kończy się informacjami dotyczącymi zmian w metabolomie roślin spowodowanymi różnymi czynnikami stresowymi. Uważam, że zarówno Wstęp jak i Przegląd literatury napisane są w sposób profesjonalny. Dane zawarte w tych rozdziałach są przedstawione w sposób bardzo zwięzły i zrozumiały. Oba rozdziały stanowią bardzo dobre wprowadzenie do badań, które zostały opisane w rozprawie i w niebudzący wątpliwości sposób wspierają jasno sformułowane cele badań zawarte w trzecim rozdziale jakim jest 1-stronicowy Cel pracy.

Czwarty rozdział rozprawy doktorskiej mgr Moniki Ciak opisuje materiały i metody wykorzystane w badaniach. Niestety, rozdział ten pod względem jakości przekazu treści nie dorównuje trzem poprzednim. Opis eksperymentów i technik badawczych nie jest wystarczająco szczegółowy i precyzyjny, oraz zawiera błędy. Przykładem nieprawidłowości może być powoływanie się na Tab. 1 na stronie 41. Stosowanie skrótu Tab. nie jest odpowiednie, gdyż rozprawa zawiera zarówno tabele jak i tablice, zatem taki skrót nie jest jednoznaczny. Dopiero w dalszej części rozprawy można jednoznacznie się zorientować, że skrót Tab. dotyczy tabel. Pomijając jednak niejednoznaczność tego skrótu, to odwoływanie się do Tab. 1 na stronie 41 jest błędne, bo ani Tabela 1 ani Tablica 1 nie zawierają danych do których odnośnik Tab. 1 miałby kierować. W tym samym podrozdziale Autorka rozprawy odwołuje się do opisu eksperymentu 2.2, ale w pracy nie ma takiego opisu. Dodam, że nie ma też opisu eksperymentu 2.1 (skoro powinien być 2.2). Innym mankamentem rozdziału Materiał i metody jest niewystarczający opis warunków wzrostu siewek. Nie wiadomo np. jakie było natężenie światła, lub czy siewki rosły w pokoju hodowlanym, fitotronie, czy może jeszcze w jakimś innym urządzeniu. Na stronie 44 zamieszczono schemat ilustrujący przebieg eksperymentu w którym badano wpływ niskiej temperatury na zmiany w profilach metabolicznych. Schemat ten jest niezastąpiony w zrozumieniu układu eksperymentalnego. Niestety przebieg pozostałych eksperymentów nie został już przedstawiony w formie graficznej, a tym samym utrudnia to zrozumienie układów eksperymentalnych i przebiegu badań. Na stronie 45 znajduje się tabela, która nie ma ani numeru, ani nagłówka. Kończąc wymienianie niedociągnięć rozdziału Materiał i metody wskażę jeszcze na podrozdziały opisujące wykonanie analiz chromatograficznych. W opisach zawarte są informacje o objętościach odczynników, jakie były stosowane podczas przygotowywania prób do rozdziałów chromatograficznych, ale nie ma informacji o ich stężeniach (np. podana jest objętość roztworów jonowymieniaczy, ale nie wiadomo jakie były ich stężenia/ilości).

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html

Kolejnym rozdziałem są Wyniki. Rozdział ten zawiera bardzo obszerny zestaw uzyskanych przez Doktorantkę danych, ale nie są to wszystkie wyniki badań, gdyż równie obszerny pakiet danych zawarty jest w Aneksie, do którego w rozdziale Wyniki znajdują się liczne odwołania. Łącznie, wszystkie uzyskane przez Doktorantkę rezultaty badań zamieszczone w rozdziale Wyniki i w Aneksie zaprezentowane są w formie 60 Tabel, 5 Tablic i 39 Rycin. Uzyskane wyniki, oprócz zaprezentowania ich w tabelach oraz na tablicach i rycinach, zostały precyzyjnie opisane, a dodatkowo, w większości podrozdziałów składających się na rozdział Wyniki, znajdują się *podsumowania*, które znacznie ułatwiają przeanalizowanie i przyswojenie ogromnej ilości danych. Uważam, że rozdział Wyniki, wraz z Aneksem, jest najbardziej wartościową częścią rozprawy doktorskiej mgr Moniki Ciak. Patrząc łącznie na oba rozdziały należy wyrazić uznanie dla Doktorantki za ogrom pracy, jaki Doktorantka włożyła w uzyskanie, opracowanie, przeanalizowanie i zaprezentowanie wyników swoich badań. Rozdziały te stanowią swoistą bazę danych, która jest nie tylko podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej, ale zapewne będzie ona też bardzo ważna dla planowania kolejnych badań.

Pomimo mojego uznania dla dużej wartości i obszerności uzyskanych przez Doktorantkę wyników, zmuszony jestem zwrócić uwagę na kilka niejasności, czy nieprawidłowości, jakie dostrzegam w rozdziale Wyniki. Po pierwsze, poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego uzyskane wyniki analizowane były statystycznie z wykorzystaniem testu Tuckey'a, ale też testu *t*-Studenta? Dlaczego wszystkie dane nie były analizowane z zastosowaniem tylko testu Tuckey'a? Dlaczego niektóre dane były analizowane podwójnie, tj. z wykorzystaniem zarówno testu Tuckey'a i testu *t*-Studenta? Taka podwójna analiza zawarta jest na Rycinie 1, 3, 4 i 5, oraz 34 i 35. Moje wątpliwości budzi też analiza statystyczna, której wyniki zaprezentowane są na Rycinach od 24 do 28. Z grafik wynika, że stosując test *t*-Studenta identyfikowano statystyczną istotność różnic dla dwóch zestawów po trzy średnie jednocześnie, podczas gdy test *t*-Studenta pozwala na porównacie tylko jednej pary średnich, a nie trzech jednocześnie.

Moja druga uwaga dotycząca nieprawidłowości jakie dostrzegam w rozdziale Wyniki dotyczy rezultatów badań mających na celu określenie wpływu jonów srebra na podstawowe parametry morfologiczne i profile metaboliczne kiełkujących nasion grochu. Doktorantka w tych badaniach zastosowała w różnych stężeniach azotan srebra. Uważam, że wybór soli azotanowej nie był właściwy. Wprawdzie sole mineralne nie wywierają istotnego wpływu na proces kiełkowania nasion *sensu stricto*, czyli do momentu przebicia okrywy nasiennej przez rosnący korzeń osi zarodkowej, ale azotany są wyjątkiem. Mogą one bowiem stymulować kiełkowanie nasion. Ponadto zawarty w azotanie srebra azot, jako jeden z podstawowych pierwiastków biogennych może pomniejszać negatywny efekt srebra, jaki Doktorantka zaobserwowała w swoich

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html

badaniach. Z drugiej strony, trzeba też mieć na uwadze fakt, że niektóre gatunki roślin, w tym należące do rodziny bobowatych, nie transportują efektywnie pobieranych z podłoża jonów azotanowych do części nadziemnych, lecz kumulują je w korzeniach. Taka kumulacja azotanów może wywołać negatywny efekt na wzrost i rozwój korzeni wynikający z „przedawkowania" jonów i w takich okolicznościach obserwowany negatywny efekt, i w całości przypisywany jonom srebra, może być skutkiem oddziaływania dwóch czynników stresowych. Kolejnym argumentem, przemawiającym za zrewidowaniem omawianego układu eksperymentalnego jest fakt, że azotan uważany jest za molekułę sygnalną modulującą ekspresję genów, reakcje fizjologiczne, wzrostowe i rozwojowe przez całe życie rośliny. Moje powyższe uwagi przybierają na znaczeniu w odniesieniu do doświadczeń, w których nasiona pozbawione były okrywy nasiennej, a tym samym uboczny efekt odziaływania jonów azotanowych zapewne mógł być intensywniejszy, powodując że obraz oddziaływania jonów srebra mógł być bardziej zakłamany. Zestaw wyników, dotyczących odziaływania jonów srebra, w rozprawie doktorskiej mgr Moniki Ciak nie jest jednak obszerny i ma raczej charakter badań pilotażowych, dlatego moje powyższe uwagi dotyczące zastosowania soli azotanowej nie mają kluczowego znaczenia dla oceny całości zaprezentowanych wyników. Aczkolwiek, planując kolejne badania należy zmodyfikować protokoły eksperymentów. Problem związany z zastosowaniem soli azotanowej można w łatwy sposób zlikwidować, zarówno w odniesieniu do uzyskanych już wyników, jak i do ewentualnych przyszłych badań. Nie będę jednak prezentować tego rozwiązania w niniejszej recenzji, lecz poproszę Doktorantkę o zaproponowanie układu doświadczalnego, który byłby pozbawiony omawianej wady.

W Dyskusji Doktorantka podjęła się trudnego zadania jakim było zinterpretowanie i skonfrontowanie swoich danych z danymi literaturowymi. W rozdziale tym sformułowane jest wiele sugestii i przypuszczeń, ale na tym etapie badań trudno o jednoznaczne stwierdzenia. Patrząc jednak na dyskusję uzyskanych wyników i mając w pamięci 473 pozycje literaturowe zacytowane w całej rozprawie doktorskiej można być pewnym, że mgr Monika Ciak ma szeroką wiedzę z zakresu metabolomiki organizmów roślinnych. Po przeczytaniu rozdziału Wnioski odczuwam jednak pewien niedosyt. Dotyczy on zarówno braku usystematyzowania wniosków, jak i sposobu ich sformułowania. We Wnioskach nie dostrzegam bowiem jednoznacznego podsumowania dotyczącego mechanizmów warunkujących odporność grochu na działanie badanych czynników stresowych, a taki zamiar został sformułowany w rozdziale Cel pracy (strona 37). Poproszę zatem Doktorantkę o dokonanie takiego podsumowania podczas obrony rozprawy doktorskiej w odniesieniu do wybranego przez siebie czynnika stresowego.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Zakład Fizjologii Roślin

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem jeszcze zwrócić uwagę na używanie terminu „stres" i „czynnik stresowy". Doktorantka używa te dwa terminy w sposób dowolny. Niestety nie jest to prawidłowe, gdyż w języku polskim istnieje wyraźne rozgraniczenie między „stresem", czyli stanem w jakim znajduje się organizm, a „czynnikiem stresowym" wywołującym ten stan. Używanie terminu stres dla określenia czynnika stresowego uważam za błędne.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Moniki Ciak oceniam wysoko, a sformułowane w mojej recenzji uwagi, zastrzeżenia czy pytania nie dyskredytują wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, lecz są przyczynkiem do naukowej dyskusji, która zapewne odbędzie się podczas publicznej obrony ocenianej pracy. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Ciak spełnia ustawowe wymogi określone dla prac doktorskich w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.), stanowiąc bardzo ważną pozycję w badaniach identyfikujących zmiany w metabolomie grochu zarówno w trakcie działania, jak i podczas regeneracji, czyli po ustąpieniu wybranych abiotycznych czynników stresowych. Wnoszę tym samym do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Moniki Ciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sławomir Borek

Poznań, 24 stycznia 2021 r.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 58 87, fax. +48 61 829 58 87
biologia@amu.edu.pl
http://ibedyr.home.amu.edu.pl/ZFR/public_html/index.html