Poznań, 03.02.2021 r.

Prof. dr hab. Iwona Morkunas
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

Ocena pracy doktorskiej mgr Moniki Ciak
pt. „Zmiany profilu wybranych metabolitów polarnych w kiełkujących nasionach i siewkach grochu (*Pisum sativum* L.) pod wpływem stresów abiotycznych"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Ciak została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Lesława Bernarda Lahuty z Katedry Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Recenzowana praca dotyczy zmian metabolomicznych grochu (*Pisum sativum* L.) w fazie kiełkowania nasion jak i wzrostu siewki w odpowiedzi na różne abiotyczne czynniki stresowe, tj. desykację, glikol polietylenowy (PEG8000), niską temperaturę oraz nanocząsteczki i jony srebra. W prezentowanej pracy Doktorantka wykorzystując techniki chromatograficzne takie jak chromatografię gazową z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) i chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS) określiła zmiany profilu i zawartości metabolitów pierwotnych, tj. węglowodanów, kwasów organicznych i aminokwasów w organach kiełkujących nasion i siewek różnych odmian grochu, zarówno jadalnych jak i pastewnych. W celu zrozumienia całokształtu zmian w profilu jak i zawartości metabolitów polarnych będących efektem oddziaływania różnych abiotycznych stresów, w badaniach wykorzystano materiał roślinny, który był poddany wpływowi czynnika stresowego tylko przez kilka godzin jak i w dłuższym okresie czasu, tj. przez kilka dni. Ponadto Doktorantka analizowała zmiany w metabolomie po ustąpieniu stresu, kiedy obserwowano wzrost siewek grochu.

Tematyka badań niniejszej rozprawy doktorskiej jest kontynuacją badań od wielu lat realizowanych pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Lesława Bernarda Lahuty. Badania prowadzone przez Doktorantkę zostały częściowo sfinansowane w ramach Programu wieloletniego (2016-2020), pt. „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju" (Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Uchwała Rady Ministrów z 15.12. 2015r.) oraz w ramach projektu „Zaawansowane

biokompozyty dla gospodarki jutra BIOG-NET", realizowanego w ramach programu TEAM NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Oceniana rozprawa doktorska jest opracowana zgodnie z wymogami i zwyczajami obowiązującymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych, obejmuje bowiem w kolejności: Streszczenie w języku polskim i angielskim (3 strony), Wykaz stosowanych w pracy skrótów, Wstęp (3 strony), Przegląd literatury (19 stron), Cel pracy (strona), Materiał i metody (12.5 strony), Wyniki (62 strony), Dyskusja (24 stron), Wnioski (strona), Spis literatury (około 400 cytowanych artykułów literatury światowej) i Aneks (obejmujący 2 tablice, 4 ryciny i 52 tabele uzupełniające wyniki). Praca jest bardzo obszerna i w całości liczy 206 stron. Opis poszczególnych podrozdziałów zarówno w rozdziale Materiał i metody, Wyniki oraz w rozdziale Dyskusja jest przejrzysty i logiczny, co sprawia, że czytający nie ma problemu ze śledzeniem i analizą treści. Ponadto praca napisana jest jasnym i zrozumiałym językiem.

Nadrzędny cel pracy został przez Doktorantkę sformułowany na stronie 37 rozprawy, cytuję:

„Celem pracy było poznanie zmian w profilu metabolitów polarnych w kiełkujących nasionach i siewkach grochu podczas i po ustąpieniu działania wytypowanych abiotycznych czynników stresowych: odwadniania tkanek, stresu osmotycznego, niskiej temperatury oraz nanocząstek i jonów srebra." Ponadto Doktorantka donosi, że w pracy zrealizowała siedem zadań badawczych, cytuję:

„1. Charakterystyka składu i zawartości metabolitów polarnych w nasionach grochu

2. Rola oligosacharydów rodziny rafinozy (ORR) i sacharozy w utrzymywaniu tolerancji zarodka na desykację podczas imbibicji nasion

3. Zmiany w profilu metabolicznym osi zarodkowej i liścieni podczas kiełkowania nasion i rozwoju siewki

4. Wpływ desykacji na profil metaboliczny kiełkujących nasion i siewek

5. Określenie zmian w profilu metabolicznym siewek podczas stresu osmotycznego

6. Określenie zmian w profilu metabolicznym siewek podczas stresu chłodu

7. Poznanie wpływu nanocząstek i jonów srebra na kiełkowanie nasion oraz profil metaboliczny zarodka i siewki"

W mojej opinii Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitne cele i wiele zadań do realizacji. Temat i cel ocenianej pracy doktorskiej dotyczą metabolomiki, a zatem mieszczą się, w moim przekonaniu, w niezwykle ważnym i interesującym kierunku badawczym, którego intensywny rozwój obserwuje się w ostatniej dekadzie. Ponadto dane metabolomiczne otrzymane w ramach dysertacji wraz z innymi wynikami mogą przyczynić się do holistycznej oceny procesów molekularnych charakterystycznych dla stanu zarówno fizjologicznego jak i w warunkach oddziaływania odpowiedniego abiotycznego czynnika stresowego. Jednak uważam, że wnioskowanie przez

Doktorantkę o odporności kiełkujących nasion i siewek na działanie czynników stresowych, na podstawie tylko wyników obejmujących metabolity pierwotne oznaczone w niniejszej pracy, w mojej ocenie jest zbyt daleko posunięte. Poniżej cytuję „Wykrycie podobieństw i różnic, na poziomie metabolomu, w reakcji kiełkujących nasion i siewek grochu na działanie powyższych abiotycznych czynników stresowych, może przyczynić się do pełniejszego wyjaśnienia mechanizmów warunkujących odporność grochu na stresy w najwcześniejszych etapach rozwoju rośliny, jak też zidentyfikować metaboliczne markery jej reakcji i odporności na stresy."

Ocena Przeglądu literatury

Treści części teoretycznej (Przeglądu literatury) są ściśle podporządkowane tematowi i celowi pracy doktorskiej. Autorka na podstawie aktualnej literatury przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy dotyczący klasyfikacji botanicznej i pochodzenia, odmian użytkowch grochu zwyczajnego, wartości odżywczej i prozdrowotnej nasion grochu, zagrożeń w uprawie grochu związanych z oddziaływaniem stresów abiotycznych i biotycznych, fizjologicznych reakcji grochu na stresy abiotyczne, reakcji kiełkujących nasion i siewek grochu na abiotyczne czynniki stresowe, scharakteryzowała metabolity gromadzone w grochu w reakcji na stresy abiotyczne i rośliny transgeniczne o podwyższonej zawartości osmolitów/osmoprotektantów oraz przedstawiła metabolomikę stresu. Należy podkreślić, że w Przeglądzie literatury, we wszystkich podrozdziałach, w tym także w podrozdziale metabolity gromadzone w grochu w reakcji na stresy abiotyczne, Doktorantka zamieściła najnowsze dane i cytowała publikacje z ostatnich kilku lat, co może wskazywać, że podjęty temat badawczy i nakreślone cele należy uznać za ważne i interesujące.

Materiały i Metody

Początkowo obiektem badań było dziesięć odmian nasion grochu obejmujących odmiany jadalne, pastewne i warzywne. Do dalszych eksperymentów Doktorantka wytypowała dwie ogólnoużytkowe odmiany grochu, tj. 'Wenus' i 'Cud Kelwedonu', różniące się zawartością sacharozy i poziomem oligosacharydów rodziny rafinozy (ORR). Odmiany te różniły się znacząco zawartością sacharozy i ORR oraz odpornością na cykliczne uwadnianie/odwadnianie tkanek.

Z opisu zaplanowanych eksperymentów wynika, że całość planowanych doświadczeń była przemyślana. Ponadto zastosowane metody i opis wyników przedstawiony w następnym rozdziale (Wyniki), na stronach 53-114, pokazują duży wkład pracy Doktorantki. Mam świadomość, że Doktorantka musiała niewątpliwie korzystać z wiedzy i pomocy Pana Prof. Lesława Bernharda Lahuty, który od wielu lat zajmuje się zmianami w metabolomie i proteomie kiełkujących nasion i siewek wybranych gatunków roślin uprawnych w odpowiedzi na stresy abiotyczne.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozdział wyniki także zasługuje na bardzo pozytywną ocenę. Na ponad 62 stronach rozprawy Doktorantka szczegółowo przedstawia rezultaty wykonanych przez siebie analiz z wykorzystaniem technik chromatograficznych, tj. GC-FID i GC-MS. Nie sposób w zwięzłej recenzji przedstawić i skomentować wszystkie uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Przykładowo tylko, Doktorantka wykazała, że desykacja kiełkujących nasion i rozwijających się siewek istotnie zmieniła profil metaboliczny tkanek. Zasadniczy kierunek przemian cukrowców podczas kiełkowania nasion polegał na rozkładzie ORR i wzroście zawartości sacharozy we wszystkich tkankach oraz monosacharydów. Wykazała, że desykacja zmieniła również profil aminokwasów i kwasów organicznych we wszystkich tkankach siewki – nastąpił gwałtowny przyrost zawartości homoseryny i proliny, przy spadku poziomu kwasów cytrynowego i jabłkowego. Najbardziej interesującymi w mojej ocenie są wyniki dotyczące wpływu nanocząstek i jonów srebra na kiełkowanie nasion i profil metaboliczny zarodka. Autorka, analizując wpływ nanocząstek srebra (AgNCz) na proces kiełkowania nasion wykazała, że imbibicja w roztworze AgNCz nie wpłynęła istotnie na ich zdolność do kiełkowania. Z kolei podwyższenie stężenia roztworu azotanu srebra ($AgNO_3$) istotnie osłabiło wzrost korzenia, natomiast hamowanie wzrostu epikotyla stwierdzono dopiero po czterokrotnym podwyższeniu stężenia roztworu. Badając także wpływ obecności lub braku okrywy nasiennej na rozwój zarodka w odpowiedzi na $Ag(NO)_3$ wykazano, że nasiona traciły zdolność do kiełkowania i jony srebra osłabiały gromadzenie sacharydów. Jednocześnie mgr Monika Ciak udowodniła, że organy gromadziły znacznie mniej aminokwasów białkowych i homoseryny oraz kwasów organicznych pod wpływem azotanu srebra.

Uważam, że otrzymane wyniki badań z pewnością wnoszą nowe informacje do fizjologii roślin dotyczące fazy kiełkowania nasion grochu w warunkach stresów abiotycznych.

Na podstawie wyżej wspomnianych przeze mnie wyników badań, które Doktorantka przedstawiła w dysertacji na docenienie zasługują także jasno sprecyzowane wnioski, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Na przykad analizując wrażliwość organów grochu na desykację i stres osmotyczny, Doktorantka wykazała wzrost tej wrażliwości wraz z zakończeniem procesu kiełkowania nasion i rozwojem siewki. Ponadto wskazuje, że siewki grochu są w stanie przetrwać przymrozek tylko po uprzedniej kilkudniowej aklimatyzacji do chłodu . W mojej opinii interesującą była także konkluzja dotycząca wpływu nanocząsteczek i jonów srebra. Doktorantka wykazała, że siewki grochu pokazują znaczną odporność na nanocząstki i jony srebra. Wykazała, że srebro podane w formie jonowej (Ag^+) i w podwyższonych stężeniach (> 250 μg/ml) hamowało proces kiełkowania nasion i zakłócało metabolizm azotowy siewek. W mojej opinii badania z zastosowaniem nanocząsteczek i jonów srebra są niezwykle interesujące i nowatorskie. Ponadto przeprowadzona

przez Doktorantkę analiza metabolitów polarnych pozwoliła na stwierdzenie, że zmiany w zawartości poszczególnych metabolitów zależą od rodzaju i natężenia działającego czynnika stresowego. Dowiodła, że większe zmiany w profilu metabolicznym zachodzą pod wpływem desykacji i stresu osmotycznego niż chłodu, który może obniżać tempo metabolizmu. Z kolei aktywność nanocząsteczek/jonów srebra prawdopodobnie wiąże się z hamowaniem aktywności enzymów. Udowodniła także, że zastosowane czynniki stresowe o różnym natężeniu powodują zmiany w profilu metabolicznym, głównie węglowodanów rozpuszczalnych i aminokwasów. Dodatkowo ważnym wnioskiem było wykazanie, że oligosacharydy rodziny rafinozy, gromadzone podczas dojrzewania nasion grochu są pierwotnym materiałem zapasowym, zużywanym już podczas imbibicji i kiełkowania nasion i ich zawartość w suchych nasionach nie determinuje odporności zarodka na desykację. Na podstawie otrzymanych wyników badań Doktorantka wnioskuje, że sacharoza, prolina i homoseryna mogą być związkami ochronnymi, gromadzonymi w siewkach grochu podczas reakcji na stresy abiotyczne.

W zakończeniu mojej pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Ciak chciałabym jeszcze raz docenić treści i sposób napisania poszczególnych rozdziałów, w tym także Dyskusji, co świadczy że Doktorantka przeanalizowała wiele publikacji naukowych (aż 400 prac) dotyczących problematyki badawczej.

Mam tylko kilka uwag/pytań dotyczących treści jak i zaprojektowania doświadczeń w ramach niniejszej pracy:

- Doktorantka zajmowała się fazą kiełkowania nasion i wczesnego rozwoju siewki, a zatem nie jest to faza rozwoju wegetatywnego. W tekście jest napisane cytuję „W prezentowanej pracy podjęto próbę określenia w jaki sposób zmienia się profil metaboliczny tkanek w najwcześniejszych etapach wegetatywnego wzrostu grochu – podczas imbibicji i kiełkowania nasion oraz początkowego wzrostu siewek”?

- Dlaczego w tekście używano określenia „ krytyczna faza rozwojowa roślin”?, faza kiełkowania nasion i wzrostu siewki jest aktywnie metaboliczną i ważną fazą podczas rozwoju ontogenetycznego, która obejmuje fazę heterotroficzną i autotroficzną, zatem dlaczego krytyczna?

- Zastosowano szereg różnych stresów abiotycznych, co było ideą zastosowania tak szerokiego spektrum czynników stresowych?, być może należało skupić się na mniejszej liczbie stresów i w większym stopniu wyniki badań poddać analizie statystycznej, tj. wykonać analizę głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA), wykonać korelacje statystyczne, np. korelacja r-Pearsona, tak aby wychwycić czy zachodzi związek pomiędzy badanymi zmiennymi

-Wyjaśnienie symboli używanych na wykresach powinno być wyjaśnione także w podpisie przynajmniej pierwszej ryciny, jest to niezbędne i ważne dla czytającego

Wnioski ogólne

Uważam, że koncentrowanie się na tak dużej liczbie abiotycznych stresów i ich oddziaływaniu na metabolom grochu wymagało od Pani mgr Moniki Ciak wielkiego nakładu pracy, biorąc pod uwagę samo przygotowanie materiału roślinnego, właściwe wprowadzenie czynnika stresowego, następnie precyzyjne przygotowanie prób do badań i przeprowadzenie analiz stosując GC-FID i GC-MS, później analizę całości danych i opracowanie statystyczne wyników. Ponadto mogę z przyjemnością stwierdzić, że Pani mgr Monika Ciak w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanowała bardzo bogaty warsztat badawczy, który umożliwi Jej kontynuację pracy naukowej w laboratoriach o profilu biochemicznym.

Wnioski końcowe

W podsumowaniu rozprawa doktorska mgr Moniki Ciak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymogi formalne na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), jak również stosowne zapisy ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawiane rozprawom doktorskim.

Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Moniki Ciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę duży nakład pracy Doktorantki w otrzymanie wyników badań w ramach przeprowadzonych analiz metabolomicznych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

I. Morkunas

Prof. dr hab. Iwona Morkunas