

Prof. dr hab. Paweł Sowiński  
Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin  
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin  
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
02-096 Warszawa, Miecznikowa 1



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Danuty Kusaka pt. „Funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego rzodkiewki (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) uprawianej w warunkach niedoboru wybranych składników mineralnych”.**

Recenzja została sporządzona w związku z pismem z dn. 03.07.2020 r. podpisanym przez prof. dr hab. Agnieszkę Gniazdowską-Piekarską, Dyrektora Instytutu Biologii SGGW o powołaniu mnie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie.

Wzrost i rozwój roślin podlegają licznym ograniczeniom ze strony środowiska, szczególnie w sytuacji, gdy natężenie czynnika niekorzystnego jest na tyle duże, że powoduje zaburzenia struktury lub funkcji organizmu, a więc stres. Jednym z ważnych czynników stresowych jest deficyt mineralny. Już niewielki, ale przedłużający się niedobór niektórych składników mineralnych w podłożu może powodować zaburzenia w metabolizmie roślin. Problem ten ma wymiar poznawczy, gdyż dotyczy podstaw fizjologii stresu roślin, a także aplikacyjny, gdyż deficyt mineralny może prowadzić do obniżenia plonu. Tematyce tej jest poświęcona rozprawa doktorska, której autorką jest mgr inż. Magdalena Kusaka. Praca powstała pod opieką naukową prof. dr hab. Mohameda Hazema Kalaji oraz promotor pomocniczej dr hab. Katarzyny Kowalczyk.

Uwagi formalne

Rozprawa została przedstawiona jako omówienie trzech artykułów oryginalnych. Rozprawa zawiera sześć głównych rozdziałów: Wstęp, Przegląd literatury, Materiały i metody, Omówienie i dyskusja wyników, Podsumowanie oraz Literatura. Całość jest poprzedzona streszczeniem w formie polskojęzycznej i angielskojęzycznej. Dwa z trzech artykułów,

których wyniki weszły w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w pismach średniej klasy (70 pkt) wymienionych w Wykazie czasopism MNiSzW (Plant Physiology and Biochemistry oraz Photosynthetica), a więc spełniają wymogi ustawy (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Art. 187). Trzeci artykuł, jako jeszcze nieopublikowany (dopiero złożony do druku), nie spełnia tego wymogu. Niemniej opis metodyki i załączone wyniki umożliwiły mi objęcie tej pracy recenzją.

Dwie opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy są wieloautorskie. przy czym w obu Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednym również korespondencyjnym. Ponadto do rozprawy dołączono oświadczenia autorów o ich udziale w powstaniu poszczególnych artykułów, przy czym określono, jaki był charakter ich wkładu i udział procentowy. Z oświadczeń wynika, że rola Doktorantki przy powstaniu artykułów była wiodąca. Również w trzecim, nieopublikowanym artykule Doktorantka znajduje się na wyróżnionym miejscu listy autorów.

#### Uwagi redakcyjne

Rozprawa jest napisana czytelnie mimo że niekiedy konieczne było stosowanie technicznego języka z użyciem specjalistycznej terminologii. Obecne są nieliczne błędy składniowe i stylistyczne (np. pierwsze zdanie Streszczenia). Redakcyjnie praca również nie budzi dużych zastrzeżeń. Należy jednak wspomnieć, że Tabela 3 została umieszczona przed Tabelą 2. Najwięcej zastrzeżeń budzi jednak cytowanie literatury. W tekście znalazłem kilka pozycji, które nie znalazły się w referencjach (Suzuki i in. 2009 – str. 12; Szymańska 2012 str. 18; Kozik i Komosa 2012 – str. 28; Arquero i in. 2006 – str. 37). I odwrotnie, w tekście zabrakło jednego cytowania podanego w referencjach (Ahmad i Rasol 2014). Największy jednak problem stanowi redakcja rozdziału Spis literatury, bowiem brak w niej konsekwencji. W pracy Doktorantka dowolnie umieszcza rok publikacji - po nazwiskach lub na końcu wpisu, w dodatku niekiedy w nawiasach, a innym razem bez. Podobnie, w przypadkowy sposób podawany jest tom pisma – czasem dodawany jest w nawiasach numer zeszytu, a także numer DOI. Również cytowaniu rozdziałów w monografiach Autorka nie poświęciła należytej uwagi – czasem brakuje stron, czasem miejsca wydania. Ponadto w spisie literatury dwie pozycje są zdublowane (Hoagland i Arnon 1950; Malhotra i in. 2018). Powyższe błędy są dość typowe dla rozpraw doktorskich. Niemniej Doktorantka, która ma już w swoim dorobku pracę, w której pełniła funkcję autora korespondencyjnego powinna mieć

świadomość, jak duże znaczenie przywiązują redakcje pism naukowych do konsekwentnego stosowania stylu cytowania. Dotyczy to również monografii.

### Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska dotyczy wpływu ograniczenia dostępności trzech głównych makroelementów, tzn. azotu, fosforu oraz potasu. Podejście eksperymentalne jest niewyszukane jak na projekt doktorski. Jako materiał badawczy użyto siewek dwóch odmian uprawnych rzodkiewki, których wzrost był prowadzony w kulturach wodnych. Zastosowano pojedynczy schemat eksperymentalny, w którym siewki początkowo rosły na pożywce kompletnej, następnie na pożywce bez jednego z pierwiastków, a na koniec były przenoszone do warunków początkowych. Również zestaw metod badawczych był ograniczony. Kilkakrotnie podczas eksperymentu oznaczano skład pierwiastkowy organów siewek oraz ich suchą masę, określano też cztery parametry wymiany gazowej liści standardowo mierzone lub wyliczane przez analizatory CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O wiodących firm (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa, międzykomórkowe stężenie CO<sub>2</sub>), oraz szacowano poziom chlorofilu (w jednostkach umownych wyliczanych na podstawie spektrum liścia). Ponadto jednokrotnie, pod koniec okresu wzrostu roślin przy deficycie mineralnym, charakteryzowano sprawność aparatu fotosyntetycznego na podstawie testu JIP opartego o analizę krzywej szybkiej składowej wzbudzenia fluorescencji chlorofilu. W dwóch opublikowanych pracach dodatkowo oceniano zmiany w strukturze chloroplastów i tylakoidów z użyciem mikroskopu konfokalnego i elektronowego. Jednak w omówieniu, stanowiącym podstawę oceny rozprawy, ten temat nie jest przez Autorkę poruszany. Mogłoby to wskazywać, że Doktorantka nie przywiązuje wagi do wyników ultrastrukturalnych lub uznała je za nieistotne. Nie jest więc jasne po co znalazły się one w opublikowanych pracach. Proszę o wyjaśnienie tej wątpliwości podczas publicznej obrony.

Motywy przewodnim recenzowanej rozprawy doktorskiej jest analiza efektywności aparatu fotosyntetycznego siewek rzodkiewki w warunkach deficytu trzech składników mineralnych niezbędnych dla życia roślin. Podstawową metodą użytą w badaniach był test JIP. To nowoczesne narzędzie jest ostatnio często stosowane w badaniach stanu aparatu fotosyntetycznego. Test dostarcza licznych parametrów wyliczanych na podstawie analizy krzywej szybkiej fazy fluorescencji chlorofilu wzbudzonej impulsem światła wysycającego centra fotosyntetyczne. Na podstawie takiej analizy część badaczy wyciąga daleko idące wnioski odnośnie podłoża biofizycznego modyfikacji szlaku transportu elektronów m.in. pod

wpływem stresów środowiskowych. Wnioski te są w dużej mierze oparte o założenia teoretyczne i korelacje, więc niekiedy mogą mieć charakter mniej lub bardziej spekulacyjny. Natomiast niewątpliwą zaletą testu JIP jest łatwość użycia i nieniszczący charakter pomiarów. Dlatego metoda jest bardzo przydatna w badaniach przesiewowych, w których pomiarami objęte są liczne materiały. Takie podejście pozwala ocenić zmienność w obrębie gatunku czy populacji, a nawet selekcjonować genotypy tolerujące stres. Narzędzie może być też wykorzystane wspomagająco w badaniach mechanizmów danego zjawiska poprzez użycie dobrze zdefiniowanych genotypów wykazujących wyraźne zróżnicowanie pod względem danej cechy, ewentualnie mutantów lub transformantów. I tu nasuwa mi się kolejna wątpliwość odnośnie recenzowanego projektu doktorskiego. Nie rozumiem bowiem dlaczego Doktorantka ograniczyła materiał badawczy do dwóch odmian uprawnych, niewykazujących w dodatku dużego zróżnicowania pod względem na reakcji fizjologicznych na stres. Dysponując nowoczesnym urządzeniem do analizy krzywej szybkiej fazy indukcji fluorescencji można było bez wydłużenia cyklu eksperymentalnego przebadać dużo więcej materiałów. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w badaniach nie użyto szerszego spektrum dobrze zdefiniowanych i zróżnicowanych pod względem odpowiedzi na stres genotypów. Czy przeprowadzono badania wstępne, w których wybrano konkretne dwie odmiany uprawne? A jeśli nie, to dlaczego je wybrano?

Założeniem pracy widocznym m.in. w postawionych hipotezach roboczych jest istnienie bezpośredniego związku między deficytem azotu, fosforu i potasu, a funkcjonowaniem fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Takie podejście pomija jednak złożoność funkcjonowania rośliny, a przecież stres związany z deficytem składników mineralnych wpływa na wszystkie jej organy. Nie można więc wykluczyć, że efekty obserwowane w odniesieniu do aparatu fotosyntetycznego są wtórne w stosunku zaburzeń innych procesów. Taka hipoteza to nie tylko spekulacja, ale znajduje potwierdzenie w wynikach recenzowanej rozprawy doktorskiej. W przypadku eksperymentu odnoszącego się do deficytu azotu, analiza ultrastruktury chloroplastów (pominięta w dyskusji przez Doktorantkę) wskazuje na znaczne powiększenie się ziaren skrobi u roślin po okresie wzrostu w warunkach deficytu azotu. Jednocześnie autorka zaobserwowała stopniowe obniżanie się natężenia fotosyntezy netto w trakcie trwania stresu. Obie te obserwacje są ze sobą w sprzeczności, gdyż akumulacja skrobi w liściach jest objawem zwiększonej podaży asymilatów w liściach. Taka sprzeczność powinna być zauważona przez autorów pracy i przedyskutowana, co jednak nie miało miejsca. Akumulacja skrobi pod postacią ziaren w chloroplastach jest dość typowym objawem różnych stresów, w tym deficytu mineralnego

i jest związana z ograniczeniem popytu na asymilaty ze strony akceptorów (por. prace Pani Prof. Zofii Starck z Katedry Fizjologii Roślin SGGW), m.in. korzenia, który jest głównym akceptorem w przypadku młodych roślin. Można więc przyjąć hipotezę, że deficyt mineralny powodował zahamowanie odpływu asymilatów z donorów, a co za tym idzie ich nadpodaż w liściach i aklimatyzacyjne zmiany w aparacie fotosyntetycznym (m.in. obniżenie fotosyntezy netto). W związku z tym test JIP wykonany przez Doktorantkę pod koniec okresu wzrostu roślin w warunkach deficytu mineralnego pokazywał jedynie wtórne, a więc niespecyficzne efekty związane np. ze zmianą profilu ekspresji genów fotosyntetycznych, z mechanicznymi zmianami ultrastruktury tylakoidów pod wpływem silnie powiększających się ziaren skrobi, ewentualnie z przyspieszonym starzeniem się chloroplastów (o czym mogłyby świadczyć widoczne w chloroplastach plastoglobule). Powyższą hipotezę można by łatwo sfalsyfikować, gdyby test JIP był wykonywany w ciągu całego okresu trwania eksperymentu, tak jak pomiary wymiany gazowej lub nawet częściej, gdyż samo oznaczanie krzywej indukcji jest proste i szybkie. Można by wtedy określić, czy zaburzenia w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów (faza jasna) poprzedzają zmiany w fotosyntezie netto (faza ciemna) czy odwrotnie. Pierwsza możliwość byłaby bardzo atrakcyjna, gdyż wskazywałaby na możliwość użycia testu JIP do selekcji tolerancyjnych genotypów na bardzo wczesnych etapach stresu. Proszę o wyjaśnienie podczas publicznej obrony, dlaczego test JIP był wykonywany jedynie pod koniec okresu poddawania roślin stresowi, a nie dynamicznie, tak jak wymiana gazowa i szacowanie zawartości chlorofilu w liściach.

#### Podsumowanie

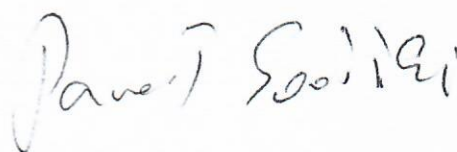
Podniesione przeze mnie niedociągnięcia nie obniżają mojej raczej pozytywnej oceny pracy. Wytknięte błędy redakcyjne i literaturowe są dość typowe dla rozpraw doktorskich i wynikają z braku doświadczenia, a zapewne i czasu podczas przygotowywania rozprawy. Natomiast uwagi dotyczące założeń w pracy oraz schematu eksperymentalnego sformułowałem głównie dla sprowokowania dyskusji naukowej, a może i przemyśleń odnośnie dalszych kierunków badań.

Rozprawa spełnia podstawowe wymogi odnośnie prac doktorskich. Mgr inż. Magdalena Kusaka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, szczególnie przy analizie danych odnoszących się do krzywych szybkiej fazy indukcji fluorescencji w badanym materiale i próbie przełożenia ich na

wyjaśnienie zmian w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów pod wpływem stresu. Co więcej, rozprawa dostarcza oryginalnego rozwiązania problemu naukowego. Zostało to potwierdzone opublikowaniem części wyników w postaci dwóch artykułów naukowych w dobrych pismach specjalistycznych. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia też kryteria formalne wymagane dla dysertacji doktorskiej. Wnioskuje więc o dopuszczenie mgr Magdaleny Danuty Kusaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 17.08.2020

prof. dr hab. Paweł Sowiński

Handwritten signature of Paweł Sowiński in black ink.