

Kraków, 10 lipca 2020

Prof. dr hab. Marcin Rapacz  
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny  
Uniwersytet Rolniczy *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie  
ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków

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

Rozprawa doktorska Pani Magdaleny Kusaka obejmuje bardzo ważne dla biologii roślin zagadnienie jakim jest ich funkcjonowanie w warunkach niedoboru składników mineralnych. Wpływ niedoboru poszczególnych składników mineralnych na aparat fotosyntetyczny jest z pozoru zbliżony, jednak mechanizmy tego wpływu mogą znacząco się różnić, szczególnie w ujęciu dynamicznym co wynika z zachodzących na siebie efektów bezpośrednich i pośrednich. Zagadnienie to zdecydowanie wymaga poszerzenia dostępnej wiedzy. W tą potrzebę wpisuje się przedstawiona rozprawa doktorska. Podstawową metodą badawczą, jaką posłużyła się Doktorantka są pomiary kinetyki indukcji sygnału fluorescencji chlorofilu. Jest to metoda powszechnie stosowana w badaniach reakcji aparatu fotosyntetycznego roślin na czynniki środowiska, a jej umiejętnie interpretowane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących zależności przyczynowo – skutkowych w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego. Jest to przy tym metoda szybka i tania. Wczesne wykrywanie niedoboru składników mineralnych i możliwość rozróżniania deficytu poszczególnych pierwiastków ma dodatkowo kapitalne znaczenie dla prowadzenia zrównoważonej produkcji ogrodniczej i rolniczej, a przez to zmniejszenia obciążenia środowiska nadmiarowymi ilościami związków mineralnych oraz ograniczenia kosztów produkcji. Wobec powyższego przedstawiona rozprawa ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale, jeśli proponowana metoda zostanie zastosowana w większej skali w praktyce, również potencjalne duże znaczenie praktyczne dla uzyskania profitów środowiskowych i społecznych.

Jako rozprawa przedłożone zostały trzy artykuły naukowe w języku angielskim, w tym dwa opublikowane i trzeci będący na etapie recenzji:

1. Cetner (Kusaka) M.D., Kalaji H.M., Goltsev V., Aleksandrov V., Kowalczyk K., Borucki W., Jajoo A. (2017) Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. *Plant Physiology and Biochemistry* 119: 81–92 (IF 2017: 3.094; IF5 lat: 3.607; MNiSW 35 pkt).
2. Cetner (Kusaka) M.D., Kalaji H.M., Borucki W., Kowalczyk K. (2020) Phosphorus deficiency affects the I-step of chlorophyll a fluorescence induction curve of radish. *Photosynthetica* 58 (SI): 671-681 (IF 2019: 2,219; IF5 lat: 1,913; MNiSW 70 pkt.)
3. Kusaka M., Kalaji H.M., Mastalerczuk G., Dąbrowski P. Potassium deficiency impact on the photosynthetic apparatus efficiency of radish (w recenzji w czasopiśmie *Photosynthetica*, ID: 2584-06-2020).

Jak widać Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich artykułów, a jej udział w powstaniu każdego z artykułów stanowi 70% całości. Artykuły opublikowane zostały w czasopismach o średnich wartościach współczynnika wpływu dla dyscypliny nauki biologiczne (obecna punktacja MNiSW tych czasopism to 70 pkt.) jednak cieszących się uznaniem wśród naukowców zajmujących się biologią eksperymentalną roślin, w tym biologią aparatu fotosyntetycznego. Wśród współautorów artykułów znaleźć można uznanych specjalistów w zakresie badań aparatu fotosyntetycznego roślin i technik pomiaru fluorescencji chlorofilu nie tylko z Polski, ale i z zagranicy (Prof. Prof. Goltsev, Aleksandrov i Jajoo). Świadczy to pośrednio o randze prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Do rozprawy dołączono też czterdziestostronicowe (nie licząc streszczeń i spisu treści) polskojęzyczne omówienie stanowiących rozprawę publikacji. Opracowanie to jest starannie przygotowane, zawiera materiał ilustracyjny oraz cytuje 100 pozycji literatury. Opracowanie to należy pochwalić za kompletne i syntetyczne uzupełnienie pominiętych w publikacjach informacji na temat aktualnego stanu wiedzy o wpływie niedoborów N, P i K na przebieg procesu fotosyntezy. Negatywnym jego aspektem jest jednakże zaniechanie syntetycznego zestawienia wniosków płynących z rozprawy.

Celem pracy Pani Kusaka była ocena wpływu niedoborów trzech składników mineralnych: azotu, fosforu i potasu na przebieg procesów fotochemicznych fotosyntezy oraz zmiany struktury kompleksów białkowo-barwnikowych w aparacie fotosyntetycznym rzodkiewki. Poszczególne, wymienione powyżej prace wchodzące w skład rozprawy traktowały osobno każdy z wymienionych makroskładników.

Jak już wspomniano podstawową zastosowaną metodą badawczą były badania przebiegu fazy fotochemicznej fotosyntezy z wykorzystaniem pomiarów fluorescencji chlorofilu. Dodatkowo wykonano też obserwacje morfologii roślin oraz struktury

chloroplastów, pomiary zawartości wybranych składników mineralnych, zawartości chlorofilu, a także wymiany gazowej.

**W pracy pierwszej** Doktorantka pokazała, że dwa tygodnie stresu niedoboru azotu zmieniły wszystkie badane charakterystyki roślin. Najwcześniej obserwowano zmiany w zawartości chlorofilu oraz we wskaźnikach wydajności transportu elektronów w fazie jasnej fotosyntezy. Wyniki te są przewidywalne w świetle wcześniejszych doniesień literaturowych. Bardziej interesujące w aspekcie nowości naukowej są natomiast wyniki szczegółowe. Stwierdzono, że w łańcuchu transportu elektronów głównym miejscem występowania zakłóceń były wszystkie etapy transportu elektronów w fotosystemie II (absorpcja fotonów w antenach LHCII, podaż elektronów od OEC, redukcja QA po akceptorowej stronie PSII). W wyniku zaburzeń w funkcjonowaniu PSII zmniejszeniu uległa też liczba aktywnych centrów reakcji PSII. W tym miejscu Doktorantka stawia tezę, że najprawdopodobniej część centrów reakcji niezdolnych do redukcji QA przekształciła się w tzw. silent RCs, które rozpraszają nadmiar energii wzbudzenia. Przypuszczenie to nie jest jednakże poparte twardymi dowodami i bazuje raczej na znanych z literatury przykładach.

Bardzo interesująca jest natomiast obserwowana zależność pomiędzy stopniem tolerancji odmiany na niedobór azotu a różnicami w reakcji aparatu fotosyntetycznego u starych i młodych liści.

Doktorantka stwierdziła też, że po przywróceniu dostępu do azotu mineralnego aparat fotosyntetyczny roślin uległ szybkiej regeneracji i to pomimo bardzo poważnych i wielostronnych zakłóceń w funkcjonowaniu obserwowanych w warunkach niedoboru N.

**W pracy drugiej** poświęconej stresowi niedoboru fosforu Doktorantka nie zaobserwowała większych zmian w morfologii roślin, czy zawartości chlorofilu. Zaobserwowano natomiast spadek intensywności fotosyntezy netto oraz wydajnościach transferu energii: w pierwotnych reakcji fotochemicznych PSII, za centrum reakcji PSII oraz na etapie transferu do PSI. Zmiany te były jednoznacznie widoczne u starszych liści, niezależnie od badanej odmiany. Zdaniem Doktorantki główną przyczyną zmniejszenia produktywności fotosyntetycznej w przypadku tego stresu była najprawdopodobniej inhibicja przez sprzężenie zwrotne spowodowana zaburzeniami regulacji metabolizmu CO<sub>2</sub>, co koresponduje z dostępnymi danymi literaturowymi. Dokładniejsza analiza sygnałów fluorescencji chlorofilu wykazała, że zaburzenia w transporcie elektronów skupiły się na aktywności plastochinonów generującej gradient pH w poprzek błon tylakoidów. W efekcie doszło do zahamowania reakcji utleniania plastochinolu w centrum żelazowo-siarkowym białka Rieske kompleksu cytochromowego b6f. Zatrzymanie utleniania plastochinolu ujawniło się w postaci wygładzenia

punktu I krzywej indukcji sygnału fluorescencji chlorofilu. Ta modyfikacja kształtu krzywej została stwierdzona wcześniej u jęczmienia, co zdaniem Doktorantki może wskazywać na przydatność analizy sygnału fluorescencji do identyfikowania stresu spowodowanego niedoborem składników pokarmowych u roślin. Stwierdzenie to należy uznać za zbyt pochopnie. Opisana specyficzna modyfikacja krzywej jest zdaniem samej Doktorantki charakterystyczna nie tylko dla niedoboru jednego z trzech badanych niedoborów makroskładników (fosforu), ale i częściowo w przypadku niedoboru potasu. Nie wiadomo jednak, czy modyfikacja taka nie pojawia się w przypadku niedoborów innych, nie badanych tutaj pierwiastków oraz szerzej, czy nie jest obserwowana w przypadku jednoczesnego działania innych czynników stresowych co mogłoby utrudnić lub nawet uniemożliwić praktyczne wykorzystanie tej metody.

Interesująca w pracy drugiej jest obserwacja dotycząca zmniejszenia się ilości i wielkości gran u roślin obydwu odmian w warunkach deficytu fosforu.

W samej pracy dziwić może brak zacytowania bardzo istotnej i nowej pracy Carstensen i wsp. 2018 (Plant Physiol 177, 271-284), ale przyznać trzeba, że Doktorantka cytuje ją w opracowaniu podsumowującym, a nawet opiera na niej swoją hipotezę dotyczącą wpływu niedoboru fosforu na przebieg krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu.

**Praca trzecia** poświęcona jest niedoborowi potasu. W tym przypadku, podobnie jak w przypadku niedoboru P nie obserwowano zmian w morfologii roślin, a spadek zawartości chlorofilu obserwowany był jedynie u jednej z odmian po dłuższym czasie działania stresu. U obydwu odmian zaobserwowano obniżenie wydajności fotosyntezy netto, za co odpowiedzialne było głównie zamykanie się aparatów szparkowych. Zmiany te były wyraźniejsze u odmiany wrażliwej. Jeśli chodzi o pomiary fluorescencji chlorofilu to ich wyniki wskazują, że deficyt K wpływa na integralność PSII i status redoksy pili plastochinonu regulowany przez sprzężenie zwrotne spowodowane zmniejszonym stężeniem CO<sub>2</sub> w liściu i/lub zmniejszoną aktywnością RuBisCO prowadzące do wzrostu gradientu protonów w poprzek błon tylakoidów. Wpływ na przebieg procesów fotochemicznych był tu więc podobny jak w przypadku deficytu fosforu, przy czym miał on najprawdopodobniej inną przyczynę pierwotną. Nie doszło ponadto do całkowitego zahamowania utleniania PQH<sub>2</sub>.

Strona językowa opracowania może w pewnych fragmentach budzić zastrzeżenia. Dla przykładu używany jest nowotwór językowy „kultywar” (odmiana rolnicza / odmiana). Wiele stwierdzeń jest niejednoznacznych lub językowo nieprecyzyjnych. Dla przykładu „głównym miejscem występowania zakłóceń był fotosystem II oraz jego podjednostki” (zastanawia co jest w fotosystemie poza podjednostkami), czy też nie wiadomo co Doktorantka miała na myśli

pisząc o „wskaźnikach wydajności zachowania energii transportu elektronów”. Uchybienia te nie umniejszają jednakże wartości merytorycznej przedłożonej rozprawy.

Należy uznać, że wyniki uzyskane w pracy stanowią wartościowe uzupełnienie licznych badań dotyczących wpływu stresu niedoboru składników pokarmowych na strukturę i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie uznać należy:

1. Wykazanie, że reakcja aparatu fotosyntetycznego wrażliwej na deficyt azotu odmiany rzodkiewki zależy od wieku liścia, podczas gdy zależności tej nie obserwujemy u odmiany tolerancyjnej.
2. Wskazanie na zmiany w strukturze gran jako na potencjalną przyczynę obniżania się intensywności fotosyntezy w warunkach deficytu fosforu.
3. Pokazanie, że możliwą przyczyną wyższej tolerancji niedoboru potasu może być u rzodkiewki inna wrażliwość aparatów szparkowych na deficyt tego pierwiastka przejawiająca się szybszym zamykaniem szparek u odmiany wrażliwej.

**Podsumowując, rozprawa doktorska Pani Magdaleny Danuty Kusaka stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganie stawianym rozprawom doktorskim.**

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona kryteria stawiane w Artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Danuty Kusaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

  
Prof. dr hab. Marcin Rapacz