

Prof. dr hab. Andrzej Skoczowski
Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie
Instytut Biologii
Ul. Podchorążych 2
30-084 Kraków

Kraków, 14.04.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Kupis

**pt.: Molekularne aspekty oddziaływania kwasu abscysynowego na alternatywny szlak
oddechowy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*)
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Niewiadomskiej**

Przesłana do oceny praca przygotowana została w formie klasycznej rozprawy doktorskiej. Liczy 124 ponumerowane strony oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Manuskrypt zawiera też obszerny spis stosowanych przez Autorkę skrótów. Przy okazji chciałbym zwrócić Doktorantce uwagę, że $^1\text{O}_2$ (tlen singletowy) $\text{O}_2^{\bullet-}$ (anionorodnik ponadtlenkowy) czy też $\bullet\text{OH}$ (rodnik hydroksylowy) to nie skróty, a wzory chemiczne więc umieszczanie ich w omawianym spisie uważam za zbędne.

W pracy zmieszczono 8 tabel oraz 31 rycin, których spis zamieściła Autorka na końcu rozprawy, ułatwiając recenzentowi ich liczenie. Bibliografia obejmuje 231 pozycji, których dobór i aktualność nie budzi żadnych zastrzeżeń. Większość to prace opublikowane zaledwie kilka lub najwyżej kilkanaście lat temu.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy, ogólnie rzecz ujmując, mechanizmów aklimatyzacji roślin do warunków zimowych, przy założeniu, że w procesie tym bierze udział kwas abscysynowy (ABA), który odpowiada tu za aktywację alternatywnego szlaku oddechowego. Prezentowane badania mają zatem charakter badań podstawowych. Wpisują się w światowy trend badań nad odpowiedzią roślin na różnego rodzaju czynniki stresowe oraz nad rolą hormonów roślinnych i reaktywnych form tlenu (RFT) w tej odpowiedzi. Badania wykonano na roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*, choć biorąc pod uwagę kwestie związane z badaniem aklimatyzacji roślin do warunków zimowych osobiście wybrałbym inny obiekt badawczy. Na marginesie, muszę już w tym miejscu zauważyć, że Doktorantka procesy aklimatyzacji czy też, jak kto woli, aklimacji do stresu nazywa adaptacją. Mam nadzieję, że to jedynie niedopatrzenie, bo różnica znaczeniowa pomiędzy adaptacją a aklimatyzacją jest ogromna.

W zgrabnie napisanym wstępie (mam tu na myśli pisanie „krótko i na temat”), Doktorantka omawia kolejno dwa kluczowe procesy fizjologiczne u roślin (oddychanie i fotosyntezę), budowę i właściwości chlorofilu, podstawy nieinwazyjnej oceny sprawności aparatu fotosyntetycznego i w reszcie hormony stresowe roślin oraz udział RFT w procesie starzenia się liści.

Do tej części pracy mam drobne uwagi. Opisując budowę mitochondriów (str. 8) czy też później przebieg fotosyntezy (str. 17) Doktorantka cytuje w pierwszym przypadku pozycję Taiz i Zeiger (2002), a w drugim oprócz pozycji Taiz i Zeiger (2002) także pozycję Strzałka (2012). Ja wiem, że Doktorantka ma trudne zadanie, bo nie jest w stanie chronologicznie zacytować wszystkich prac, w których opisywano budowę mitochondriów i ich metabolizm czy też badania nad procesem fotosyntezy. Dlatego też ucieka się do zacytowania uznanych podręczników akademickich. I dobrze tylko, że nie tak. Ze sposobu cytowania Doktorantki wynika, że Taiz i Zeiger oraz Strzałka odkryli to o czym Ona pisze. A to przecież nieprawda. Należało napisać, że wiedza na temat budowy mitochondriów (czy też przebiegu procesu fotosyntezy) opisana została w wielu podręcznikach fizjologii roślin np. Taiz i Zeiger (2002) lub odpowiednio, Strzałka (2012). Taki sposób cytowania zapobiega po pierwsze wprowadzaniu w błąd, zwłaszcza młodych pracowników nauki, a po drugie częstego pomijania rzeczywistych odkrywców jakiegoś zjawiska poprzez cytowanie prac przeglądowych czy też podręczników lub monografii. To tyle. Wiem, że się trochę czepiam, ale taki sposób cytowania staje się nagminny u dyplomantów oraz młodych pracowników nauki, co uważam za niefortunną manierę.

Tytuł rozdziału 1.4 „Bezinwazyjna ocena stresu aparatu fotosyntetycznego” jest moim zdaniem nieporwany. Doktorantka bada sprawność fotochemiczną (lub wydajność kwantową) aparatu fotosyntetycznego a nie jego „zestresowanie”. Zestresowany może być organizm (czyli roślina), a nie proces biochemiczno-biofizyczny.

W rozdziale 2. Cel pracy Doktorantka napisała, że cytuję: „Dlatego nadrzędnym celem niniejszych badań była weryfikacja hipotezy zakładającej, że zależna od ABA adaptacja do stresu związanego z przygotowaniem roślin do sezonu zimowego polega na aktywacji alternatywnego szlaku oddechowego”. I dalej „Aby zilustrować sezon jesienny zastosowano warunki stresowe polegające na zmianie intensywności światła HL-LL”.

Mam do tak sformułowanego celu kilka uwag. Po pierwsze Doktorantka ponownie proces aklimatyzacji do stresu nazywa adaptacją. O tym, że **adaptacja** to nie jest synonim sowa

aklimatyzacja wspominałem już wcześniej. Mam nadzieję, że Doktorantka różnicę znaczeń wyjaśni mi podczas obrony. Po drugie myślę, że raczej nie powinno się mówić o stresie związanym z „przygotowaniem roślin do sezonu zimowego”. Stres, wynikający z całego spektrum niekorzystnych warunków środowiskowych panujących zimą, ma dopiero nadejść. Okres jesienny wykorzystują rośliny na powolne przygotowanie się (aklimatyzację) na nadejście stresu i jego przetrwanie. Stres, nie tylko zresztą u roślin, jest najczęściej wynikiem gwałtownych zmian homeostazy, na które organizm jest nieprzygotowany. Ale to oczywiście kwestia do dyskusji. Po trzecie, moim zdaniem, Doktorantka raczej nie „**ilustrowała**” sezonu jesiennego poprzez zmianę intensywności światła, a **symulowała** w ten sposób warunki świetlne panujące jesienią. Nie twierdzę, że synonimy dla słowa „ilustrować” nie dopuszczają takiego, jak chce Autorka, jego użycia, ale myślę, że znacznie lepszym określeniem jest symulowanie warunków panujących jesienią. W dalszej części pracy (str. 66) Doktorantka napisała o **naśladowaniu** warunków, na które rośliny narażone są jesienią. Myślę, że ten termin jest lepszy. Aby zakończyć te semantyczne rozważania pozytywnym dla Doktorantki przekazem uważam, że rozprawy naukowe powinny cechować się, w odróżnieniu od dzieł literackich, odejściem od poszukiwania synonimów dla raz wprowadzonych określeń. Nie ma co obawiać się powtórzeń, bo różne określenia wprowadzone przez Autora na opis tego samego zjawiska wprowadzają tylko niepotrzebne zamieszanie.

Nie bardzo wiem, dlaczego Doktorantka przyjęła bezdyskusyjnie, że rośliny odczytują informację o nadejściu pory jesiennej poprzez spadek natężenia docierającego do nich światła. Myślę, że trzeba tu uwzględnić także, a może przede wszystkim, skracającą się długość dnia. Długość dnia skorelowana jest oczywiście z malejącą, dobową, ilością światła docierającego do roślin, ale niekoniecznie z jego natężeniem. Nie można nie zgodzić się z Doktorantką, że natężenie światła jesienią jest zazwyczaj niższe niż latem, ale też trudno zaprzeczyć, że o każdej porze roku mogą wystąpić, różnej długości, okresy o wyższym lub niższym natężeniu światła. To zależy od warunków pogodowych, które są bardzo zmienne. Natomiast to co jest niezmiennie, to charakterystyczna dla danej pory roku długość dnia i kierunek jej zmian (wydłużanie lub skracanie się dnia). Dlatego też rośliny tą właśnie informację „traktują jako wiążącą”. W swojej pracy Doktorantka uprawiała rośliny *A. thaliana* w warunkach 12. godzinnego fotoperiodu, co trochę poprawia sytuację bo to *de facto*, występujące jesienią, warunki krótkiego dnia. Nie bardzo też rozumiem, dlaczego kierunek zmian natężenia światła HL – LL uważa Doktorantka za stres. Zmiana w drugą stronę, tj. LL – HL, jest dość oczywistym

stanem stresowym, ale odwrotnie raczej niekoniecznie. Chyba że Doktorantka każdą zmianę w warunkach bytowania roślin (wytrącenie ze stadium homeostazy) uważa za stres – wtedy zgoda. Będę prosił o wyjaśnienie.

Kończąc omawianie tego fragmentu pracy, stwierdzam, że sformułowane przez Doktorantkę cele szczegółowe nie budzą moich zastrzeżeń. Pozostaje więc tylko do dyskusji co finalnie udowadniamy – hipotezę nadrzędną czy cele szczegółowe.

Metody zastosowane przez Doktorantkę uważam za adekwatne. Trzeba też zwrócić uwagę na dużą różnorodność zastosowanych przez Nią technik badawczych: począwszy od testów przyżyciowych (metoda DIS), poprzez techniki nieinwazyjne (pomiar aktywności fotochemicznej PSII), pomiar fluorescencji niskotemperaturowej liści (zmiany proporcji fotoukładów PSI/PSII), kalorymetrię izotermiczną (ocena aktywności alternatywnego szlaku oddechowego), klasyczne techniki biochemiczne (analizy aktywności SOD) a na świetnie wykonanych badaniach molekularnych kończąc.

W tym miejscu mam kilka drobnych uwag do tej części pracy. W części materiał i metody (jak i później w dalszej części pracy) Doktorantka używa określenia „hodowla” roślin na proces ich **uprawy**. Rośliny hoduje hodowca (bo to jest proces wytwarzania nowych odmian) natomiast wszyscy inni (rolnicy, ogrodnicy i naukowcy) rośliny uprawiają. To nie jest czepianie się detali, tylko zwrócenie uwagi Doktorantki, pod kątem ewentualnych przyszłych Jej działań na niwie naukowej, że słowo hodowla nie jest synonimem słowa uprawa. Również w języku angielskim dla hodowli roślin zastrzeżony jest oddzielny termin: plant breeding. Biologia to nauka, która często zahacza o nauki ścisłe takie jak chemia czy fizyka, musi więc z definicji operować precyzyjną nomenklaturą.

Rozdział 3.3. (str. 45) Doktorantka zatytułowała „Pomiar fluorescencji PSII”. W rzeczywistości jest to pomiar fluorescencji chlorofilu α , lub pomiar sprawności fotochemicznej (czy też kwantowej) PSII.

W rozdziale 3.5. dane podane na temat producenta kalorymetru TAM III i programu komputerowego służącego do jego obsługi są nieprawidłowe. Dla potrzeb ewentualnej przyszłej publikacji podaję w nawiasie poprawne dane (TAM III; producent: TA Instruments, Lindon, UT; oprogramowanie: TAM Assistant Software).

W rozdziale 4. Wyniki, przy opisie tempa starzenia się liści mam kilka wątpliwości. Po pierwsze nie rozumiem co oznacza, że „Opryskiwanie roztworem ABA przeprowadzano... odnosząc się do produkcji endogennego ABA” (str. 66).

Po drugie opisany na stronie 67 sposób oceny przyspieszonego starzenia (DIS) nie zgadza się z opisem procedury podanym w rozdziale Materiał i metody (str. 45, podrozdział 3.2.). W metodyce podano, że liście inkubowano przez 5 dni w ciemności na szalkach Petriego podczas gdy w części wynikowej, że w ciemności inkubowano rośliny, a liście umieszczano na szalkach wyłącznie w celu dokonania dokumentacji fotograficznej. Różnica w traktowaniu jest bardzo znacząca więc proszę o wyjaśnienie jak było faktycznie. Na marginesie. Doktoranta dopiero na str. 89 podaje źródła literaturowe, z których zaczerpnęła opis procedury DIS. Natomiast co do opisu uzyskanych tą metoda wyników. Moim zdaniem jest wyraźnie różnica pomiędzy obiektami kontrolnymi HL K oraz LL K. W drugim przypadku (LL K) część liści ma silne antocyjanowe zabarwienie. Nie lekceważyłbym tego zjawiska tylko próbował je zinterpretować, a przynajmniej na nie wskazać. To nie jest moim zdaniem przypadkowa reakcja.

Ryciny w tej części manuskryptu są, rzekłbym, dość „skąpo” podpisane. I tak, w podpisie do Ryciny 12 Autorka nie objaśnia co przedstawiają fotografie w górnym, a co w dolnym wierszu. Natomiast na Rycinach 13 i 14 w podpisach mamy, odpowiednio, oznaczenia „HL C” oraz „LL C”, a na zdjęciach szalki opisane są „HL K” oraz „LL K”.

W rozdziale 4.2. „Kondycja aparatu fotosyntetycznego” (str. 70) Doktorantka napisała, że analiza zmian wartości F_m nie wykazała statystycznie istotnych różnic między obiektami „aczkolwiek wykazano pewną tendencję spadkową”. Także na str. 72 Autorka twierdzi, że cytując: „pryskanie roślin kwasem abscysynowy...” „powoduje wzrost wartości NPQ, który jednak nie jest statystycznie istotny”. Podobne sformułowania znajdują się też w dalszej części pracy (np. str. 73, 76 itd.). Moim zdaniem Doktorantka ulega częstej niestety, nie tylko u młodych naukowców, pokusie opisu widocznych „na oko” zmian wartości badanego parametru przy całkowitym ignorowaniu dopiero co uzyskanych wyników statystycznej analizy danych. Trzeba bowiem pamiętać, że jak obiekty nie różnią się statystycznie to są, w granicach błędu statystycznego, **identyczne**. Aby mówić o tendencjach zmian trzeba wykonać np. analizę trendu, której Doktorantka nie wykonała (i bardzo dobrze, bo ma za mało powtórzeń, aby udowodniać trendy). Mam nadzieję, że Doktorantka będzie o tym w przyszłości pamiętać. Co do parametru NPQ to nie jest to, jak napisała Doktorantka, „zdolność roślin do rozpraszania nadmiaru energii **na sposób cieplny**” tylko **w postaci ciepła**.

Podsumowując badania dotyczące sprawności fotochemicznej PSII chciałbym jeszcze zauważyć, że statystycznie istotne różnice pomiędzy obiektami, oczywiście w obrębie

analizowanych parametrów, są bardzo małe. I tak, zmiana wartości parametru F_v/F_m na skutek zmiany natężenia światła (HL C – LL C) to moim zdaniem ok. 2%, natomiast parametru $Y(II)$ to maksymalnie 5%. Doktorantka niechętnie powiększyła optycznie różnice pomiędzy wysokością poszczególnych słupków pokazując jedynie fragment skali na osi „Y” (skala nie zaczyna się od zera). Ale to tak na marginesie.

Nie bardzo wiem, jak obliczono całkowity wypływ ciepła z krążków liściowych na podstawie którego analizowano aktywność AOX. Na rycinach 21 oraz 22 przedstawiono słupki co wskazuje, że krzywe mocy cieplnej (dQ/dt) zostały scałkowane. Jeśli tak, to przedstawione wartości to wartości energii cieplnej, a nie mocy cieplnej i powinny być wyrażone w Julach a nie w Watach. Jeśli natomiast przedstawione dane to odczyt wartości mocy cieplnej po jakimś czasie pomiaru (t) to proszę o wyjaśnienie co zdecydowało o wyborze tego właśnie punktu pomiarowego.

Jeśli chodzi o zmiany aktywności SOD to mam dwie uwagi. Po pierwsze tytuł tego rozdziału (4.4.) tak właśnie powinien brzmieć (4.4. Zmiany aktywności SOD). Autorka omawia tylko te zmiany więc tytuł „Stres oksydacyjny” jest „na wyrost”. Po drugie, nie można mówić o spadku aktywności SOD o 18,5% po przeniesieniu roślin z HL do LL, bo zmiana ta jest, jak udowadnia Autorka, statystycznie nieistotna. Napisałem o tym już powyżej, że nieistotnych statystycznie różnic nie poddajemy dalszej analizie.

W rozdziale 4.6. (str. 83) Doktorantka używa niezręcznych określeń „opryskiwano za pomocą ABA” czy też później „Traktowanie roślin za pomocą H_2O_2 ”. Ale to kwestia stylistyki.

Dyskutując wyniki uzyskane z pomiarów sprawności PSII, Doktorantka momentami sama sobie zaprzecza. Po pierwsze, jak napisałem już wcześniej, **statystycznie istotne zmiany** parametru F_v/F_m wynoszą ok. 2%, a parametru $Y(II)$ ok. 5%. To mało i nie mówiłbym raczej o fotoinhibicji PSII. Po drugie w rozdziale 4. pt. „Wyniki” Doktorantka stwierdza brak statystycznie istotnych zmian parametru NPQ, a w dyskusji napisała o pewnej tendencji wzrostowej „wygaszania niefotochemicznego co może ilustrować lekki stres”. Omawiając z kolei zmiany w proporcjach fotoukładów PSI/PSII Doktorantka napisała, że po opryskaniu ABA uwidoczono lekki wzrost udziału fluorescencji z PSII, jednakże analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic (str. 92), a kontynuując ten wątek przypuszcza, że może to świadczyć o tym, iż „kwas abscysynowy w pewnym stopniu zmienia proporcje anten obu fotoukładów”. Ponieważ już wcześniej wyraziłem swoją opinię o nadinterpretowaniu nieistotnych statystycznie zmian, napiszę jedynie, że nie podzielam tej opinii.

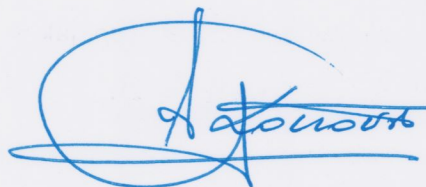
Jakby wbrew temu niezdecydowaniu prezentowanemu podczas dyskusji niektórych wyników Doktorantka stawia poprawne, zdecydowane tezy w streszczeniu pracy. W tym kontekście trochę szkoda, że Autorka nie spuentowała manuskryptu sformułowaniem wniosków końcowych, ale nie jest to zarzut – nie ma takiego obowiązku.

Podsumowanie

Manuskrypt został przygotowany bardzo starannie, a pojawiające się czasami błędy w pisowni są ewidentnie spowodowane przez program automatycznej korekty tekstu.

Zamieszczone w recenzji uwagi polemiczne mają stanowić kanwę do dyskusji naukowej z Doktorantką i nie wynikają z błędów merytorycznych popełnionych podczas prowadzenia badań. Reasumując, przedstawiona do oceny praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też stwierdzam, że praca pt.: **„Molekularne aspekty oddziaływania kwasu abscysynowego na alternatywny szlak oddechowy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*)”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669).

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Wiolety Kupis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Skoczowski