



dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka

Poznań, 27.12.2019 r.

Zakład Fizjologii Roślin

Wydział Biologii

Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

ul. Umultowska 89,

61-614 Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Ernesta Skowrona pt.: „Fizjologiczne i molekularne podstawy inhibicji starzenia liści *Hordeum vulgare* L. w odpowiedzi na traktowanie cytokininami”**

**Wprowadzenie**

Hormony roślinne regulują behavior roślin w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Grupa cytokinin (CK) stanowi jedną z licznych grup regulatorów będących w zasobach biochemicznych roślin. Badania nad cytokininami dostarczyły wyjaśnienia wielu aspektów dotyczących funkcjonowania roślin. W szerokim spektrum działania cytokinin znajduje się m.in. regulacja procesu fotosyntezy. Dość dobrze opisana w literaturze uruchamiana przez cytokininy stymulacja podziałów komórkowych idzie w parze z promowaniem wydajności fotosyntetycznej. Obie te cechy są znaczące dla uprawy. Podłoże metaboliczne tych zjawisk nie zostało w pełni rozpoznane. Istnieje zatem pilna potrzeba wypełnienia luki w badaniach cytokininy vs fotosynteza i wykorzystanie tej wiedzy w poprawie jakości i wielkości uzyskiwanego plonu. Praca doktorska podjęta przez Doktoranta wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badań.

**Ocena szczegółowa dysertacji**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Ernesta Skowrona jest opracowaniem obszernym, zawartym na 300 stronach maszynopisu, zawiera 28 rycin złożonych, 11 tabel, szereg zdjęć i schematów. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje



istotne części składowe tj. wstęp, przegląd literatury, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz 699 cytowań, głównie pozycji, w tym najnowszych, literatury anglojęzycznej. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów. Napisana jest w formie przyjętej dla prac naukowych.

Praca wykonana była pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Ewy Niewiadomskiej, w Zakładzie Ochrony Przyrody i Fizjologii Roślin Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, stanowi kontynuację wieloletnich badań Jej zespołu nad biologią roślinnego stresu. W związku z faktem, że straty plonów wywoływane przez stresy środowiskowe są istotne nie tylko dla gospodarki polskiej, ale także światowej, wybór tematyki rozprawy doktorskiej dokonany przez Promotora i Doktoranta w aspekcie biologii stresu, którego konsekwencją jest starzenie rośliny, uważam za uzasadniony, tak ze względów naukowych jak i aplikacyjnych. W świetle obecnych badań nad poprawą wydajności i jakości plonu, pogłębienie wiedzy nad regulatorami procesu starzenia indukowanego stresem, a także leżący u jego podstaw mechanizm molekularny, wydaje się mieć charakter priorytetowy. Zrozumienie mechanizmu cytokininowej regulacji i sieci regulacyjnych w tym procesie w mojej opinii może być potencjalnym narzędziem do dalszego, praktycznego wykorzystania. Tego typu badania wskazują na możliwość wykorzystania naturalnych mechanizmów biochemicznych rośliny i mogą mieć znaczenie w opracowaniu kolejnych markerów fizjologicznych i molekularnych wspomagających planowanie nowych strategii uprawnych.

**Nadrzędnym celem pracy** było dostarczenie nowych informacji dotyczących fizjologicznych i molekularnych podstaw opóźnienia procesu starzenia liści jęczmienia w odpowiedzi na egzogennie podane cytokininy.

Po przeczytaniu rozprawy należy się zastanowić, zadać pytanie czy cel pracy miał inny np. szerszy aspekt? Czy przez zwrot „w wyniku oddziaływania cytokinin”, nasuwa się pytanie jakich oddziaływań, z czym, Doktorant chciał wyrazić coś więcej niż, że badał reakcje fizjologiczne i molekularne zmiany w starzejącym się organie w odpowiedzi na egzogennie podane hormony?

Część teoretyczna pracy, czyli **Wstęp i przegląd literaturowy**, są napisane komunikatywnie i świadczą o bardzo dobrej, znajomości przez doktoranta literatury. Wstęp nie jest jednak napisany rzeczowo. Sposobem właściwym porządkowania informacji w tej części pracy jest przyjęcie struktury zagadnieniowej dlatego, że w istocie rzeczy chodzi o ujawnienie problemów, sposobów ich badania i wyciąganych wniosków, które były podejmowane w pracach opublikowanych w różnych okresach czasu. W rozdziale tym należy porządkować treści w sposób doprowadzający czytelnika do pytań, które są problemami współczesnej nauki, a których rozwiązania Doktorant podejmuje się w swojej pracy. We wstępie pojawiają się w bardziej niż ogromnej ilości informacje, które nie stanowią w żaden sposób punktu wyjścia dla postawionego przez Doktorantka celu pracy.

W rozdziale **Materiały i metody** bardzo precyzyjnie scharakteryzowano materiał badawczy i opisano traktowanie liści jęczmienia. Przedstawiony w tym rozdziale schemat układu badawczego (Ryc.2) ułatwia czytelnikowi zrozumienie i pozwala na prześledzenie kolejno podejmowanych etapów badań. Opisy protokołów badań są szczegółowe. Dla lepszej czytelności są zebrane w tabele i zilustrowane graficznie. Opisy kończą się informacją o sposobie pobrania prób materiału biologicznego oraz jego przechowywania do czasu analiz. To samo dotyczy uzyskania danych w postaci cyfrowej w systemach rejestracji i archiwizacji danych fenotypowych, gdzie dokładnie Doktorant określa sprzęt użyty do badań (i oprogramowanie), rodzaj badanego parametru, częstość próbkowania, sposób kalibracji, zakres wartości, sposób filtrowania sygnału i wszelkie przeliczenia na rejestrowanym sygnale.

Niedosyt informacji niesie ze sobą jedynie:

- Dlaczego do badań wybrano światło o natężeniu  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD. Takie natężenie światła przez wielu eksperymentatorów jest uważane za stresowe dla jęczmienia. Autor pracy bardzo dokładnie podaje skład spektralny światła. Czy działanie stresowe lub niestresowe światła może zależeć od jego składu spektralnego?



- Nie podano masy wyjściowej liści używanej do uzyskiwania "proszku liściowego", co może być dość użyteczną informacją, biorąc pod uwagę, że w kolejnym kroku jest napisane, że używano 200mg tego proszku do dalszych etapów izolacji białka.
- Napisane jest, że preparat białkowy zmieszany z buforem próbkowym inkubowano w 95 st. C przez 5 min. 5 min - to dość długo - mogą wtedy powstawać agregaty białkowe. Czy agregaty były obserwowane?
- Jest napisane, że dokonywano analizy Coomasie Brilliant Blue (CBB) - analizowano to ilość RuBisCo w żelu po wybarwieniu CBB.
- Czy analizowane po barwieniu ścieżki białkowe były w jakiś sposób porównywane w celu sprawdzenia, czy rozdzielane były te same ilości białek (coś w rodzaju loading control) - nakładano na ścieżki te same ilości białka totalnego, ale to jeszcze niczego nie dowodzi.
- Nie rozumiem co to znaczy, że uzyskane z densytometrii prążków białkowych dane "przeliczano na zawartość białka".
- „Ocena natężenia peroksydacji lipidów błonowych” czy „Analiza szlaku sygnałnego CK w procesie starzenia liści” – nie są metodami.

Rozdział **Wyniki** jest pełnym, obiektywnym opisem uzyskanych wyników. Dla lepszej przejrzystości tekst został podzielony na podrozdziały, zaczynając od ustaleń metodycznych, paragrafy dotyczące: wyboru form CK do badania procesu starzenia metodą DIS oraz monitoring odmian uprawnych jęczmienia pod kątem szukania fenotypu stay-green, Doktorant kolejno przechodzi do opisu właściwych analiz, które w swoim założeniu powinny doprowadzić Go do osiągnięcia celu.

Po przeczytaniu opisu wyników chciałabym zapytać o zasadność wyboru białkowego markera starzenia i o stopień zaawansowania procesu, w którym były przeprowadzane analizy. Doktorant wybiera jako marker starzenia białko SAG12. Jak ujmuje w Dyskusji „SAG12 jest



specyficznym białkiem markerowym procesu aktywowanym w późnym etapach tego procesu, a jego akumulacja pozostaje w ścisłej korelacji z poziomem CK”. W mojej opinii zasadnym dla całości dysertacji byłoby zbadanie endogennego poziomu cytokinin u analizowanych odmian. Chcę zapytać czy w analizowanym układzie 72-godzina oznacza późny etap procesu starzenia? Czy można by było zastosować inny niż SAG12 marker białkowy, który w połączeniu z tym pierwszym dałby informację o stopniu zaawansowania procesu? Dodam tylko, że Doktorant zanim dotarł do analizy białka SAG12 miał w swojej kolekcji wyników jeden z lepszych markerów starzenia a mianowicie poziom ETR. Wzorzec/profil ETR jest powszechnie uznawany za doskonały marker stopnia zaawansowania tego procesu.

Wyniki badań są poparte dobrze dobranymi testami statystycznymi pozwalającymi określić czy prezentowane w wynikach różnice są rzeczywiście statystycznie istotne. Taka analiza statystyczna pozwoliła Doktorantowi na porównanie wielu grup między sobą. Mam drobną sugestię aby literę „a” przypisywać zawsze najwyższej wartości na danym wykresie i kolejne litery słupkom o malejących wartościach. Taki sposób opracowania mówi nie tylko o istotności statystycznej wyników, ale dobrze koresponduje z ich opisem.

W rozdziale **Dyskusja** Autor w sposób kompleksowy i bardzo wnikliwy analizuje otrzymane wyniki, konfrontując je z najnowszymi danymi literaturowymi dotyczącymi poruszanych zagadnień. Doktorant wyszedł w Dyskusji od własnych szczegółowych wyników, ale zbyt nie dążył do uogólnień, do formułowania praw biologicznych. W tym miejscu pracy warto pochwalić się, że coś właśnie zostało zaobserwowane i opisane po raz pierwszy i co nowego wnoszą wyniki w tej pracy do wiedzy w badanej dziedzinie. Błędem w konstrukcji Dyskusji jest powtarzanie jeszcze raz tego co zostało napisane w Wynikach, choćby nawet innymi słowami. Dyskusja nie nakreśla, a mogłaby, perspektywy uprawianego kierunku na przeszłość. Eleganckim zakończeniem pracy mogła by być również graficzna prezentacja badanych mechanizmów w postaci oryginalnego schematu lub uzupełnienie o nowe elementy dotąd obowiązującego.



**Wnioski** - ten rozdział jest krótki, przedstawiony w 13 punktach. Z zasady rozdział ten, powinien być przedstawieniem wniosków płynących z uzyskanych wyników jak i uogólnień z przeprowadzonej dyskusji. Doktorant raczej podsumowuje wyniki niż wnioskuje.

Uwaga: jedno z ważniejszych pytań, które stawiała sobie recenzentka studiując pracę było: czy cele pracy zostały osiągnięte i czy wnioski korespondują z wytyczonymi celami? Takiej odpowiedzi jasno nie uzyskałam. Doceniam jednak ogrom pracy włożony przez Doktoranta w przeprowadzone badania i pisemne przygotowanie rozprawy.

W odniesieniu do całej pracy należy stwierdzić niezwykłą poprawność redakcyjną. Szata graficzna pracy jest bardzo staranna. Język poprawny. Autor nie ustrzegł się pewnych nieścisłości czy błędów edytorskich, które nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy. Z powinności recenzentki uwagi te przekazałam Autorowi osobiście. Budowa rozdziałów nie budzi zastrzeżeń, w przeciwieństwie do numeracji rozdziałów, podrozdziałów czy paragrafów. Również w odniesieniu do całej pracy chciałabym podkreślić, że należy akceptować poglądy, że treść pracy naukowej to ściśle sprawozdanie naukowe napisane językiem jasnym, czego Doktorantowi gratuluję, ale też i zwięzłym. W tym miejscu pozwolę sobie zacytować doskonałą myśl Woltera: „An article is finished not when there is nothing more to add, but when there is nothing more that can be taken away”.

W podsumowaniu stwierdzam, że treść i forma przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Praca stanowi element nowości naukowej w dociekaniach nad poznaniem mechanizmu działania cytokinin w obszarze szlaku sygnałowego: fosfolipaza D - tlenek azotu - zewnątrzkomórkowa inwertaza, w indukowanym stresem procesie starzenia liścia u kilku odmian jęczmienia wykazujących różną cytkinino-zależną wrażliwość w badanym procesie i w konsekwencji charakteryzujących się różnym efektem Richmonda-Langa, czyli tempem opóźniania starzenia, co uważam jednocześnie za najważniejsze osiągnięcie recenzowanej pracy. Efekt ten badano głównie w obszarze budowy i funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Ponadto, w rozprawie po raz



pierwszy opisano nienotowany uprzednio fenotyp stay-green u odmiany jęczmienia o nazwie Bursztyn.

**Wniosek końcowy**

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pana mgr. Ernesta Skowrona wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Ewa Sobieszczuk-Nowicka*  
dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka