



Prof. Piotr Młynarz
Katedra Biochemii,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 20.01.2025 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Kafki zatytułowanej: „Zastosowanie badań fosforomicznych w ocenie kondycji roślin”

Niniejsza rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kafki została zrealizowana w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem Pana prof. Jacka Lipoka oraz Pani dr Doroty Wieczorek jako promotora pomocniczego. Jak jest powszechnie wiadomo Pan Profesor Jacek Lipok jest ekspertem z zakresu chemii ekologicznej, który ciągle rozwija tę tematykę o nowe aspekty, w tym przypadku biochemię i fizjologię roślin w ujęciu omicznym.

Opracowanie fizjologii roślin w zależności od różnych czynników zewnętrznych stanowi obszar wiedzy, który pomimo wielu prowadzonych badań wciąż do końca nie jest poznany. Dobór odpowiednich warunków hodowli, może być ważny z punktu widzenia rozwijających się kontrolowanych upraw hydroponicznych, w których większość czynników wpływających na nie może być odpowiednio zoptymalizowana. I właśnie w tym ujęciu charakterystyka metabolizmu związków zawierających atomy fosforu, wydaje się być kluczowym elementem.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została napisana w tradycyjnym stylu akademickim. Dokument zawiera kolejno „Wstęp”, „Cel pracy”, „Metodykę”, „Omówienie i dyskusję wyników”, „Wnioski” oraz rozdziały „Streszczenie”, w języku polskim i angielskim, „Bibliografię” i „Dorobek naukowy”.

Wstęp pracy jest bardzo dobrze napisany i stanowi gotowy materiał przeglądowy, który opisuje rolę związków fosforu w metabolizmie roślin. Autorka dysertacji omawia zarówno nieorganiczne, jak i organiczne pochodne fosforu, występujące w roślinach, a także metody oceny ich kondycji fizjologicznej. W ostatnim podrozdziale Doktorantka przedstawia charakterystykę czynników wpływających na wybrane aspekty fizjologii roślin, wskaźniki stosowane w ocenie ich kondycji oraz fosforomikę, rozumianą w tym kontekście jako specjację związków zawierających fosfor w organizmach roślinnych.

Drugi w kolejności rozdział to „Cel pracy”. Doktorantka wyznaczyła sobie za cel opisanie przemian związków fosforoorganicznych w komórkach i tkankach roślin, uzasadniając to faktem istnienia luki literaturowej w tej materii. W ramach tych prac zostały podjęte przez mgr inż. Annę Kafkę następujące zadania: opracowanie skutecznej procedury wyodrębniania stabilnych połączeń fosforu z homogenatów roślinnych (tu rozumiem stabilnych związków zawierających atomy fosforu w ekstraktach roślinnych); oznaczenie połączeń

fosforoorganicznych, poprzez profile fosforowe w ekstraktach uzyskanych z nasion roślin za pomocą technik ^{31}P NMR; oznaczenie wybranych wskaźników odpowiedzi roślin modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych i w warunkach stresu fizjologicznego wywołanego czynnikami fizycznymi, bądź obecnością stresorów chemicznych; tworzenie profili związków fosforowych organizmów modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych i stresowych; oznaczenie ufosforylowanych nukleotydów adeninowych w homogenatach wybranych roślin modelowych oraz ustalenie adenylowanego ładunku energetycznego (AEC); analiza statystyczna uzyskanego zbioru danych obejmujących dane o rozwoju testowanych organizmów w określonych warunkach wzrostu oraz intensywności działania stresorów, pod kątem zależności pomiędzy tymi grupami zmiennych.

Trzeci rozdział to „Metodyka”. Jest to rozdział, w którym Doktorantka opisała dokładnie warunki przeprowadzonych eksperymentów, pozwalając tym samym na ich ewentualne odtworzenie. Jednakże w prezentowanym opisie metodyki zabrakło mi sposobu normalizacji widm ^{31}P NMR dla możliwości ich bezpośredniego porównywania na załączonych w pracy rysunkach. Oprócz tego uważam, że zastosowanie analizy PCA, lub metody bardziej zaawansowanej PLS-DA, do interpretacji danych z przeprowadzonych doświadczeń mogłoby się przyczynić do jeszcze szerszego spojrzenia na otrzymane wyniki.

Rozdział zatytułowany „Omówienie wyników i dyskusja” zawiera wyniki, uzyskane podczas eksperymentów w połączeniu z danymi literaturowymi w sposób nadto szczegółowy, a przez to mało przejrzysty. Według recenzenta, sekwencyjne przedstawienie wyników badawczych, a następnie ich dyskusja w kontekście doniesień literaturowych korzystnie wpłynęłaby na klarowność rozprawy doktorskiej. Choć struktura i styl pracy są indywidualnym wyborem każdego doktoranta, takie podejście jest raczej zalecane dla lepszego zrozumienia prezentowanych zagadnień.

W pierwszej części rozprawy doktorskiej zdefiniowano profil specjacji fosforu, obejmujący związki zawierające ten pierwiastek w nasionach roślin z rodzajów szarłatowatych, selerowatych, astrowatych, kapustowatych, dyniowatych, bobowatych, wiechlinowatych i psiankowatych. Widma spektroskopii ^{31}P NMR podzielono na pięć obszarów odpowiadających związkom fosforoorganicznym oraz fosforonieorganicznym. Kluczowym elementem prezentującym wyniki eksperymentu jest Rysunek 28, przedstawiający macierzową analizę skupień hierarchicznych w formie mapy ciepła dla różnych typów nasion. Szczególnie istotnym osiągnięciem tej części badań było udowodnienie obecności naturalnych związków fosfonowych, zwłaszcza w nasionach roślin selerowatych, astrowatych i kapustowatych. Omawiany fragment rozprawy może stanowić fundament i inspirację dla przyszłych badań nad strukturami związków występujących w tych nasionach.

W kolejnym podrozdziale przeprowadzono analizę zawartości fosforanu nieorganicznego (Pi), kwasu fitynowego, aktywności enzymatycznej fitaz, białka, nukleotydów adeninowych, barwników fotosyntetycznych oraz związków o właściwościach antyoksydacyjnych w kiełkach rzodkiewki i ogórka, rozwijających się w warunkach optymalnych. Pierwszy analizowany parametr dotyczył wpływu warunków oświetlenia na kiełkowanie i kondycję nasion rzodkiewki. Dodatkowo, zbadano dynamikę kiełkowania

nasion rzodkiewki jako rośliny modelowej. Zmiany parametrów biochemicznych w odpowiedzi na różnorodne warunki oświetlenia przedstawiono na Rysunku 30, grupując je w cztery klastry. Przedstawione wyniki wykazują zależności pomiędzy badanymi parametrami biochemicznymi a zastosowanym oświetleniem. Szczególnie interesujące było zwiększenie zawartości AMP w pierwszym klastrze, obejmującym światło fioletowe dla okresu 2-4 DAT, niebieskie i żółte światło dla 2-3 DAT, białe o zimnej barwie dla 2 DAT oraz czerwone dla 4 DAT. Równocześnie zaobserwowano umiarkowany wzrost zawartości ATP, białka i antyoksydantów, przy jednoczesnym spadku zawartości Pi i barwników fotosyntetycznych w porównaniu z próbkami kontrolnymi.

W trakcie dalszych eksperymentów opisano wpływ jonów metali na kiełkowanie oraz kondycję kiełków rzodkiewki. Analogicznie do poprzednich badań, określono profil zmian badanych markerów biochemicznych w zależności od stężeń jonów Zn(II), Cu(II), Mn(II) o wartościach 0,5 μ M, 5 μ M oraz 50 μ M. Zgodnie z wynikami analizy skupień, którą Autorka podzieliła na cztery klastry. Pierwszy klaster obejmował jony Zn(II) i charakteryzował się zwiększoną zawartością ATP oraz zmniejszoną zawartością związków o działaniu przeciwutleniającym. Drugi klaster zawierał jony Zn(II) i Cu(II) i odznaczał się obniżoną zawartością antyoksydantów, ale zwiększoną zawartością AMP. Trzeci klaster, głównie zawierający jony Cu(II), charakteryzował się zwiększoną aktywnością fitaz i obniżoną zawartością antyoksydantów. Czwarty klaster zawierał głównie jony Mn(II), gdzie zaobserwowano obniżenie zawartości fosforanów nieorganicznych (Pi) i nukleotydów adeninowych, a także zmniejszenie aktywności fitaz. Klaster piąty zawierał informacje dotyczącą początkowych dni hodowli z jonami Cu(II), które zwiększały aktywności fitaz oraz zawartość nukleotydów adeninowych. Przeprowadzone badania wykazały, że dzięki obecności różnych jonów metali można modulować zawartości substancji o działaniu antyoksydacyjnym oraz regulować gospodarkę energetyczną komórki.

Ostatnia część pracy koncentruje się na wpływie preparatów fungicydowych, Scorpio 325 SC (SCO) oraz Magnicur Finito 687,5 SC (MAG), na kiełkowanie i kondycję siewek ogórka. W wariantcie pierwszym zastosowano przedsięwzięcie zaprawione nasiona ogórka, określono profil związków zawierających fosfor oraz przeprowadzono analizę fosforanów nieorganicznych (Pi), kwasu fitynowego, aktywność fitazy oraz zawartości białka w ekstraktach uzyskanych z kiełkujących nasion. Zbadano również zawartość nukleotydów adeninowych oraz wartość parametru AEC. Sprawdzono także dynamikę kiełkowania nasion. Drugi wariant obejmował dolistne aplikacje fungicydów, co umożliwiło analizę części nadziemnej siewek ogórka traktowanych preparatami grzybobójczymi. W ramach tego fragmentu pracy określono specjacje związków zawierających fosfor, przeprowadzono analizę zawartości nukleotydów adeninowych oraz AEC. Określono również zawartości barwników fotosyntetycznych, aktywność przeciwutleniającą oraz zawartość antyoksydantów. W podsumowaniu, Doktorantka sporządziła mapy ciepła, analogicznie do poprzednich fragmentów pracy dla obu wariantów, bez osobnego rozróżniania efektów dla poszczególnych fungicydów. Analiza wariantu pierwszego pozwoliła na wyodrębnienie trzech klastrów. Największe zmiany zaobserwowano w aktywności fitaz w zależności od czasu trwania hodowli oraz stosowanych preparatów. Dla drugiego wariantu przeprowadzona analiza pozwoliła

również na wyodrębnienie trzech klastrow, wśród których największe różnice były widoczne w zawartości nukleotydów adeninowych, związków fenolowych oraz potencjału antyoksydacyjnego.

Podsumowując przeprowadzone badania stwierdzam, że są one bardzo cenne i celowe. Mogą być wykorzystywane w prowadzeniu kontrolowanych hodowli roślin. Pani mgr inż. Anna Kafka doskonale opanowała trudny dla chemika warsztat hodowli roślin oraz analiz parametrów biochemicznych i chemicznych. Niemniej w niniejszej pracy zabrakło mi analiz chemometrycznych, które bazowałyby jedynie na widmach ^{31}P NMR, a które pozwoliłyby na przypisanie określonych sygnałów pochodzących od atomów fosforu do zmian jakościowych i ilościowych związków fosforoorganicznych i fosforonieorganicznych.

Całościowy dorobek naukowy Pani mgr inż. Anny Kafki obejmuje 3 prace naukowe opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz jedna opublikowana w języku polskim w materiałach poseminaryjnych „Na pograniczu chemii i biologii”. Doktorantka 12 razy prezentowała swoje wyniki na konferencjach, brała udział w warsztatach i szkoleniach, aktywnie uczestniczyła w realizacji prac magisterskich w formie wsparcia technicznego, była współorganizatorką warsztatów, seminariów oraz konferencji naukowych. Doktorantka była kilkakrotnie wyróżniona Nagrodą Rektora Uniwersytetu Opolskiego. Całościowo oceniam aktywność naukową Pani mgr inż. Anny Kafki wysoko.

Jak zwykle na sam koniec recenzji powinienem dodać, że nie mam w zwyczaju wskazywania w pracy ani na błędy językowe, ani na niedociągnięcia edytorskie np. na prezentowanych rysunkach, ponieważ nie wpływają one na jej merytoryczną zawartość.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kafki spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy - tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.