

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: **Zastosowanie badań fosforomicznych w ocenie kondycji roślin**

Autor: **mgr inż. Anna Kafka**

Promotor: **Prof. dr hab. Jacek Lipok**

Promotor pomocniczy: **Dr Dorota Wieczorek**

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska powstała w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Jacka Lipoka – wybitnego specjalisty w dziedzinie agronomii i chemii ekologicznej, a funkcję promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej pełniła Pani dr Dorota Wieczorek.

Dysertacja doktorska Pani mgr inż. Anny Kafki koncentruje się na badaniach fosforomicznych, dzięki którym możliwe jest określenie potencjału rozwojowego organizmu, zakresu wpływu stresu fizjologicznego na stan energetyczny organizmu czy charakteru oddziaływania badanych czynników fizykochemicznych.

Niniejsza rozprawa doktorska jest opracowaniem liczącym 173 strony, układ pracy jest typowy dla tego typu prac doktorskich. Zasadniczy tekst został podzielony na 5 rozdziałów: I. Wstęp; II. Cel pracy; III. Metodyka; IV Omówienie i dyskusja wyników; V. Wnioski. Poza 5 rozdziałami praca zawiera jeszcze wykaz stosowanych skrótów; streszczenie pracy napisane w języku polskim i angielskim; bibliografię oraz dorobek naukowy Kandydatki. Dużą zaletą recenzowanej dysertacji doktorskiej jest fakt, że została ona przygotowana w bardzo poręcznym formacie B5. Praca sprawia bardzo dobre wrażenie ze względu na fantastyczną stronę wizualną. Jest ona opatrzona bardzo dobrze zaprojektowanymi rysunkami i tabelami, co w moim odczuciu znacząco ułatwia zrozumienie tekstu. We wstępie rozprawy doktorskiej Kandydatka w sposób wnikliwy i atrakcyjny przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat rodzajów związków fosforu i ich roli w metabolizmie roślin, a także kondycji fizjologicznej roślin i ich metod oceny. Kandydatka we wstępie uwzględniła najnowsze doniesienia literaturowe i napisała go w oparciu o 178 pozycji literaturowych, które dobrała w sposób

odpowiedni i staranny. W tym miejscu chciałabym szczególnie docenić zaprezentowane przez Kandydatkę w sposób bardzo ciekawy, a zarazem oryginalny schematy, które zdecydowanie ułatwiają poznanie np. przebiegu procesu pobierania fosforanów przez korzenie, transportu do nadziemnych części rośliny oraz dystrybucji w organellach komórkowych czy też poznanie procesu percepcji i transdukcji sygnału wywołanego stresem środowiskowym, prowadzącego do ekspresji genów i odpowiedzi metabolicznej komórki. Przeczytałam tę część dysertacji doktorskiej z dużym zainteresowaniem i oceniam go wzorowo.

Dzięki informacjom zawartym we wstępie dysertacji doktorskiej Kandydatka wskazała „białą plamę” w literaturze, tzn. pokazała, że w literaturze światowej brakuje informacji na temat kluczowej roli fosforu w metabolizmie roślin przy jednoczesnym braku informacji na temat przemian związków fosforoorganicznych, w komórkach i tkankach roślin. Na tej podstawie za cel główny dysertacji doktorskiej Kandydatka postawiła sobie zbadanie możliwości zastosowania badań fosforomicznych w określeniu kondycji roślin. Cel główny pracy został precyzyjnie przez Kandydatkę sprecyzowany i jednocześnie uszczegółowiony poprzez wskazanie celów szczegółowych w oparciu o zadania badawcze. Część badawcza pracy została podzielona na cele szczegółowe obejmujące:

- 1) opracowanie procedury wyodrębniania stabilnych połączeń fosforu z homogenatów roślin;
- 2) oznaczenie połączeń fosforoorganicznych;
- 3) oznaczenie wybranych wskaźników odpowiedzi roślin modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych i w warunkach stresu fizjologicznego wywołanego czynnikami fizycznymi (barwa światła), bądź obecnością stresorów chemicznych (jony metali, preparaty fungicydowe);
- 4) tworzenie profili fosforowych organizmów modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych oraz stresowych;
- 5) oznaczenie ufosforylowanych nukleotydów adeninowych w homogenatach wybranych roślin modelowych wraz z ustaleniem adenylowego ładunku energetycznego (AEC);

- 6) analizę statystyczną uzyskanego zbioru danych obejmującego dane o rozwoju testowanych organizmów w określonych warunkach wzrostu oraz intensywności działania stresorów, pod kątem zależności pomiędzy tymi grupami zmiennych.

Wybór oraz kolejność realizacji celów szczegółowych są moim zdaniem bardzo dobrze przemyślane. Wyznaczone zadania badawcze zostały zaproponowane w sposób logiczny i na ich podstawie można „krok po kroku” prześledzić sposób myślenia Kandydatki. Do realizacji celów szczegółowych Doktorantka wykorzystała szereg metod doświadczalnych, w tym zastosowała takie techniki jak np. spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego – technika ^{31}P NMR, która pozwoliła na stworzenie profili fosforowych. Z kolei wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) Kandydatka zastosowała w celu oznaczenia zawartości ufosforylowanych nukleotydów adeninowych (ATP, ADP i AMP) i na tej podstawie ustaliła status energetyczny, a szczególnie intensywność procesów kata- lub anabolicznych zachodzących w roślinach poddanych działaniu wybranych stresorów. W mojej opinii, Pani mgr inż. Anna Kafka dzięki zastosowaniu wielu różnych metod doświadczalnych oraz technik badawczych udowodniła bardzo dobre przygotowanie do prowadzenia samodzielnie badań eksperymentalnych, a także pokazała wzorowe rozeznanie i umiejętność doboru odpowiednich technik lub metod eksperymentalnych do danego zadania badawczego. Podsumowując część metodyczną dysertacji doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie postawionego celu naukowego, a jednocześnie dostarcza cennych i wartościowych zarówno przesłanek jak i wskazówek do zastosowań praktycznych.

Wyniki wszystkich badań Kandydatka przedstawiła w sposób logiczny i wyczerpujący. Zarówno sposób przeprowadzenia badań, jak i interpretacja otrzymanych wyników są prawidłowe i w mojej opinii nie budzą zastrzeżeń. Kandydatka na podstawie otrzymanych wyników badań potwierdziła skuteczność opracowanych i zastosowanych procedur wyodrębniania stabilnych połączeń związków fosforu z nasion wybranych gatunków roślin, a także z homogenatów roślin modelowych, które poddane były działaniu stresorów. Opracowała również profile fosforowe roślin rozwijających się w warunkach optymalnych i stresowych i na tej podstawie potwierdziła naturalne występowanie związków fosfonowych

w nasionach roślin. Uważam to za duży sukces Kandydatki z tego względu, że do tej pory w literaturze na ten temat jest niewiele danych, a otrzymane wyniki badań przez Kandydatkę zdecydowanie poszerzą wiedzę na temat związków fosforu obecnych w roślinach. Z kolei dzięki wykonanym analizom chemometrycznym można zaobserwować zależności pomiędzy oznaczanymi markerami kondycji roślin, a wrażliwością roślin na badany czynnik stresowy. Na tej podstawie Kandydatka wyciągnęła wniosek, że analiza statystyczna wybranych parametrów biochemicznych potwierdziła, że badania metabolomiczne dostarczają nowych narzędzi w diagnostyce metabolizmu i określaniu kondycji roślin, w szczególności z zakresu badań fosforomicznych.

Moja ocena recenzowanej dysertacji jest bardzo wysoka. Jednakże przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kafki nasunęły mi się też pewne uwagi, sugestie i pytania, na które prosiłabym Kandydatkę o odpowiedź podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Bardzo dziękuję.

- 1) Na stronie 49 Autorka napisała, że w badaniach dotyczących określenia wpływu preparatów fungicydowych na kiełkowanie oraz kondycję kiełków i siewek ogórka zastosowała dwa komercyjnie dostępne preparaty fungicydowe: Scorpion 325 SC (Agrecol) oraz Magnicur Finito 687,5 SC (Protect Garden, Bayern). Dla Magnicur Finito Kandydatka podała zawartość substancji czynnych w %, ale brak informacji o jednostkach (wagowych lub objętościowych). W przypadku Scorpion 325 SC Kandydatka podała inną jednostkę ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), co w mojej opinii może wprowadzać zamieszanie przy interpretacji wyników. Uważam, że warto ujednolicić sposób prezentacji. W tym punkcie brakuje mi też informacji o potencjalnych różnicach w mechanizmach działania zastosowanych fungicydów. W mojej opinii może to być istotne podczas interpretacji otrzymanych wyników badań.
- 2) Na stronie 56 przy opisie kolumny Phenomenex Gemini brakuje mi informacji na temat zalet stosowania tej kolumny dla rozdziału nukleotydów (np. stabilności, odpowiedniego zakresu polarności).
- 3) Na stronie 72 Kandydatka pokazała, że zmiany aktywności fitaz w nasionach ogórka i rzodkiewki były związane z zawartością białka. W mojej opinii warto wyjaśnić, czy

zmiany w aktywności fitaz są zależne od obecności nawozu np. zawartości jonów metali lub od światła i czy istnieją inne czynniki, które mogą wpływać na aktywność tego enzymu. Czy wzrost aktywności fitaz jest związany z etapem rozwoju nasion?

- 4) Jakie mechanizmy mogą tłumaczyć wzrost zawartości AMP, ADP i ATP w kiełkujących nasionach ogórka w miarę upływu czasu? Czy jest to efekt związany z intensywniejszym metabolizmem energetycznym podczas kiełkowania?
- 5) Co może wyjaśniać znaczny wzrost zawartości antyoksydantów w kiełkach rzodkiewki (do $10,89 \pm 0,20$ mg Troloksu g^{-1} s.m.) po czterech dniach kiełkowania, zwłaszcza w obecności Cu? Jakie mechanizmy metaboliczne mogą tłumaczyć tę reakcję na obecność miedzi w podłożu?
- 6) Co może tłumaczyć istotne różnice w zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki, szczególnie w odniesieniu do światła fioletowego i żółtego, które prowadziły do niższych wartości Pi? Jakie znaczenie mają te wyniki w kontekście wykorzystania różnych rodzajów światła w hodowli roślin?
- 7) Czy autorzy uwzględnili możliwe interakcje pomiędzy różnymi rodzajami związków przeciwutleniających (np. flawonoidy vs. glukozytolany) w analizowanych kiełkach rzodkiewki?
- 8) W mojej opinii we wnioskach warto było dodać informacje, w jaki sposób otrzymane wyniki mogą wpłynąć na przyszłe badania w dziedzinie metabolomiki roślin, szczególnie w kontekście fosforu. Jakie dalsze kroki w badaniach byłyby niezbędne, aby pogłębić wiedzę na temat metabolizmu fosforu w roślinach, szczególnie w kontekście interakcji z fungicydami i innymi substancjami stresowymi?

Pragnę wyraźnie zaznaczyć, że moje powyższe sugestie i nieliczne krytyczne uwagi w najmniejszym stopniu nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę całości dysertacji doktorskiej przedłożonej mi do recenzji.

W kolejnym etapie poruszę kwestię dorobku naukowego Kandydatki. Pani mgr inż. Anna Kafka jest współautorem 4 publikacji naukowych, w tym 3 anglojęzycznych artykułów opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz 1 polskojęzycznego artykułu

opublikowanego w książce „Na Pograniczu Chemii i Biologii”. W 2 artykułach Kandydatka jest 1 autorem, co w mojej opinii oznacza, że miała Ona bardzo duży udział w tworzeniu tych publikacji. Brała też udział w 12 konferencjach naukowych, w tym na 5 konferencjach przedstawiła wyniki swoich badań w formie wystąpienia ustnego. Wartym uwagi jest również fakt, że Kandydatka była wykonawcą w grantie przyznany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 14, pt. „Profilowanie fosforowe jako metoda oceny rozwoju organizmów w warunkach stresu fizjologicznego – diagnostyka fosforomiczna” nr UMO-2017/27/B/NZ4/00698 (2019 – 2023) jak również była Kierownikiem projektów finansowanych ze środków statutowych przyznanych Doktorantom Instytutu Chemii będącym Słuchaczami Szkoły Doktorskiej UO Wydziału Chemii (2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024). Pani mgr inż. Anna Kafka pełniła również opiekę techniczną w realizacji projektów magisterskich i licencjackich. Brała Ona również czynny udział w warsztatach i szkoleniach, dzięki którym podniosła swoje kwalifikacje zarówno w aspekcie dydaktycznym jak i naukowym. W swoim dorobku Pani mgr inż. Anna Kafka wymieniła też szereg wydarzeń popularyzujących naukę, w których brała czynny udział jako organizator, np. w organizacji zajęć prowadzonych w ramach Szkoły Letniej UO (2021, 2022) czy też organizacji pokazów i warsztatów prowadzonych w ramach Opolskiego Festiwalu Nauki (2019, 2022, 2023). Jest też czynnym członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz European Chemical Society, a także jest laureatką Nagród Rektora Uniwersytetu Opolskiego dla Doktorantów. W mojej opinii tak wielostronna działalność organizacyjna oraz bogate doświadczenie popularyzatorskie bez wątpienia zasługuje na uznanie. Na tej podstawie całokształt dorobku naukowego Kandydatki oceniam bardzo pozytywnie.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana dysertacja doktorska zawiera szereg interesujących wyników, które są innowacyjne i nowatorskie oraz wnoszą nowe elementy do nauki. W mojej opinii Kandydatka prezentuje wysoki poziom naukowy, który wskazuje jednoznacznie na duże odczytanie Kandydatki i umiejętności interpretacji wraz z analizą skomplikowanych wyników, potrafi w sposób dojrzały dyskutować otrzymane wyniki na tle bogato cytowanego piśmiennictwa, a także potrafi poprawnie wyciągać i formułować wnioski z przeprowadzonych eksperymentów. Biorąc pod uwagę całokształt dysertacji doktorskiej

autorstwa Pani mgr inż. Anny Kafki stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. 1669, z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego w Opolu o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kafki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie chciałabym zauważyć, że dysertacja doktorska autorstwa Pani mgr inż. Anny Kafki cechuje się oryginalnością oraz unikalnością zaproponowanej tematyki badawczej wraz z jej bardzo wysokim poziomem naukowym i jednocześnie wyróżniającą się jakością oraz starannością przeprowadzonych badań, dlatego też z czystym przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego w Opolu o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie dysertacji doktorskiej. Jestem przekonana, że będzie to wspaniała inwestycja w rozwój nauki.

**Kierownik Pracowni
Materiałów i Procesów Katalitycznych
Katedra Technologii Środowiska**

Dagmara Jacewicz
dr hab. Dagmara Jacewicz, prof. UG