

Ocena pracy doktorskiej mgr Agnieszki Woźniak pt. „Wpływ ołowiu na generowanie cząsteczek sygnałowych w siewkach grochu (*Pisum sativum* L.) ‘Cysterski’ w odpowiedzi na żerowanie mszycy grochowej [*Acyrtosiphon pisum* (Harris)]”

Zanieczyszczenie środowiska w niektórych rejonach Polski, w znacznym stopniu będące spuścizną minionej epoki, niepokoi nie tylko naukowców ale także coraz szerszą opinię publiczną. Stąd obecność realizowanych projektów badawczych, ukierunkowanych na tą tematykę naukową, których zadaniem jest nie tylko monitoring stopnia dewastacji środowiska lecz także poznawanie związanych z nią procesów oraz znajdujących się u ich podstaw mechanizmów molekularnych. W tym kontekście, jednym z najczęściej badanych czynników abiotycznych są metale ciężkie a szczególnie ołów, przez lata zatruwający środowisko, nie tylko w sąsiedztwie zakładów przemysłowych. Rezultatem jego akumulacji w tkankach roślin i zwierząt są bardzo niebezpieczne, allosteryczne oddziaływania molekularne. W tego typu badaniach używa się również bioindykatorów, służących do pomiaru niebezpiecznego wpływu toksykantów środowiskowych na organizmy żywe. Wśród bezkręgowców, taką rolę spełniają m.in. owady, występujące zarówno w naturalnych jak i sztucznych biocenozach. Tym tropem podążyła Autorka ocenianej rozprawy doktorskiej, która zdecydowała się zbadać wpływ dwóch dawek ołowiu na generowanie cząsteczek sygnałowych w tkankach siewek grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) odm. Cysterski oraz pośredni wpływ tego pierwiastka na żerowanie mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris), groźnego szkodnika tej rośliny.

Przedmiotem postępowania w przewodzie doktorskim mgr Agnieszki Woźniak jest rozprawa doktorska, w postaci monotematycznego, cyklu publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „Wpływ ołowiu na generowanie cząsteczek sygnałowych w siewkach grochu (*Pisum sativum* L.) ‘Cysterski’ w odpowiedzi na żerowanie mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris)”, składającego się z oryginalnego i przeglądowego artykułu naukowego oraz manuskryptu zaakceptowanego do druku, w czasopiśmie *Journal of Plant Physiology*:

- 1) Woźniak A., Drzewiecka K., Kęsy J., Marczak Ł., Narożna D., Grobela M., Motala R., Bocianowski J., Morkunas I. 2017. The influence of lead on generation of signalling molecules and accumulation of flavonoids in pea seedlings in response to pea aphid infestation. *Molecules*, **22**, 1404; doi: 10.3390/molecules22091404. IF = 3,098
- 2) Morkunas I., Woźniak A., Van Ch. Mai, Rucińska-Sobkowiak R., Jeandet P. 2018. The role of heavy metals in plant response to biotic stress. *Molecules*, **23**, 2320; doi: 10.3390/molecules23092320. IF = 3,060

- 3) Woźniak A., Bednarski W., Dancewicz K., Gabryś B., Borowiak-Sobkowiak B., Bocianowski J., Samardakiewicz S., Rucińska-Sobkowiak R., Morkunas I. 2019. Oxidative stress links response to lead and *Acyrtosiphon pisum* in *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Physiology*, doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152996 (przyjęty do druku)

Dwie wieloautorskie prace zostały opublikowane w latach 2017-2018, w tym samym, indeksowanym czasopiśmie *Molecules*, o łącznej wartości IF = 6,158. Mgr Woźniak jest pierwszym autorem w jednej z tych publikacji, a także w zaakceptowanym do druku manuskrypcie. Do prac oryginalnych opracowała hipotezy badawcze, koncepcje badań, zaplanowała i wykonała eksperymenty, dokonała interpretacji wyników oraz przygotowała teksty do druku, co wynika z załączonych oświadczeń współautorów, a Jej udział w przedstawionych do oceny publikacjach wynosił każdorazowo 50%.

Celem prezentowanego cyklu publikacji było zweryfikowanie założonej hipotezy badawczej, w myśl której zastosowane w hydroponikach stężenia ołowiu 0,075 mM i 0,5 mM spowodują zróżnicowaną akumulację tego pierwiastka w tkankach siewek grochu oraz generowanie cząsteczek sygnałowych, co w konsekwencji przełoży się na indukcję reakcji obronnych tej rośliny na żerowanie mszycy grochowej. W kolejnych pracach cyklu (w kolejności chronologicznej) Autorka przedstawiła następujące zagadnienia:

W pierwszej pracy, z roku 2017, wpływ zróżnicowanej dawki pierwiastka na: zawartość ołowiu w tkankach siewek grochu, indukcję generowania cząstek sygnałowych SA i ABA, zmiany poziomu wybranych flawonoidów i aktywności transkrypcyjnej genów warunkujących biosyntezę amoniakolizy fenyloalaniny (PAL) i syntazy chalkonowej (CHS) oraz efekty hormezy i toksyczności ołowiu dla siewek grochu.

W drugiej pracy, z roku 2018, wpływ różnych stężeń metali ciężkich na wzrost i rozwój roślin, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska hormezy. Ponadto, omówiono znaczenie oddziaływań metali ciężkich na roślinne tkanki, w kontekście ich reakcji na biotyczne czynniki stresogenne. W tym kontekście, szczególną uwagę zwrócono na patogeniczne grzyby oraz szkodliwe owady roślinożerne, zwłaszcza mszyce.

W zaakceptowanym do druku manuskrypcie, z roku 2019, zbadano natomiast wpływ zróżnicowanej dawki ołowiu na wybrane parametry stresu oksydacyjnego w tkankach grochu zwyczajnego. Prześledzono zmiany poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, aktywności SOD i izoenzymu Mn-SOD oraz zawartości Mn^{2+} , a także generowanie H_2O_2 , zmiany w aktywności peroksydazy, w utlenianiu lipidów (TBARS) i w całkowitej aktywności antyoksydacyjną (TAC). Zaobserwowane tendencje odniesiono do badanych parametrów bionomii *A. pisum* i zachowania bezskrzydłych samic podczas żerowania (EPG).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że niższe stężenie ołowiu stymulowało wzrost pędów siewek grochu (efekt hormezy), a dawka subletalna (0,5 mM) hamowała.

Pod wpływem niższej dawki Pb obserwowano wzrost zawartości tego pierwiastka tylko w tkankach korzeni, natomiast w przypadku wyższego stężenia Pb zarówno w korzeniach jak i liściach. Po 4 dniach trwania eksperymentu nastąpiło wyraźne uwalnianie cząsteczek sygnałowych (SA i ABA) w tkankach liści grochu, któremu towarzyszył wzrost aktywności PAL i biosyntezy pizatyny, obserwowany po 2 i 3 dobach eksperymentu. Jednocześnie stwierdzono, że wpływ czynnika biotycznego (20 bezskrzydłych samic, naniesionych na populację badanych siewek) na te zmiany był znacznie słabszy, niż w przypadku ołowiu zastosowanego w dawce subletalnej. Cząsteczki kwasu salicylowego były akumulowane zarówno w liściach jak i korzeniach, a kwasu abscysynowego głównie w tkankach liści. Subletalna dawka Pb powodowała obniżenie płodności i skrócenie czasu życia bezskrzydłych samic *A. pisum*, a także wydłużała czas nakłuc elementówsitowych i zwiększała pobieranie wody z ksylemu. W siewkach grochu eksponowanych równocześnie na subletalną dawkę Pb i żerowanie mszycy grochowej, zanotowano wyższy poziom rodników semichinonowych i anionorodnika ponadtlenkowego, przy jednoczesnym obniżeniu aktywności SOD. Dla tej dawki odnotowano także wzrost zawartości produktów peroksydacji lipidów, reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Zmianom tym towarzyszyło również intensywniejsze generowanie H_2O_2 i wzrost aktywności peroksydazy. Ponadto, wysoka dawka Pb zwiększała całkowitą zdolność antyoksydacyjną wolno działających antyoksydantów (reszty tyrozyny i tryptofanu) w tkankach korzeni, i szybko działających (kwas askorbinowy lub glutation) w tkankach liści.

Poszczególne elementy rozprawy zostały poddane merytorycznej ocenie przez kompetentnych recenzentów i przedstawione przez w/w czasopisma naukowe do szerokiej weryfikacji środowiska naukowego. Dlatego ograniczę się tylko do oceny całości rozprawy. Najpierw chciałbym podkreślić, że stanowi ona przykład dobrze przemyślanego, popartego gruntowną znajomością backgroundu badanego zagadnienia; zaplanowanego i wykonanego projektu badawczego. Jest interesującym studium oddziaływania środowiskowego czynnika abiotycznego i czynnika biotycznego na roślinę akceptorową oraz towarzyszących mu interakcji pomiędzy dwoma badanymi czynnikami doświadczenia. Autorka weryfikując założoną hipotezę badawczą, w pierwszej kolejności wyjaśniła w jaki sposób toksyczny pierwiastek jest akumulowany w tkankach rośliny i jak wpływa to na uwalnianie cząsteczek sygnałowych, zmiany ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie flawonoidów oraz pobieranie ołowiu przez fitofaga. W drugim etapie sprawdziła jak badane czynniki wpływają na generowanie stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej w tkankach grochu zwyczajnego. A także jak ołów pośrednio wpływa na bionomię i zachowanie mszycy grochowej podczas żerowania, w warunkach stresu oksydacyjnego, powstałego w tkankach rośliny żywicielskiej.

Tak więc, konstrukcja ocenianej rozprawy doktorskiej nie jest przypadkowa, kolejne eksperymenty wynikają bowiem z wyników przeprowadzonych wcześniej badań, co świadczy o kreatywnym rozwijaniu hipotezy badawczej oraz o dojrzałości naukowej Doktorantki. Praca zawiera elementy nowości naukowej, a jej największą zaletą jest zwrócenie uwagi na interesujące aspekty molekularne w tri-troficznych oddziaływaniach środowiskowych ołow-

groch zwyczajny-mszyca grochowa. Umiejętność połączenia tych oddziaływań w prezentowanym projekcie badawczym niewątpliwie zasługuje na uznanie. Ponadto, chciałbym podkreślić ogrom pracy Doktorantki oraz budzące podziw wykorzystywanie zaawansowanych metod badawczych z bardzo różnych obszarów nauk przyrodniczych.

Na uwagę zasługują również inne naukowe dokonania Doktorantki, w postaci czterech współautorskich publikacji z listy A MNiSW, 13 komunikatów naukowych przedstawionych w trakcie krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych oraz kierownictwo projektu badawczego w konkursie PRELUDIUM 13 (NCN nr 2017/25/N/NZ9/00704). Reasumując, z analizowanego materiału wynika, że Doktorantka jest bardzo aktywna, co dobrze rokuje w Jej ewentualnej, przyszłej karierze naukowej.

Po lekturze przedstawionej do oceny rozprawy, a zwłaszcza podsumowania, zawartego w jej tekście, Recenzentowi nasunęły się drobne sugestie, które mogą pomóc Doktorantce w przyszłej pracy naukowej:

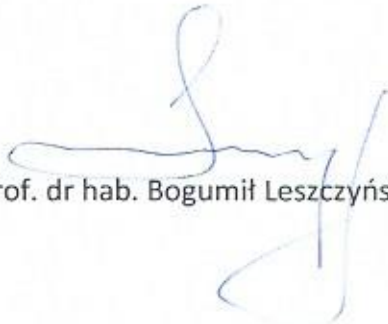
- z dwóch używanych określeń: aparat i narząd gębowy kłująco ssących owadów, Sekcja Afidologiczna Polskiego Towarzystwa Entomologicznego zaleca stosowanie „narząd gębowy kłująco-ssący”
- rozmnażanie jest jednak partenogenetyczne (partenogeneza), a nie partenogeniczne jak chce Doktorantka (str. 5)
- w określeniu poziom molekularny mieszczą się także procesy biochemiczne
- zamiast numerowania poszczególnych celów pracy (str. 7-8), proponuję używać określenia cele szczegółowe
- rodzaj użytego w badaniach substratu wskazuje, że badano tylko aktywność β -glukozydazy, hydrolizującej wiązania β -glukozydowe; natomiast określenia „glikozydy” lub aktywność β -glikozydazowa (str. 16-17), są terminami znacznie szerszymi
- *Pisum sativum* L. to jednak groch zwyczajny, a nie jadalny (str. 5-6 i dalsze)
- w podsumowaniu znalazłem również szereg niezręcznych sformułowań, które w przyszłości dobrze byłoby skorygować, takich jak: „niszczyielskie szkodniki” (str. 5), „oznaczenie procesu żerowania” (str. 10; metoda EPG służy do badania zachowania owada podczas żerowania), „w ciele mszycy” (str. 9; lepiej w tkankach mszycy), „organy siewne grochu” (str. 19; chyba lepiej nasiona), „spożywanie soku floemowego przez mszycę” (pobieranie, zasysanie), podobnie jak „liczba ciągłych faz spożywania soku floemowego”(str. 20)

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl monotematycznych publikacji naukowych spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i w mojej opinii zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Wypunktowane drobne niedociągnięcia nie obniżają tej oceny, a jedynie mają na celu pomóc Doktorantce w Jej dalszej pracy naukowej. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agnieszki Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na nowatorskość projektu naukowego, włożony w jego realizację ogrom pracy Doktorantki oraz opanowanie i umiejętne posługiwanie się zaawansowanymi metodami badawczymi, z różnych obszarów nauk przyrodniczych, wnoszę także o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Siedlce, 22 lipca 2019r.



Prof. dr hab. Bogumił Leszczyński