

Kraków, 24 lipca 2023

dr hab. Maciej T. Grzesiak, profesor IFR PAN  
Instytut Fizjologii Roślin PAN  
ul. Niezapominajek 21  
30-239 Kraków

### Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Skórki zatytułowanej *Analiza zmian biochemiczno-strukturalnych rejestrowanych pomiędzy wrażliwymi i tolerancyjnymi odmianami zbóż pod wpływem toksyczności jonów Mn.***

**Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii i Biofizyki, Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Apolonii Sieprawskiej, prof. UP**

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest pismo z dnia 17 maja 2023 informujące o decyzji Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie powołującej mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Skórki. Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora jest manuskrypt pracy.

Podjęta przez Autorkę tematyka badań jest aktualna i wynika z problematyki naukowej realizowanej w Katedrze Biochemii i Biofizyki, Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie. W ostatnich dekadach obserwowane są zmiany klimatyczno-glebowych warunków środowiska, w tym zmian zawartości metali ciężkich w glebie. Ta obserwacja wyjaśnia wzrost zainteresowania, zarówno naukowego jak i praktycznego, poszukiwaniem związków ochronny roślin zwiększających ich plon oraz jakość.

Mangan (Mn) jest pierwiastkiem chemicznym, który zaliczamy do grupy metali przejściowych. Występuje w przyrodzie w postaci tlenków, węglanów oraz krzemianów jako piroluzyt, manganit, rodonit, hausmannit i psylomelan. Powszechnie wykorzystywany jest w przemyśle metalurgicznym i szklarskim, a także ze względu na właściwości utleniające jako środek dezynfekujący. Zawartość Mn w glebie jest zmienna i zróżnicowana w zależności od regionu geograficznego, rodzaju gleby, aktywności przemysłowej oraz stosowania nawozów w uprawach rolniczych. Nadmierna akumulacja manganu w środowisku powoduje zanieczyszczenie gleby i wód gruntowych, co prowadzi do zagrożeń ekologicznych. Do atmosfery dostaje się głównie w wyniku emisji przemysłowych, a do wód gruntowych w wyniku rozpuszczania skał lub nawożenia w postaci kompleksów z materią organiczną. W metabolizmie roślin mangan jest mikroelementem, który ze względu na zdolność zmiany stopnia utlenienia odgrywa znaczącą rolę w reakcjach redoks. Bierze udział w reakcjach enzymatycznych, takich jak fosforylacja, hydroliza i dekarboksylacja oraz jest

składnikiem enzymów zaangażowanych w reakcje cyklu kwasów tłuszczowych i w syntezę RNA i DNA oraz tworzy kompleks enzymatyczny rozkładający wodę. W roślinach, dysmutazy ponadtlenkowe zawierające mangan występują w mitochondriach i w peroksysomach, natomiast oksydaza szczawianowa będąca enzymem związanym z Mn występuje w apoplacie. Uczestniczy w neutralizacji szczawianów i katalizuje rozkład szczawianu poprzez utlenianie do CO<sub>2</sub>. Aktywnie uczestniczy w neutralizacji toksyn grzybowych oraz wytwarza nadtlenek wodoru, który pełni rolę sygnalizatora w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Nawożenie manganem korzystnie wpływa na zdolności adaptacyjne roślin w reakcji na stesy oksydacyjne, gdyż jony Mn ograniczają szkodliwe działanie innych metali w roślinach poprzez obniżenie ich akumulacji oraz poprawę sprawności mechanizmów odpowiedzi na te czynniki stresowe.

Przekroczenie progu optymalnego stężenia manganu w glebie może prowadzić do zwiększonego pobierania i akumulacji tego pierwiastka, a jego nadmiar powoduje zmiany morfologiczne i anatomiczne objawiające się pojawieniem się plam chlorotycznych i nekrotycznych na liściach. Ich powstawanie pod wpływem stresu manganowego jest wynikiem uszkodzeń w tkankach wywołanych odkładaniem się tlenków manganu oraz utlenionych związków fenolowych i reaktywnych form tlenu w ścianie komórkowej lub stres oksydacyjnego zainicjowanego jego nadmiarem. Ilość i wielkość zmian pojawiających się w wyniku zwiększonej akumulacji manganu zależy od etapu rozwoju rośliny, a także jest charakterystyczna dla danego gatunku i odmiany. Na młodych liściach pojawiają się chlorozy, a na dojrzałych plamy martwicze. Pojawianie się chlorozy w warunkach nadmiaru manganu jest spowodowane niedoborem żelaza (Fe), podczas gdy pojawianie się martwicy następuje w wyniku akumulacji i utlenianiu tlenku manganu oraz utlenionym związkom fenolowym. Zwiększona akumulacja Mn zakłóca funkcjonowanie białek zaangażowanych w metabolizm ściany komórkowej korzeni prowadząc do zahamowania ich wzrostu oraz nadprodukcję reaktywnych form tlenu (RFT) poprzez transfer elektronów inicjując stres oksydacyjny a w apoplacie dochodzi do utleniania Mn. Nadmiar Mn powoduje zmniejszenie intensywności fotosyntezy oraz hamuje biosyntezę chlorofilu. Obniża także liczbę podjednostek wiążących Rubisco przez co obniża aktywność enzymów w cyklu Calvina tj. aktywazy RuBisCO i fosforybulokinazy. Pomimo potwierdzonego zapotrzebowania roślin na Mn jego udział w procesach wzrostu, rozwoju i plonowaniu roślin nie jest całkowicie poznany.

### **Uwagi szczegółowe do manuskryptu rozprawy doktorskiej**

Manuskrypt rozprawy doktorskiej został przygotowany zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami dla tego typu prac. Pod względem edytorskim jest opracowany starannie, a język nie budzi zastrzeżeń. Zawiera 124 strony i jest podzielony na 7 rozdziałów: Streszczenie, Summary, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Dołączoną dokumentację Autorka prezentuje w formie 3 tabel i 24 wykresów.

W rozdziale zatytułowanym „Wstęp” Autorka obszernie i wnikliwie omawia najważniejsze zagadnienia dotyczące roli i znaczenia manganu dla roślin zarówno w oparciu o wyniki badań innych autorów jak i wcześniejszych własnych publikacji. W kolejnych podrozdziałach Autorka skupia się na zagadnieniach dotyczących występowania mikro- i makroelementów, w tym szczególnie manganu, jego zawartości w glebie, wodzie i atmosferze, pobieraniu, transporcie a także jego roli w metabolizmie roślin. Lektura tego rozdziału pozwala czytelnikowi na poznanie powodów dla których Autorka podjęła te badania.

W rozdziale „Cel pracy” Autorka definiuje podstawowe tezy badań: wykazanie różnic w działaniu jonów manganu o różnym stężeniu na siewki kilku gatunków zbóż jarych (pszenica, jęczmień, owies) i wrażliwych lub odpornych na czynniki stresowe, w tym metali ciężkich oraz sprawdzenie czy jony selenu mogą ograniczać lub usuwać skutki wywołane ekspozycją na toksyczne stężenia jonów manganu. Są to zagadnienie nie w pełni poznane i wyjaśnione. Na koniec tego rozdziału Autorka formułuje pytania, które mogą być uznane za hipotezy badawcze podjętej tematyki.

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka przytacza informacje o materiale roślinnym użytym do doświadczeń oraz o źródłach jego pochodzenia. Następnie przedstawia wykonane procedury dla doświadczeń wazonowych i doświadczeń wykonywanych w kulturach hydroponicznych. W dalszej części tego rozdziału Autorka przedstawia metodykę dotyczącą oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i katalazy), stężenia makro- i mikroelementów, zawartości aldehydu dimalonowego, zawartości białka, cukrów rozpuszczalnych, skrobi, nadtlenku wodoru, zawartości proliny i enzymów jej syntezy i degradacji, zawartości chlorofilu, totalnej aktywności antyoksydacyjnej, zdolności eliminacji rodnika DPPH, całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, antyoksydacyjnej redukcji żelaza, zawartości kwasu salicylowego, zawartości kwasu askorbinowego oraz stężenia glutationu. W przeprowadzonych doświadczeniach Autorka wykonała również obserwacje mikroskopowe zmian w liściach, korzeniach i chloroplastach. Uzyskane wyniki pomiarów zostały poddane analizie statystyczne: analizie ANOVA oraz porównaniu średnich przy użyciu test Duncana wykorzystując oprogramowanie Statistica 9.1 dla poziomu istotności  $p < 0,05$ . Z przedstawionych szczegółowo protokołów pomiarów i analiz wynika, że Autorka wykorzystwała nowoczesną aparaturę, co niewątpliwie sprzyjało uzyskaniu rzetelnych wyników pomiarów.

W rozdziale „Wyniki” Autorka wykazała, że założony cel badań był konsekwentnie realizowany. Ten rozdział został podzielony na dwie części, w pierwszej Autorka zamieszcza wyniki doświadczeń wykonanych dla wrażliwych i odpornych jarych odmian pszenicy, jęczmienia i owsa. Autorka badała wpływ manganu na czynniki biochemiczne wskazujące na stresogenne działanie Mn, natomiast w drugiej Autorka oceniała zdolności roślin do akumulacji selenu (Se). Zwiększenie absorpcji selenu w produktach roślinnych powodować może wprowadzenie jego dodatkowych ilości do łańcucha troficznego, mimo tego, że nie jest on niezbędny dla roślin wyższych, to jednak w niskich stężeniach działa korzystnie na wzrost i aklimatyzację do warunków środowiska.

Uzyskane w pierwszej części wyniki wskazują, że u badanych odmian zastosowanie Mn kilkukrotnie zwiększyło jego akumulację wraz ze wzrostem jego stężenia oraz stwierdzono statystycznie istotne różnice w akumulacji manganu między wrażliwymi i tolerancyjnymi odmianami. Stosowanie toksycznego stężenia Mn uruchomiło enzymatyczne reakcje ochronne, które były jednak uzależnione od badanego gatunku. W badaniach stwierdzono, że wzrost zawartości proliny i cukrów rozpuszczalnych powodował zmiany osmotyczne, które również zależały od gatunku. Zmiany metaboliczne w warunkach stresu manganowego zostały potwierdzone jako zmiany w strukturach plastydów i wzrostu skrobi, a ponadto stwierdzono, że zwiększone pobieranie Mn przez korzenie prowadziło do zmian w strukturze części wierzchołkowych korzeni.

W części drugiej wyników Autorka wykazała, że selen stymuluje mechanizmy ochronne roślin również w przypadku zastosowania Mn jako czynnika stresowego. Jednak mechanizm działania jonów selenu nie był związany z bezpośrednim blokowaniem dopływu Mn do komórek. Ochronne działanie selenu przed toksycznym stężeniem Mn zwiększa aktywację układów odpowiedzialnych za ochronę komórek pszenicy przed wzmoczoną generacją RFT. Stymulowany przez selen wychwyt jonów wapnia wydaje się być ważnym elementem reakcji ochronnych, m.in. umożliwiającym regenerację tkanek korzeniowych. Potwierdzono bowiem zdolności strefy merystematycznej korzeni do modyfikowania pod wpływem stresu Mn, zwłaszcza w przypadku znaczących uszkodzeń komórek merystematycznych. Stres manganowy powodował podwyższenie poziomu metylacji DNA, co wskazuje na prawdopodobną inicjację apoptozy w komórkach i obumieranie głównego wierzchołka wzrostu.

Treści zawarte w rozdziale „Dyskusja” Autorka ukierunkowała na usytuowanie podjętej tematyki badawczej w aktualnym stanie wiedzy. Autorka zwróciła uwagę na problemy, które nie są w pełni poznane. Lektura tego rozdziału pozwala wyrobić sobie opinię co do słuszności podjęcia badań i ich znaczenia w aktualnym stanie wiedzy. Cytowana literatura wskazuje na dobrą znajomość problemów badawczych prowadzonych przez krajowe i zagraniczne ośrodki naukowe.

Autorka w rozdziale „Wnioski” formułuje w 10 punktach najważniejsze osiągnięcia uzyskane na podstawie wykonanych doświadczeń. Na zakończenie manuskryptu w rozdziale „Literatura” Autorka cytuje 300 pozycji i są to zarówno prace przeglądowe, jak i oryginalne publikacje naukowe opublikowane w ostatnich latach.

Mgr Magdalena Skórka wykonała pracę doktorską w ramach studiów doktoranckich w Katedrze Biochemii i Biofizyki, Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie. Jest współautorką 5 oryginalnych prac naukowych opublikowanych w zagranicznych czasopismach naukowych z listy MEiN, o łącznym IF=19,174 i 490 punktów według punktacji MEiN.

W trakcie studiów doktoranckich odbyła 2 staże naukowe w Instytucie Fizjologii Roślin PAN w Krakowie i na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Podczas tych staży zapoznała się z nowoczesnymi metodami biologii eksperymentalnej w tym spektroskopii emisyjnej i masowej oraz mikroskopii elektronowej i konfokalnej. W ramach

praktyk dydaktycznych prowadziła zajęcia dla studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych. Aktywnie uczestniczyła w promocji Instytutu Biologii UP przygotowując warsztaty w ramach Krakowskiego Festiwalu Nauki oraz Nocy Naukowców.

Podsumowując, dorobek naukowy i dydaktyczny mgr Magdaleny Skórka jest w mojej ocenie znaczący. Ukazuje Autorkę jako zdolnego i samodzielnego pracownika naukowego o skryształizowanych zainteresowaniach. W badaniach Autorka wykorzystwała możliwości warsztatu badawczego jakie miała do dyspozycji, a przede wszystkim dostęp do nowoczesnych metod badawczych porównywalnych z metodami stosowanymi w badaniach prowadzonych w laboratoriach zagranicznych. Niewątpliwie sprzyjającą podstawą do sformułowania tematu pracy był fakt, że badania były wykonane w zespole o wysokiej pozycji zarówno w krajowym jak i europejskim środowisku naukowym.

Przedstawiony manuskrypt rozprawy doktorskiej zawiera nowe elementy poznawcze i praktyczne, a pod względem formalnym i merytorycznym spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Jest przykładem zamkniętego cyklu badawczego od koncepcji przez staranny dobór materiału roślinnego, właściwe metody oraz przedyskutowanie wyników własnych i ich konfrontację z poglądami innych autorów. Na podkreślenie zasługuje fakt dużej praco- i czasochłonności wykonanych badań.

Na zakończenie chciałbym zadać dwa pytania, które nasunęły mi się podczas pracy nad recenzją:

1. Chciałem zapytać, co było podstawą do zaliczenia poszczególnych odmian roślin zbożowych do grup różniących się wrażliwością oraz czy ten podział był przeprowadzony w oparciu o doświadczenia przesiewowe czy np. tylko informacje od hodowców?
2. Czy Autorka planuje kontynuacja badań, a jeżeli tak to czego będą one dotyczyć?

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Skórki spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie z dnia 14 marca 2004 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami. Stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego *im. Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdaleny Skórka do następnych etapów publicznej obrony. Równocześnie, uwzględniając wartość i znaczenie badań, zaangażowanie Autorki zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

  
(dr hab. Maciej T. Grzesiak)