



**UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU**  
**Wydział Biologiczno-Chemiczny**  
**Instytut Biologii**

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok  
tel. 85 738-82-24, tel./fax 85 738-84-14



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Olechowicz „Mechanizm fitotoksycznego oddziaływania *m*-tyrozyny na wzrost korzeni siewek pomidora”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Olechowicz, doktorantki studiów doktoranckich Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Renaty Bogatek-Leszczyńskiej, w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie. Rozprawa jest opracowaniem napisanym w języku polskim. Doktorantka analizowała reakcje siewek pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.) na stres wywołany dostarczeniem *meta*-tyrozyny do podłoża wzrostowego. Badała modyfikacje procesów wzrostowych i metabolicznych, wytwarzanie i usuwanie reaktywnych form tlenu oraz poziom wybranych fitohormonów, a także zmiany ekspresji genów kodujących ekspansyny w korzeniach pomidora, charakteryzujących się znaczną redukcją wzrostu elongacyjnego, w odpowiedzi na zastosowany w różnych stężeniach związek allelopatyczny.

Rozprawa doktorska mgr inż. J. Olechowicz ma układ typowy - obejmuje 162 strony wydruku, w tym: *Wstęp literaturowy* (46 stron), *Cel pracy* (1,5 strony), *Materiały i Metody* (15 stron), *Wyniki badań* (30 stron), *Dyskusja* (18 stron), *Podsumowanie i wnioski* (2 strony). Rozprawa doktorska poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. W pracy umieszczono spis ponad 300 pozycji cytowanego piśmiennictwa (w większości angielskojęzycznych prac oryginalnych).

*Wstęp literaturowy* jest obszernym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Przegląd literatury wyczerpująco wprowadza w tematykę naukowych zainteresowań Doktorantki. Wstęp został podzielony na cztery podrozdziały, w których Doktorantka kolejno charakteryzuje: zjawisko allelopatii, mechanizm działania allelozwiązków, przedstawia przykłady ich wpływu na ekosystem oraz praktycznego zastosowania. Następnie charakteryzuje *m*-tyrozinę, właściwości chemiczne, biosyntezę i degradację, lokalizację i potencjał allelopatyczny tego związku, a także omawia rośliny będące źródłem *m*-tyrozyny – kostrzewy. Kolejny podrozdział poświęcony jest

powstawaniu i rodzajom reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach roślinnych a także mechanizmom usuwania ich nadmiaru. Scharakteryzowany został zwłaszcza enzymatyczny system antyoksydacyjny, ponadto przedstawiono fizjologiczną rolę oksydazy NADPH w tkankach roślinnych. Następnie Doktorantka szczegółowo omawia możliwy udział ROS, fitohormonów oraz ekspansyn w procesach wzrostowych korzeni, i ich regulacji. We *Wstępie literaturowym* umieszczono 6 schematów oraz 3 tabele. Schematy przedstawiają kolejno: szlaki biosyntezy i degradacji *m*-tyrozyny, wzory strukturalne *m*-tyrozyny i jej analogów, etapy redukcji cząsteczki tlenu i drogi powstawania ROS, cykl Halliwella-Asady oraz strukturę oksydazy NADPH (Rboh) w komórkach roślinnych. Kolejne tabele prezentują: podział allelozwiązków ze względu na relację donor-akceptor, właściwości cząsteczek zaliczanych do ROS a ostatnia - przegląd rodziny genów kodujących ekspansyny (*LeEXP*) w różnych organach i tkankach pomidora. Uważam, że *Wstęp literaturowy* zawiera istotne informacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej. Uwzględnia także najważniejsze pozycje piśmiennictwa z danej tematyki. Nie mam zbyt wielu uwag krytycznych do tego rozdziału. Nasuwają się jedynie drobne sugestie, np. uważam że Tab. 1.2 (str. 52) powinna zawierać pełne nazwy omawianych ROS i więcej odnośników do literatury natomiast schematy: Rys. 1.2 (str. 47) i Rys. 1.5 (str. 53) powinny w opisie zawierać spis skrótów. Ponadto, *Wstęp literaturowy* wydaje się być zbyt długi, w porównaniu z kolejnymi rozdziałami rozprawy doktorskiej.

Cel recenzowanej rozprawy doktorskiej został sprecyzowany jako cyt.: „określenie fitotoksycznej aktywności *m*-tyrozyny na wzrost młodych siewek pomidora na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i komórkowym”. Doktorantka postawiła trzy główne zadania badawcze, które posłużyły do realizacji zasadniczego celu pracy. Postanowiła zbadać wpływ *m*-tyrozyny na: i) wytwarzanie ROS oraz aktywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego w korzeniach siewek pomidora, ii) poziom/bilans fitohormonów – auksyny i etylenu, iii) ekspresję genów kodujących ekspansyny i błonową oksydazę NADPH w korzeniach badanych siewek. Można stwierdzić, po analizie dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej mgr inż. J. Olechowicz, że cel pracy został zrealizowany.

Stosowany w pracy materiał roślinny, układ eksperymentalny i metody badań nie budzą zastrzeżeń. Rozdział *Materiał i metody*, podzielony na 13 podrozdziałów, zawiera informacje z reguły wystarczające do ewentualnego powtórzenia przedstawianych doświadczeń. Dobór metod badawczych jest różnorodny, zastosowano niektóre nowsze techniki badawcze. Materiał badawczy został dobrze scharakteryzowany: przeprowadzono testy kiełkowania nasion pomidora, określono świeżą i suchą masę oraz zmiany długości siewek pomidora po potraktowaniu *m*-tyroziną o różnych stężeniach (24 i 72 godziny). Oceniono także stopień uszkodzenia błon

komórkowych korzeni i określono zdolność do regeneracji siewek po traktowaniu *m*-tyroziną. Przeprowadzono ponadto pomiary zawartości ROS oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Przeprowadzono szereg analiz spektrofotometrycznych i spektrofluorymetrycznych ale także analizy histochemiczne (wizualizacja ROS w korzeniach), polarograficzne (oznaczenie intensywności oddychania elektrodą tlenową Clarka), konduktometryczne (wyciek elektrolitów) czy chromatograficzne. Zbadano zmiany poziomu dwóch fitohormonów w korzeniach: etylenu (z użyciem chromatografii gazowej) oraz auksyn (z użyciem techniki ELISA). Badano także zmiany ekspresji wybranych genów kodujących ekspansyny (*LeEXPA*) w korzeniach oraz genów oksydazy NADPH (*LeRboh*) - z zastosowaniem techniki RT-PCR. Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Nasuwają się jednak pewne uwagi do tego rozdziału, np. w niektórych opisach doświadczeń brakuje odnośników do literatury metodycznej (str. 73, 75, 80). Nie przedstawiono charakterystyki *m*-tyrozyny ani pochodzenia odczynnika (str. 71). Nie podano objętości roztworów, które stosowano do „zwilżania bibuły” na szalkach, a na str. 80 opisano pomiary zawartości nadtlenu wodoru w „płynnym podłożu, w którym rozwijały się siewki”. Ponadto, w opisie metod zdanie, cyt.: "Analizy wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych, w ramach każdego przeprowadzono 3 powtórzenia techniczne" powtórzono aż 20-krotnie. Jeśli we wszystkich doświadczeniach stosowano taką samą ilość powtórzeń należy tego typu zdanie zawrzeć na początku rozdziału i/lub w opisie stosowanych metod statystycznych. Analiza rozdziału *Material i metody* (łącznie z przedstawionymi później wynikami) pozwala jednak stwierdzić, że mgr inż. J. Olechowicz opanowała podstawowe metody badań eksperymentalnych stosowanych obecnie w fizjologii i biochemii roślin.

Rozdział rozprawy *Wyniki badań* Doktorantka podzieliła na 11 podrozdziałów opisując kolejno: parametry wzrostowe siewek pomidora po potraktowaniu *m*-tyroziną (o stężeniu 50  $\mu$ M lub 250  $\mu$ M, przez 24 i 72 godziny), obserwacje modyfikacji grawitropizmu korzeni, uszkodzenia błon komórkowych korzeni, pomiary oddychania a następnie zmiany zawartości i lokalizacji wybranych ROS w korzeniach oraz aktywności elementów systemu antyoksydacyjnego (dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy i peroksydaz) w wyniku oddziaływań *m*-tyrozyny. Następnie zostały zaprezentowane wyniki oznaczeń stężenia auksyny (IAA) oraz pomiaru emisji etylenu z korzeni pomidora. W kolejnym etapie badań Autorka przeprowadziła analizę profilu ekspresji genów kodujących ekspansyny. Poziom transkryptów *LeEXP* w korzeniach siewek pomidora oznaczono dla sześciu genów, oznaczono również poziom transkryptów dwóch genów *LeRboh*, w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu siewek pomidora *m*-tyroziną. Należy stwierdzić, że opis uzyskanych wyników badań w rozprawie doktorskiej mgr inż. J. Olechowicz

jest poprawny i logiczny. Rozdział ten zawiera 29 rycin i jedną tabelę; po fragmentach opisu wyników są cytowane i przedstawiane adekwatne ryciny (lub tabela). Wykresy słupkowe są zrozumiałe, opatrzone odpowiednimi opisami i legendą. Niestety, dokumentacja fotograficzna prezentowana na stronach 94 i 98 jest słabej jakości - zwłaszcza Rys. 4.12 zawiera niewyraźne i zbyt małe zdjęcia, ponadto uzyskana barwa jest inna niż w opisie metody (str. 74). Generalnie sposób przedstawienia i opis wyników badań nie budzą jednak zastrzeżeń.

W ramach pracy doktorskiej mgr inż. J. Olechowicz uzyskała wyniki wskazujące, że traktowanie siewek pomidora *m*-tyroziną prowadziło do silnego zahamowania wzrostu elongacyjnego korzeni, we wszystkich stosowanych wariantach eksperymentalnych. Ekspozycja nasion pomidora na *m*-tyrozinę generalnie nie wpływała na kiełkowanie, nie powodowała także ograniczenia wzrostu części nadziemnych siewek. Badając wpływ *m*-tyrozyiny na parametry wzrostowe nie podano jednak istotnego parametru, jakim jest zawartość wody w tkankach siewki, zwłaszcza korzenia, którego wydłużanie było hamowane. Nasuwa się pytanie - czy uwodnienie tkanek ulegało zmianom po traktowaniu *m*-tyroziną, czy było zależne od czasu ekspozycji i stężenia stosowanego allelozwiązku? Jak Doktorantka wytłumaczy obserwowane różnice w świeżej masie i suchej masie korzeni (str. 90, 92) po traktowaniu *m*-tyroziną przez 72 godziny? W ramach pracy obserwowano także zmiany intensywności oddychania korzeni badanych siewek po traktowaniu *m*-tyroziną (str. 97) – czy nie planowano pomiarów alternatywnej drogi oddechowej? Czy znana jest literatura wskazująca na wzrost oddechowych procesów alternatywnych po stosowaniu *m*-tyrozyiny lub innych allelozwiązków? (nie podano tej informacji w rozdziale *Dyskusja*). W korzeniach siewek, po oddziaływaniu niebiałkowym aminokwasem, *m*-tyroziną obserwowano zwiększoną zawartość niektórych reaktywnych form tlenu, co świadczy o wystąpieniu wtórnego stresu oksydacyjnego. Stwierdzano także wzrost aktywności wybranych enzymów związanych z obroną przed stresem oksydacyjnym, głównie katalaz i peroksydaz.

Do ciekawszych wyników rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Olechowicz należy zaliczyć obserwacje, że *m*-tyrozyina wpływa na ograniczenie reakcji korzeni na działanie bodźca grawitacyjnego, zmienia bilans hormonalny oraz indukuje ekspresję niektórych genów kodujących ekspansyny w korzeniach oraz genów kodujących błonową oksydazę NADPH (*LeRbohB*, *LeRbohE*). Uzyskane wyniki wskazały, że jednym z efektów działania *m*-tyrozyiny, podczas procesu hamowania wzrostu elongacyjnego korzeni, jest zmiana równowagi hormonalnej – zaobserwowano wzmożoną syntezę auksyn oraz zmiany emisji etylenu. Traktowanie korzeni *m*-tyroziną prowadziło do wzrostu ekspresji głównie 5 genów ekspansyn: *LeEXPA1*, *LeEXPA2*, *LeEXPA5*, *LeEXPA9* i *LeEXPA18*. Nasuwa się pytanie, dlaczego wybrano do badań tylko geny ekspansyn z podrodziny A? Zgodnie z tabelą 1.3 (str. 67-68) niektóre geny z podrodziny B również

wykazują ekspresję w korzeniach... Wiemy, że nie zawsze obserwowanym zmianom ekspresji genów towarzyszą odpowiednie zmiany aktywności białek - czy Doktorantka miała w planach oszacowanie aktywności ekspansyn? Czy takie badania były już wykonane/opisane, np. w obecności innych allelozwiązków?

*Dyskusja* jest niezłe napisanym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Mgr inż. J. Olechowicz przeanalizowała wyniki badań własnych oraz porównała je z danymi z literatury. Omówienie wyników kolejnych doświadczeń, i ich dyskusję, podzielono na 4 podrozdziały. W pierwszych podrozdziale Doktorantka podjęła próbę objaśnienia podłoża hamującego wpływu *m*-tyrozyny na elongacyjny wzrost korzeni siewek pomidora i intensywność oddychania tlenowego. Drugi podrozdział to przegląd danych o modyfikującym wpływie *m*-tyrozyny na zawartość ROS i aktywność systemu antyoksydacyjnego w korzeniach siewek. Kolejny podrozdział dotyczy modyfikacji bilansu hormonów roślinnych, auksyny i etylenu, przez *m*-tyrozinę, poruszane są też pokrótce możliwe interakcje z innymi regulatorami wzrostu. Ostatni podrozdział *Dyskusji* dotyczy próby wyjaśnienia obserwowanych zmian poziomu ekspresji genów kodujących ekspansynę i błonową oksydazę NADPH. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała szereg wniosków umieszczonych po rozdziale *Dyskusja*.

Nie nasuwa się zbyt wiele uwag krytycznych dotyczących rozdziału *Dyskusja*. Własne osiągnięcia Doktorantki są najczęściej podkreślone w odpowiednim stopniu, chociaż w niektórych częściach opisu znikają na tle danych literaturowych. Uważam, że cytowanie własnych rycin ułatwiłoby zrozumienie niektórych fragmentów i tekst byłby bardziej przejrzysty (np. str. 122-123). Przydatne są natomiast dwie tabele podsumowujące otrzymane dane doświadczalne - ułatwiają powiązanie poszczególnych wątków pracy. Niestety zabrakło schematu z ogólnym podsumowaniem oraz wskazaniem możliwych mechanizmów oddziaływania *m*-tyrozyny na elongacyjny wzrost korzeni. Zdaniem recenzenta zabrakło również nieco szerszej dyskusji danych uzyskanych na podstawie analiz aktywności peroksydaz. Oczekuję uzupełnienia dyskusji, na obronie rozprawy doktorskiej, o potencjalne mechanizmy hamowania wzrostu korzeni badanych siewek oraz wskazania, które wątki badań warto by było kontynuować w przyszłości. Chciałabym także, by Kandydatka szerzej omówiła procesy towarzyszące odpowiedzi korzeni na bodziec geotropiczny.

Rozprawa doktorska mgr inż. J. Olechowicz jest napisana poprawnym językiem, bez większych błędów. Rozprawa jest prawidłowo zredagowana, kolejność rozdziałów jest zachowana, prawidłowo cytowane są prace innych autorów a spis literatury jest ujednolicony. Znalaziono jednak pewne niedociągnięcia, na przykład brakuje wyjaśnienia skrótów pod niektórymi schematami (str. 47, 53, 58, 95). Stwierdzono nieliczne drobne błędy literowe

(i interpunkcyjne) we wszystkich rozdziałach rozprawy (np. w streszczeniu i na str. 17, 30, 33, 58, 60, 66, 76, 84, 91, 116, 120, 123, 132, 135), a zwłaszcza w spisie bibliografii (str. 139, 141, 144, 149, 150, 152-153, 155, 158, 160, 161), a także powtórzenia zwrotów (str. 72-85). Doktorantka wykazała się generalnie dobrą znajomością terminologii naukowej, znaleziono jednak pewne „niezręczności” językowe i stylistyczne (np. str. 46, 43, 59, 60, 64, 79, 127, 132). Wymienione powyżej drobne błędy nie wpływają jednak na wartość merytoryczną ocenianej rozprawy doktorskiej. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej można uznać, że Doktorantka opanowała problematykę i metodykę badań w dziedzinie fizjologii i biochemii roślin, wykazała się znajomością zagadnień i terminologii naukowej z dziedziny zainteresowań, potrafiła zaplanować doświadczenia oraz zinterpretować uzyskane wyniki.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że moje krytyczne uwagi mają charakter dyskusyjny, nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Olechowicz. Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy, opanowała współczesne metody badawcze, uzyskane wyniki są oryginalne. Stwierdzam, jako recenzent, że **praca doktorska mgr inż. Joanny Olechowicz, zatytułowana „Mechanizm fitotoksycznego oddziaływania *m*-tyrozyny na wzrost korzeni siewek pomidora”** spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Występuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Olechowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 29.05.2019 r.



*Dr hab. Iwona Ciereszko, prof. UwB*

*Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii UwB*