

Łódź, dn.13.12.2018

Dr hab. inż. Joanna Leszczyńska
Zespół Bromatologii
Instytut Podstaw Chemii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
Ul. Stefanowskiego 4/10

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Anny Skwarek nt: Zmiany biochemiczne w sadzonkach dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) w odpowiedzi na infekcję *Erysiphe alphitoides*

Podstawę do opracowania recenzji stanowiło pismo Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego dn. 30.10.2018r prof. dr hab. Andrzeja Kruka z prośbą o dokonanie oceny pracy doktorskiej mgr pt.: Zmiany biochemiczne w sadzonkach dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) w odpowiedzi na infekcję *Erysiphe alphitoides*

Znaczenie badań podjętych w pracy

Polska jest jednym z krajów z najbardziej zanieczyszczonym powietrzem. Jest to jedna z przyczyn, dla których znaczenie lasów jest nie do przecenienia, ponieważ uczestniczą one w pochłanianiu znacznej ilości dwutlenku węgla oraz innych szkodliwych gazów. Odgrywają też ważną rolę gospodarczą. Najcenniejszym pod względem gospodarczym jest dąb szypułkowy. Jednak stresogenne czynniki biotyczne powodują zamieranie drzewostanów dębowych, a w największym stopniu wywołuje ten proces mączniak prawdziwy dębu. Ze względu na znaczny udział dębu w szkółkach leśnych mączniak prawdziwy dębu jest także najpowszechniejszą chorobą w produkcji szkółkarskiej. Stąd poszukiwanie nowych środków ochrony ograniczających porażenie drzew jest niezwykle ważne, a cel ten przybliży poznanie mechanizmów obronnych rośliny w odpowiedzi na stres biotyczny.

Wybór problematyki badawczej przedstawionej do oceny pracy uważam za oryginalny i interesujący nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale także ze względu na możliwe w przyszłości znaczenie dla gospodarki i ochrony środowiska.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa jest napisana poprawnym językiem i stanowi zwarte opracowanie, obejmujące 142 stron maszynopisu: składa się z 9 rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie wyników i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz literatury. Zastosowana przy opracowaniu rozprawy bibliografia jest bardzo obszerna, została dobrze wyselekcjonowana, uwzględniając najważniejsze pozycje naukowe dotyczące opracowywanej tematyki, obejmuje 325 pozycje.

Dobór merytoryczny źródeł oraz ich sposób wykorzystania uważam za wyczerpujący i prawidłowy.

Oceniana dysertacja jest typową pracą o charakterze eksperymentalnym podzieloną na dwie zasadnicze części: teoretyczną i badawczą. Część

teoretyczna rozprawy doktorskiej mgr Moniki Skwarek zawiera wprowadzenie teoretyczne dotyczące opisu patogenów biotroficznych i nekrotroficznych, w tym mączniaka prawdziwego. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka wyjaśnia mechanizm rozpoznania patogena i indukcję odporności rośliny ze szczególnym uwzględnieniem powstawania i działania reaktywnych form tlenu, procesu S-nitrozylacji oraz udziału związków fenolowych. Za szczególnie dobrze przedstawiony uważam rozdział poświęcony emisji związków lotnych.

Cel pracy jest dobrze uzasadniony. Doktorantka podjęła się trudnych badań z wyraźnie zarysowanym celem aplikacyjnym. W sposób bardzo czytelny Pani Skwarek podkreśliła najważniejsze zadania:

- oznaczenie reaktywnych form tlenu oraz aktywności enzymów oksydacyjnych
- generowanie reaktywnych form azotu
- oznaczenie zmian stężenia związków fenolowych
- oznaczenie zmian stężenia związków lotnych.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka bardzo szczegółowo opisała warunki uprawy, identyfikację gatunku oraz układ eksperymentalny. Metody doświadczalne są bardzo dobrze opisane, aczkolwiek część ze stosowanych metod analitycznych mimo, że prawidłowych, jest dość przestarzała (np. oznaczenie dysmutazy ponadtlenkowej z 1969r, str. 47). Brakuje mi także szczegółów dotyczących chemikaliów: czystości odczynników, producentów, ile wykonano ekstraktów i w ilu powtórzeniach wykonywano analizy itp.

Zastanawiam się także, dlaczego w pracy przy oznaczaniu metabolitów i aktywności enzymów nie wykonano krzywych wzorcowych, a stosowano molowe współczynniki

absorbancji. Mimo, że przeprowadzone analizy służyły do porównania zmian stężenia badanych metabolitów i aktywności enzymów, więc wartości bezwzględne nie są zbyt istotne, sposób postępowania uwzględniający obliczenia oparte o krzywe wzorcowe jest bardziej prawidłowy.

Doktorantka nie ustrzegła się pewnych drobnych nieścisłości i niezręcznych sformułowań np. :

Str. 19 - „Kwas podchlorawy” powinno - być kwas chlorowy I,

Str. 19 - sformułowanie hem żelaza wydaje mi się nieprawidłowe,

Str. 21 - lepiej byłoby napisać bez „dodatkowej siły redukcyjnej”,

Str. 24 - klasyfikuje się na trzy izoenzymy – może lepiej „wyróżnia się”,

Str. 27 - przykładami są a nie przykładami jest,

Str. 38 – dodatkowe, niepotrzebne słowo „płomieni”,

Str. 43 - Doktorantka używa sformułowania azotyny zamiast azotany III; 4N zamiast 4M KOH,

Str.45 - krzywa wzorcowa – dane powinny być podane w jednostkach stężenia a nie masy 0-50 µg, lub powinna być podana objętość zawierająca odpowiednią masę,

Str. 46 - czy milimolowy współczynnik absorbancji dla gwajakolu wyznaczono czy wzięto z literatury? Podobnie dla innych enzymów. Z obowiązku recenzenta: powinny być wykonane krzywe wzorcowe, aczkolwiek ponieważ w pracy porównuje się aktywność enzymów – jest to postępowanie prawidłowe,

Str.49 - stężenie procentowe zamiast procentowość,

Str. 62 - Tabela 5 - lepiej byłoby przedstawić wyniki na wykresie niż w tabeli,

W wielu miejscach Doktorantka zaczyna zdania od „dlaczego”

Str. 77. Bardziej czytelne byłoby przedstawienie wyników w tabeli 7 w postaci wykresu. Podobnie w przypadku tabeli 8 na str. 78.

Obszerna dyskusja otrzymanych wyników jest przeprowadzona na 16 stronach. Ostatnie rozdziały to podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis literatury.

Należy podkreślić bardzo staranne przygotowanie pracy, bardzo dobrze się ją czyta, niewiele znaleziono błędów i nieścisłości korektorskich. Forma graficzna tabel i wykresów jest bardzo

czytelna i jasna. Przy tak dużej ilości wyników przygotowanie pracy z tak niewielką ilością błędów było z pewnością zadaniem niełatwym.

Ocena merytoryczna

Doktorantka podkreśliła w swojej pracy oryginalność badań, ponieważ większość badań nad mechanizmami odporności była prowadzona na monokulturach roślin jednorocznych. Badanie roślin wieloletnich, zwłaszcza rosnących w warunkach naturalnych jest bardzo trudna, a uzyskane wyniki badań znacznie trudniej zinterpretować. Doktorantka poradziła sobie z tym zadaniem bardzo dobrze.

Bardzo interesująco przedstawiają się wyniki badań związane z przemianą związków azotu i powiązanie ich zawartości z detekcją histochemiczną NO oraz związków fenolowych, w tym szczegółową analizę HPLC (kwas ferulowy i kwas-kumarowy) oraz wizualizację histochemiczną lignin. Również bardzo ciekawe są wyniki oznaczania związków lotnych. Doktorantka wykazała zwiększoną emisję Z-3-heksanol, E-Z-heksenal oraz octanu etylu, wynikającą z działania fosfolipaz, a także monoterpenów i salicylanu metylu.

Za prawidłowo przeprowadzoną uważam analizę statystyczną uzyskanych wyników. Doktorantka wykazała, że zmiany stężenia O_2^- i H_2O_2 dość dobrze korelują ze zmianami aktywności dysmutazy nadadtlenkowej i katalazy, a także peroksydaz.

Ciekawe i nowatorskie są wyniki badań elektroforetycznych nad izoformami dysmutazy SOD oraz katalazy. Zawartość antyoksydantów nieenzymatycznych i aktywność badanych enzymów jest bardzo logicznie wyjaśniona.

Należy podkreślić bardzo dużą ilość wykonanych analiz i otrzymanych wyników; ich przedyskutowanie, wykazanie wzajemnych powiązań i zależności nie jest zadaniem łatwym. Jednak i z tym problemem Doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze. Dyskusja jest obszerna i dość wnikliwa, na ile jest to, oczywiście, możliwe.

Bardzo szczegółowo i wnikliwie jest przedyskutowana zawartość związków fenolowych i ich rola w odpowiedzi na stres. Wydaje się jak najbardziej zasadny wniosek, że brak korelacji pomiędzy ilością konstytutywnych związków fenolowych a rozprzestrzenianiem patogena świadczy o tym, że podstawową funkcją tych związków w roślinach drzewiastych nie jest działanie fungitoksyczne, chociaż może indukować odporność.

Przy czytaniu rozdziałów zawierających omówienie wyników i ich dyskusję pojawiły się dwa pytania:

Str.60 - dlaczego tylko w liściach z sierpnia badano zawartość składników mineralnych?

Str. 70 - jak wytłumaczyć największy wzrost aktywności form Cu/Zn-SOD oraz Mn-SOD w liściach niezainfekowanych patogenem?

Mocne strony:

- bardzo ambitny wybór obiektu badań
- ilość wykonanych oznaczeń, ich zasadność i kompleksowość
- dyskusję uzyskanych wyników, znalezienia wzajemnych powiązań i zależności

Słabe strony

- brak próby wskazania praktycznego wykorzystania do ochrony roślin przed infekcją.

Podsumowanie

Reasumując, tematyka rozprawy jest bardzo aktualna i ważna. Otrzymałam do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko ze względu na ilość uzyskanych wartościowych wyników, znalezienie wzajemnych relacji pomiędzy stężeniami metabolitów i aktywnościami enzymów oraz formę ich przedstawienia.

Praca jest bardzo ładnie napisana, wyniki są przedstawione bardzo czytelnie i jasno. Tabele i ryciny są przygotowane bardzo starannie. Praca jest bardzo dobrze przygotowana pod względem formalnym, zawiera niewiele błędów stylistycznych, gramatycznych i interpunkcyjnych.

Wspomniane powyżej nieliczne uwagi krytyczne mają charakter dyskusyjny, w porównaniu z wartością pracy mają marginalne znaczenie, nie przesłaniają wartości badań wykonanych przez Doktorantkę i ujętych w rozprawie.

Przedstawione do recenzji opracowanie wymagało od autorki, zarówno dużego wysiłku badawczo-analitycznego, jak też wysiłku przy redakcji obszernej pracy naukowej oraz przedstawienia ich w przystępnej formie.

Podjęte przez Doktorantkę badania mają bardzo duże znaczenie, zarówno poznawcze, jak i ewentualnie aplikacyjne. Autorka wykazała pełne przygotowanie teoretyczne, jak i pod względem warsztatowym.

Na podstawie przedstawionej pracy z całą odpowiedzialnością można stwierdzić, że Autorka w pełni opanowała umiejętność posługiwania się warsztatem badawczym z zakresu

wybranego kierunku badawczego, wykazała przy tym krytycyzm w odniesieniu do stosowanych metod analitycznych i uzyskanych wyników.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji praca magister Moniki Skwarek „Zmiany biochemiczne w sadzonkach dęby szypułkowego (*Quercus robur* L.) w odpowiedzi na infekcję *Erysiphe alphitoides*” charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną wykonanych badań, spełnia kryteria prawidłowo zaplanowanej, zrealizowanej i udokumentowanej rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska o dopuszczenie mgr Moniki Skwarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż., prof. PŁ

Joanna Leszczyńska