

Dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
email: barbara.nowak@up.lublin.pl



WYDZIAŁ
BIOLOGII ŚRODOWISKOWEJ

Lublin, 20 grudnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. SABINY ŁUKASZEWICZ pt. „Udział selenu w reagowaniu grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) na żerowanie mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris)”

Informacje o pracy oraz ocena strony formalnej

Praca Pani mgr inż. Sabiny Łukaszewicz na stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Polityckiej z Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Funkcję promotora pomocniczego sprawowała dr hab. Beata Borowiak-Sobkowiak, prof. UPP również z Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana w oparciu o cykl pięciu artykułów naukowych, w tym jednego artykułu przeglądowego, opublikowanych w latach 2018-2021. We wszystkich publikacjach składających się na cykl Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto, zgodnie z zamieszczonymi w dalszej części pracy oświadczeniami, miała Ona duży udział w procesie tworzenia tych publikacji wynoszący od 50% do 90% (w większości 50%). We wszystkich pracach badawczych recenzowanego cyklu mgr inż. Sabina Łukaszewicz uczestniczyła w projektowaniu eksperymentów, przygotowywaniu materiału badawczego, prowadzeniu analiz laboratoryjnych, analizie i interpretacji danych, jak również w przygotowywaniu manuskryptów do druku. Natomiast w przypadku pracy

przeładowej zebrała i przeanalizowała dostępną literaturę tematu oraz przygotowała manuskrypt do publikacji. Świadczy to o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Doktorantki.

We wstępnej części rozprawy, zatytułowanej jako *Streszczenie*, zaprezentowano następujące treści: *Spis artykułów stanowiących rozprawę doktorską, Wprowadzenie, Cel pracy i hipoteza robocza, Badania, Wyniki i ich odmówienie, Wnioski i podsumowanie*. Prezentacja omawianych treści liczy 12 stron. Do pracy dołączono również wydruk wszystkich artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej. Na końcu opracowania zamieszczono oświadczenia autora i współautorów przedmiotowych prac.

Wartość naukowa i merytoryczna pracy

Selen jest mikroelementem niezbędnym dla ludzi, zwierząt oraz niektórych mikroorganizmów. Wchodząc w skład licznych selenobiałek wykazuje min. właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe oraz jako jeden z nielicznych pierwiastków uczestniczy w reakcjach odpornościowych organizmu. Chociaż pierwiastek ten nie jest klasyfikowany jako niezbędny dla roślin, jego pozytywna rola u niektórych gatunków, zwłaszcza hiperakulatorów selenu oraz roślin narażonych na czynniki stresowe, pozwoliła zaliczyć go do grupy pierwiastków korzystnych. Ze względu na wąski margines tolerancji pomiędzy korzystnymi i fitotoksycznymi stężeniami selenu w tkankach roślinnych, jego aktywność biologiczna oraz efekty fizjologiczne mogą być bardzo zróżnicowane, w zależności nie tylko od gatunku rośliny, ale także od formy chemicznej i wpływu czynników środowiskowych. Pozytywna rola selenu przypisywana jest przede wszystkim aktywacji enzymatycznych i nieenzymatycznych składników obrony antyoksydacyjnej, ale wiąże się również z poprawą bilansu mineralnego oraz stymulacją metabolizmu wtórnego roślin. Natomiast jego oddziaływania fitotoksyczne są związane przede wszystkim z tworzeniem się zdeformowanych selenobiałek, występowaniem stresu oksydacyjnego lub/i nitrooksydacyjnego oraz zaburzeniami homeostazy niezbędnych pierwiastków i fitohormonów.

Akumulacja toksycznych związków selenu stanowi efektywny mechanizm obrony roślin przeciw atakom patogenów i szkodników roślin. Hipoteza zakładająca, że gromadzenie wysokich stężeń selenu w tkankach części nadziemnych zapewnia roślinom efektywną ochronę przeciwko niektórym chorobotwórczym organizmom i fitofagom została potwierdzona w wielu badaniach prowadzonych w ciągu ostatnich 20 lat, głównie wśród gatunków hiperakumulujących selen. Wcześniej, nie było wiadomo jakie korzyści przynosi roślinom hiperakumulacja tego pierwiastka, chociaż ewolucja tego typu gatunków w obrębie kilku rodzin botanicznych takie korzyści niewątpliwie sugeruje. Stwierdzono, że obecność selenu w tkankach chroni te rośliny przed infekcjami grzybowymi oraz atakami roślinożerców. Wynika to zarówno z odstrasżającego działania gromadzonego w liściach selenu, jak i z bezpośredniej toksyczności jego związków dla niektórych organizmów.

Podobny efekt potencjalnie można uzyskać także wśród gatunków nie posiadających zdolności do gromadzenia tego pierwiastka, w tym roślin uprawnych. Jednak w dalszym ciągu pozostaje wiele niewiadomych i pytań w tym zakresie, wymagających potwierdzenia naukowego. Kwestie związane z wpływem wzbogacania w selen roślin uprawnych na zachodzące w nich procesy fizjologiczno-biochemiczne, jak również na możliwość odstraszającego i toksycznego działania zakumulowanych w tkankach związków selenu na roślinożerne owady są wyjątkowo interesujące. W tym kontekście podjęte przez mgr inż. Sabinę Łukaszewicz badania są w pełni uzasadnione, a ich wyniki posiadają duży potencjał aplikacyjny.

Zaprezentowany w pracy doktorskiej cykl artykułów naukowych jest oryginalny, spójny tematycznie i kompleksowy. Doktorantka prawidłowo zaplanowała cykl badawczy oraz skutecznie zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą. Na podkreślenie zasługuje trudna pod względem poznawczym tematyka interakcji pomiędzy organizmami żywymi, w tym przypadku rośliną-gospodarzem a fitofagiem. Tego typu badania wymagają interdyscyplinarnej wiedzy zarówno z zakresu biologii roślin, jak i entomologii. Doktorantka nie obawiała się podjąć tego wymagającego tematu. Jednocześnie, dbając o rzetelność przeprowadzonych badań nawiązała owocną współpracę ze specjalistami z zakresu żywienia roślin oraz entomologii. Skład autorski przedstawionych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, które prezentowane są w przedstawionej do oceny rozprawie. Autorem korespondencyjnym czterech prac cyklu jest Promotor prof. dr hab. Barbara Politycka, a jednej pracy przeglądowej mgr inż. Sabina Łukaszewicz. Wysoka jakość pracy przeglądowej opublikowanej w 2020 roku wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, a zarazem odpowiednie umiejętności zespołu w przygotowywaniu tego typu prac. Dogłębnie opracowany i zaprezentowany w artykule „Selenium in plants and its effect on feeding and development of phytophages” temat dotyczący wpływu gromadzonego w tkankach roślinnych selenu na żerowanie i rozwój fitofagów dał dobrą podstawę do planowania eksperymentów badawczych i rzetelnego ich wykonania.

Część eksperymentalną mgr inż. Sabina Łukaszewicz zrealizowała wykorzystując groch zwyczajny (*Pisum sativum* L.) – gatunek zaliczany do grupy roślin nie gromadzących selenu. W doświadczeniach stanowiących pierwszy etap przeprowadzonego cyklu badawczego Doktorantka porównała oddziaływanie dwóch najczęściej występujących w środowisku mineralnych form tego pierwiastka (selenian IV, selenian VI) na parametry biometryczne grochu, jak również oceniła wpływ tych form na zawartość i translokację selenu oraz pierwiastków z grupy makro- i mikroelementów. Starła się przy tym przybliżyć różnice w poziomie bioakumulacji selenu w częściach nadziemnych, hypokotylach i korzeniach roślin w zależności od stosowanej formy chemicznej tego pierwiastka. Wykazała, że groch zwyczajny gromadził więcej selenu, jeżeli był on dostępny w formie selenianu VI niż selenianu IV, a proces akumulacji tego pierwiastka miał miejsce głównie w korzeniach. Ponadto, badane formy selenu charakteryzowały się zróżnicowaną fitotoksycznością, a

większą redukcję biomasy Doktorantka wstępnie odnotowała pod wpływem selenianu VI niż IV. Jest to ciekawe spostrzeżenie, ponieważ dla większości gatunków roślin uprawnych to na ogół selenian IV jest bardziej toksyczny niż selenian VI. Do podobnych wniosków doprowadziły mgr inż. Sabinę Łukaszewicz dopiero późniejsze doświadczenia, w których uwzględniono szerszy zakres stężeń selenu oraz określono indeks tolerancji korzeni na ten pierwiastek. Na tym etapie badawczym Doktorantka wykazała zaburzenia homeostazy większości pierwiastków zaliczanych do grupy niezbędnych dla roślin przez zastosowane formy chemiczne selenu oraz udowodniła zależność pomiędzy poziomem potasu i wapnia w tkankach a tolerancją roślin na selen. Wytypowała także stężenia selenu do dalszych zaawansowanych doświadczeń nad wpływem biofortyfikacji grochu siewnego tym pierwiastkiem na wybrane parametry żerowania oraz demograficzne mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris).

Doświadczenia uwzględniające interakcję pomiędzy wzbogaconym w selen grochem a żerującymi na nim mszycami stanowiły ostatni, właściwy dla postawionej hipotezy badawczej, a zarazem najbardziej zaawansowany etap badań do pracy doktorskiej. Etap ten łączy wpływ czynników abiotycznych i biotycznych na rośliny grochu. Analizowano wybrane wskaźniki statusu oksydacyjnego, zarówno w tkankach roślin, jak i owadów, warunkowane oddziaływaniem na rośliny związków selenu i żerowaniem fitofaga. W badaniach tych uwzględniono zarówno akumulację reaktywnych form tlenu, jak i skuteczność ich neutralizacji przez wybrane enzymatyczne i nieenzymatyczne antyoksydanty. Doktorantka wykazała, że wcześniejsza ekspozycja grochu na selen i akumulacja tego pierwiastka w tkankach na ogół obniżała wskaźniki stresu oksydacyjnego (akumulacja H_2O_2 i anionorodnika ponadtlenkowego) w roślinach narażonych na późniejsze żerowanie mszycy grochowej. Mogło to być związane z aktywacją przez selen enzymatycznych oraz nieenzymatycznych składników obrony antyoksydacyjnej roślin. Jednak obniżenie poziomu stresu oksydacyjnego w roślinach narażonych na czynnik biotyczny było ewidentne tylko w przypadku selenianu VI, ale nie w roślinach traktowanych selenianem IV.

Wśród parametrów związanych z oddziaływaniem selenu na żerujące na grochu mszyce analizowano m. in. ich zachowania żywieniowe, przeżywalność larw oraz parametry demograficzne populacji. Zachowania żywieniowe mszyc na roślinach traktowanych selenem różniły się od tych obserwowanych na roślinach kontrolnych. Mianowicie stwierdzono skrócenie fazy floemowej oraz wydłużenie fazy ścieżki od momentu włączenia do przejścia w fazę ksylemową. Ponadto Doktorantka wykazała, że biofortyfikacja grochu selenem stosowanym w stężeniu $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ w formie selenianu VI powodowała całkowitą śmiertelność larw mszycy już po 11 dniach trwania eksperymentu. Podobnie toksycznego efektu nie stwierdziła po wprowadzeniu do podłoża $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ selenianu IV. Jednak obie formy selenu powodowały wydłużenie okresu prereprodukcyjnego oraz skrócenie okresu reprodukcyjnego. Ponadto u mszyc żerujących na grochu biofortyfikowanym selenem odnotowano zwiększenie śmiertelności larw oraz obniżenie płodności samic i całkowitej

długości ich życia. Podsumowując wyniki swoich badań, Doktorantka stwierdziła, że selen zakumulowany w tkankach części nadziemnych grochu może działać na żerujące na roślinach mszyce zarówno deterrentnie, jak i toksycznie.

Uważam, że przeprowadzone przez mgr inż. Sabinę Łukaszewicz badania mają bardzo dużą wartość poznawczą i aplikacyjną. Doktorantka wykazała, że groch siewny może być interesującym gatunkiem modelowym w badaniach zarówno nad biofortyfikacją roślin w selen, jak i nad wpływem tego pierwiastka na żerowanie fitofagów. Na pierwszy plan wylaniają się dwie główne korzyści możliwe do uzyskania pod warunkiem bardziej szczegółowego zbadania tych zależności. Z jednej strony można pozyskać jadalne części roślin wzbogaconych w selen i wykorzystać je w diecie ubogoselenowej. Z drugiej strony odpowiednio wcześniejsza aplikacja tego pierwiastka roślinom może działać na nie ochronnie, zarówno dzięki aktywacji roślinnych układów antyoksydacyjnych, jak i szkodliwemu oddziaływaniu związków selenu na żerujące na roślinach fitofagi. Potencjalnie umożliwia to podwyższenie odporności roślin uprawnych na niektóre stropy biotyczne i abiotyczne podczas ich wzrostu i rozwoju. Jest to szczególnie istotny aspekt w warunkach szybko postępujących zmian klimatycznych oraz potrzeby zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego. Należy jednak zawsze pamiętać, że przeniesienie efektów uzyskanych w laboratorium na naturalne warunki uprawy jest bardzo trudne i nie w każdym przypadku kończy się powodzeniem. Z drugiej strony badania laboratoryjne stanowią pierwszy, niezbędny i podstawowy krok w kierunku zastosowania testowanych czynników i substancji w warunkach polowych. Mam nadzieję, że w przypadku selenu wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań laboratoryjnych znajdą zastosowanie w praktyce rolniczej i ogrodniczej.

Uwagi krytyczne

Mimo wielu wymienionych wcześniej zalet pracy, Autorka nie ustrzegła się przed popełnieniem pewnych błędów. Moje szczegółowe uwagi w tym zakresie są następujące:

- 1) Generalnie tytuł pracy odpowiada jej treści. Jednak w mojej opinii mógłby on być nieco bardziej precyzyjny. Tak naprawdę Doktorantka nie określała „udziału selenu w reagowaniu grochu siewnego na żerowanie mszyce grochowej” a raczej analizowała wpływ wzbogacania grochu siewnego w selen na parametry biometryczno-fizjologiczne tego gatunku oraz żerowanie i parametry demograficzne mszyce grochowej.
- 2) Doktorantka powinna sformułować hipotezę badawczą, a nie roboczą. Hipoteza badawcza powinna mieć formę stwierdzenia (nie pytania czy przypuszczenia). Pozwala to w łatwy sposób ją przyjąć bądź odrzucić, co jest podstawą do zbudowania dobrego modelu badawczego. Główna hipoteza badawcza może zostać uzupełniona o hipotezy pomocnicze, bardziej szczegółowo charakteryzujące oczekiwania badacza względem wyników.

- 3) Zamiast używać sformułowania „kofaktory enzymów antyoksydacyjnych” lepiej byłoby po prostu zastosować słowo „mikroelementy”. Bowiem w rzeczywistości nie badano przecież udziału tych pierwiastków w procesie regulacji aktywności enzymów antyoksydacyjnych, których są kofaktorami lub aktywatorami, a jedynie analizowano ich zawartość w poszczególnych organach roślinnych. Jak wiadomo, w roślinach pierwiastki te pełnią przecież wiele innych funkcji poza tymi związanymi z mechanizmami regulacji aktywności enzymatycznej.
- 4) W doświadczeniach zastosowano dwa stężenia selenu (10 i 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) wyznaczone na podstawie badań wstępnych. Doktorantka nie uzasadnia jednak dlaczego były to stężenia optymalne oraz jakie parametry brała pod uwagę w tych pilotażowych doświadczeniach. Bardzo proszę o odpowiednie uzasadnienie tego wyboru.
- 5) W dwóch pierwszych pracach eksperymentalnych zauważyłam pewną nieścisłość dotyczącą wskazania bardziej toksycznej dla grochu formy chemicznej selenu. Mianowicie w pracy Łukaszewicz i in. (2017) sugerowano wyższą fitotoksyczność selenianu VI niż IV, podczas gdy w artykule Łukaszewicz i in. (2019) zależność ta była odwrotna. Gatunek rośliny w obu tych badaniach jest ten sam, więc nie powinno być żadnych wątpliwości przy wskazaniu formy bardziej szkodliwej.
- 6) W streszczeniu pracy brakuje mi trochę przedstawienia zależności pomiędzy stężeniem selenu w częściach nadziemnych grochu, warunkowanego formą chemiczną tego pierwiastka, a jego działaniem deterentnym lub/i toksycznym w stosunku do żerujących mszyc. Czy taka zależność występowała i mogła mieć znaczenie dla silniejszego oddziaływania selenianu VI niż selenianu IV w odniesieniu do mszycy grochowej?
- 7) W niektórych miejscach streszczenia rozprawy doktorskiej zwraca uwagę pewien żargon (np. szybkie antyoksydanty, ograniczenie wzrostu suchej masy pędów, makroskładniki). Powodem tego jest niezrozumiałość niektórych akapitów, ale uchybienia te są niewielkie i mają znaczenie czysto redakcyjne.

Podsumowanie

Fakt, że moja recenzja zawiera pewne uwagi krytyczne wynika głównie z obowiązku recenzenta. Niniejsze uwagi zupełnie nie umniejszają wartości rozprawy jako całości. Pracę oceniam zdecydowanie pozytywnie, mając jednocześnie nadzieję, że moje sugestie będą użyteczne przy planowaniu kolejnych eksperymentów. Przygotowana przez mgr inż. Sabinę Łukaszewicz praca doktorska dowodzi Jej dużej wiedzy o biologicznej aktywności selenu w roślinach oraz wpływie tego pierwiastka na żerowanie fitofagów. W składających się na cykl publikacjach Doktorantka rzetelnie udokumentowała zrealizowane badania oraz przeprowadziła pogłębioną analizę uzyskanych wyników. Rozprawa zawiera szereg elementów nowości naukowej i stanowi bardzo użyteczny wkład do wiedzy o biofortyfikacji roślin uprawnych selenem oraz jego wpływie na ochronę roślin przez fitofagami.

Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Sabiny Łukaszewicz zatytułowana „Udział selenu w reagowaniu grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) na żerowanie mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris)” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Sabiny Łukaszewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość naukową przeprowadzonych badań oraz wysoki poziom recenzowanej rozprawy wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Sabiny Łukaszewicz stosowną nagrodą.

Barbara Kamyłek-Nosek