



UNIwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej

dr hab. Agnieszka Synowiec, prof. URK
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 12.12.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anity Krasieńskiej pt. „Wpływ elicytorów (jasmonianu metylu i Z-jasmonu) na indukcję reakcji obronnej kukurydzy”

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała nr 42/2021/22 Rady Naukowej Dyscypliny *rolnictwo i ogrodnictwo* Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, z dnia 30 września 2022 roku.

Praca doktorska Pani mgr Anity Krasieńskiej wykonana została w latach 2013-2015 w Katedrze Entomologii i Fitopatologii Molekularnej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy oraz w Katedrze Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Dariusza Piesika.

W recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Anity Krasieńskiej dokonano oceny formalnej pracy i układu treści. Zanalizowano zasadność podjętej tematyki, postawione cele i hipotezy badawcze, przyjęte metody badań oraz wyniki, dyskusję i wnioski końcowe.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anity Krasieńskiej napisana jest w języku polskim i liczy 126 stron. Układ pracy i spis treści jest tradycyjny, zawiera wszystkie niezbędne rozdziały, tj. Wstęp, Przegląd literatury, Materiał i metody badań z podrozdziałem Analiza statystyczna, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Rozdziały 7 i 8 to Streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera 197 pozycji piśmiennictwa. W pracy wszystkie ryciny (łącznie 32) umieszczone zostały w Aneksie na końcu rozprawy. Ponadto praca zawiera 16 fotografii, 4 schematy i 9 tabel. Szata graficzna jest estetyczna.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność i zasadność podjętej tematyki

Praca doktorska Pani mgr Anity Krasieńskiej wpisuje się bardzo dobrze w aktualną problematykę integrowanej ochrony roślin, obowiązującej w krajach członkowskich Unii Europejskiej od 1 stycznia 2014 roku a dodatkowo wspartej wskaźnikami strategii „Od pola do stołu” w ramach Europejskiego Zielonego Ładu (GreenDeal). Autorka za cel przyjęła określenie wpływu nalistnej aplikacji syntetycznego cis-jasmonianu i jasmonianu metylu (tzw. elicytorów) na emisję lotnych związków organicznych o właściwościach obronnych u kukurydzy odm. Prosna. Zjawisko „primingu”, czyli gotowości roślin do obrony wywołanej działaniem elicytorów, może mieć znaczenie w szybszej reakcji roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Jak słusznie Autorka rozprawy uzasadniła w rozdziale Przegląd literatury, badania z tego zakresu są nowatorskie i pożądane z kilku względów. Po pierwsze kukurydza jest gatunkiem o rosnącej popularności w uprawie, ze względu na wielorakie kierunki wykorzystania plonu i plastyczność środowiskową. Niestety, gatunek ten jest narażony na ataki licznych gatunków szkodników, a biorąc pod uwagę ocieplanie się klimatu, prognozuje się ciągły wzrost ich presji w kukurydzy. Kolejnym aspektem, uzasadniającym podjętą tematykę badawczą, a poruszonym w Przeglądzie literatury, jest postępująca selekcja szkodników odpornych na insektycydy, co w obliczu redukcji liczby substancji biologicznie czynnych pestycydów na rynku UE w najbliższych latach, będzie jeszcze bardziej poważnym problemem. W tym świetle badania nad syntezą roślinnych lotnych związków organicznych (LZO) o charakterze sygnalizacyjnym w układach



Wydział Rolniczo-Ekonomiczny

Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej

roślina-żywieciel oraz roślina-roślina, stanowią istotny czynnik w rozwoju biologicznych metod ochrony kukurydzy. Wybrane przez autorkę, elicytory - jasmonian metylu i cis-jasmon, wytwarzane w szlaku kwasu linolenowego, należą do ważnych cząsteczek sygnalizacyjnych, z grupy jasmonianów. Odgrywają one istotną rolę w aktywowaniu mechanizmów obronnych roślin skierowanych przeciwko roślinożercom. Zatem, podjęte przez Panią Magister badania uważam za aktualne i uzasadnione, tak z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań pozwalają prześledzić różnice w jakościowej odpowiedzi kukurydzy na zastosowane elicytory w czasie i przy różnej intensywności ich aplikacji, przez analizę składu chemicznego wydzielanych w odpowiedzi na nie LZO kukurydzy odm. Proсна.

Uzasadnienie badań

Uzasadnienie podjętych badań Autorka przedstawiła w rozdziałach Wstęp oraz Przegląd literatury. Liczą one łącznie 31 stron, z czego Przegląd literatury podzielony jest na siedem podrozdziałów; ostatni z nich to Hipoteza badawcza. W rozdziale tym Autorka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, omawiając zagadnienia związane z charakterystyką botaniczną i gospodarczą kukurydzy, jej najważniejszych szkodników i uszkodzeń przez nie powodowanych. W osobnym podrozdziale Doktorantka opisuje zalety i wady chemicznych środków ochrony roślin; szkoda, że w tym rozdziale nie poświęcono więcej miejsca na omówienie odporności na insektycydy wśród szkodników kukurydzy. Podrozdziały 2.5 i 2.6 dotyczą już dokładnego omówienia roli LZO dla roślin a także przedstawienia badanych elicytorów – jasmonianu metylu i cis-jasmonu. Tu z kolei zabrakło bardziej szczegółowego opisu biosyntezy elicytorów i ich charakterystyki chemicznej, łącznie z przedstawieniem budowy chemicznej każdego z nich. Podsumowując uzasadnienie badań, informacje przekazane w obu rozdziałach są na ogół zrozumiałe i poparte poprawnie dobranymi pozycjami piśmiennictwa.

Uwagi:

- Niektóre z przytaczanych pozycji piśmiennictwa lub danych statystycznych mogłyby być nowsze, jak choćby dane dotyczące zbiorów i plonów kukurydzy w kraju i na świecie, pozycje literatury dotyczące obrotu i sprzedaży środków ochrony roślin.
- Autorka wspomina o czterech podgatunkach kukurydzy (str. 7, akapit 2), należałoby uściślić, że jest ich osiem, a cztery z nich mają większe znaczenie gospodarcze.
- Autorka ma tendencję do używania skrótów myślowych, przez co niektóre zdania są niedopowiedziane. Np. str. 5 „*adaptacji organizmów*” do czego?; str. 7 „*całej biomasy nadziemnej jako żywności*” dodać że dla zwierząt, albo użyć określenia „paszy”; str. 7 „*dwutorowość (...) w procesie fotosyntezy*” dodać, że fotosyntezy typu C4, str. 34 „*obrony testowanych roślin*” przed czym?, itd.
- zdarza się, że nazwy zwyczajowe szkodników nie są uzupełnione o nazwy łacińskie jak np. na str. 7 pierwszy akapit od góry.
- str. 27, akapit trzeci „W wyniku unijnego przeglądu substancji czynnych” – dobrze byłoby podać numer aktualnego rozporządzenia w tym zakresie np. art. 57 rozporządzenia PE i Rady (WE) nr 1107/2009 z dn. 21 października 2009 dot. wprowadzanych do obrotu ŚOR czy Dyrektywa 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r., ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów.
- Str. 35, w nomenklaturze z zakresu biochemii używa się określenia „szlak metaboliczny/biochemiczny” a nie „ścieżka” (ang. *path*).

Cel badań

Cel pracy jest podany na końcu rozdziału „Wstęp”, zaś hipotezy badawcze znajdują się na końcu rozdziału Przegląd literatury, w podrozdziale 2.7. Autorka postawiła trzy hipotezy badawcze, które sformułowała rzeczowo. Biorąc pod uwagę fakt, że aplikacja na kukurydżę syntetycznego (Z)-jasmonu i jasmonianu metylu wpływa na emisję lotnych związków organicznych produkowanych



Wydział Rolniczo-Ekonomiczny

Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej

przez kukurydzę a ich uwalnianie zależy od siły czynnika indukującego oraz od czasu i częstości jego zadziałania, Doktorantka postawiła sobie za cel badań określenie wpływu aplikacji syntetycznego cis-jasmonu i jasmonianu metylu na emisję lotnych związków organicznych.

Uwagi:

- Cel dysertacji został sformułowany jasno, choć dodałabym, że chodzi o analizę LZO kukurydzy odm. Prosna.
- rozdział „Wstęp” kończy się celem badań, co należałoby wyartykułować w tytule tego rozdziału.
- Ponadto proponuję stosować konsekwentnie nazewnictwo w odniesieniu do jasmonu – albo cis-jasmon, albo (Z)-jasmon.

Material i metody badań

Do zrealizowania założeń zaplanowano i przeprowadzono dwie serie badań laboratoryjnych (prowadzone w sezonie 2013 i 2014) w kontrolowanych warunkach szklarniowych. Doktorantka przeanalizowała skład chemiczny LZO po ekspozycji roślin kukurydzy odm. Prosna oddzielnie na każdy z elicytorów (JM i Z-J) zastosowany w jednej dawce i w IV fazach. W I fazie (cyt. za Tabelą 2), każdy z elicytorów stosowano jednokrotnie w terminie poprzedzającym fazę wzrostu kukurydzy BBCH 18. W kolejnych trzech fazach elicytory stosowano dwukrotnie na wybranych roślinach w różnych odstępach czasowych od pierwszej aplikacji, w celu analizy zjawiska „primingu” na intensywniejsze wydzielanie LZO kukurydzy: w fazie II drugi oprysk nastąpił w dniu drugim, w fazie III w dniu piątym i w fazie IV w dniu ósmym. Pomiarów LZO dokonywano w dniu „0” (faza BBCH 18), i kolejno w dniach trzecim, szóstym i dziewiątym (w fazie I i II), w dniu szóstym i dziewiątym (faza III) oraz w dniu dziewiątym (faza IV). Doktorantka opisała aparaturę wykorzystywaną w doświadczeniu i sposób kolekcjonowania LZO na autorskich schematach, co znacznie ułatwia zrozumienie przebiegu eksperymentu. Zgromadzone i zabezpieczone LZO ekstrahowano do szczelnie zamykanych fiolek i analizowano dalej przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrią mas. Związki oznaczano przy wykorzystaniu bibliotek komputerowych i potwierdzano na podstawie widm spektralnych, retencji i jonów charakterystycznych widm spektralnych. Do analizy statystycznej uzyskanych wyników Doktorantka zastosowała wielowymiarową analizę wariancji (MANOVA). Jednoczynnikowe analizy wariancji prowadziła w celu weryfikacji hipotezy zerowej. Współzależność między obserwowanymi LZO oszacowała na podstawie współczynników korelacji Pearsona. Autorka przeprowadziła ponadto wielocechową ocenę podobieństwa badanych kombinacji za pomocą analizy odległości Mahalanobisa i analizy kanonicznej. Metody zostały opisane zwięźle, jednak w sposób wystarczający, aby zrozumieć przebieg eksperymentu, który został umiejętnie zaplanowany, z wykorzystaniem odpowiednich technik badawczych, co potwierdza, że Doktorantka posiada umiejętność planowania badań. Na podkreślenie zasługuje dobór i kompleksowość użytych analiz statystycznych, co pozwala na ciekawe porównania badanych kombinacji.

Uwagi:

- materiałem rozmnożeniowym kukurydzy są ziarniaki, nie nasiona.
- Autorka nie rozwija nazw faz BBCH, np. faza BBCH 18 to faza 8 liści, ale co to za faza BBCH 25?
- Na str. 38 zabrakło informacji o ilości cieczy użytej do oprysku na każdą roślinę lub na jednostkę powierzchni.
- Na str. 41 Doktorantka nie zamieściła informacji o rodzaju kolumny użytej w analizach chromatograficznych, dobór której rzutuje na poprawną identyfikację związków chemicznych.
- W tekście są odwołania do rycin, podczas gdy są one podpisane jako „schematy”.

Wyniki

Rozdział Wyniki stanowi najobszerniejszą część dysertacji: 16 stron, w tym 7 tabel i, osobno, 32 ryciny, umieszczone w Aneksie na końcu rozprawy. Doktorantka podzieliła rozdział Wyniki na jeden podrozdział (4.1. Analiza chromatograficzna), a ten dalej na dwa pod-podrozdziały (4.1.1. Wpływ



Wydział Rolniczo-Ekonomiczny

Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej

jasmonianu metylu (JM) na wydzielanie LZO oraz 4.1.2. Wpływ Z-jasmonu (Z-J) na wydzielanie LZO). Zawarte w tym rozdziale dane są zgodne z założoną hipotezą badawczą i z przyjętymi metodami badań. Przedstawione wyniki są ciekawe i stanowią inspirację do dalszych badań. Jednakże rozdział ten, podobnie jak rozdział Materiał i metody, jest napisany zwięzłym językiem.

Inne uwagi:

- skrótowość formułowania zdań sprawia, że odbiór treści bywa utrudniony. Przykładowo, co oznacza użycie terminu „*Wszystkie LZO charakteryzowały się rozkładem normalnym (...)*” (str. 45, pierwszy akapit)? Lub (str. 46, drugi akapit): „*Wszystkie oznaczone związki były emitowane w zdecydowanie większych ilościach.*” W stosunku do czego ilości związków były wyższe?
- Zawartość tabeli 3 nie jest zgodna z jej tytułem. Błąd w druku?
- d.f. (stopnie swobody) nie są źródłem zmienności.
- W tytułach tabel i rycin, w ich zawartości jak i w tekście, Autorka posługuje się przyjętymi przez siebie skrótami nazw elicytorów i LZO, przez co nie zawsze tekst jest łatwy w odbiorze. Przy opracowaniu wyników do publikacji sugeruję umieszczać w tytułach tabel i rycin pełne nazwy elicytorów a pod nimi legendę z opisem użytych skrótów.
- Autorka nie jest również konsekwentna w przyjętej przez siebie nomenklaturze, raz badane etapy opisuje jako „fazy” innym razem „kombinacje”, co utrudnia śledzenie wyników.
- Na str. 59 określenie „pary LZO” nie jest zrozumiałe, do czego się ono odnosi?
- Na rycinach brakuje opisu osi X i Y z jednostkami. Ponadto sugeruję umieścić informację o użytej analizie statystycznej i przyjętym poziomie istotności dla różnic obiektowych oraz opis znaczenia kreski, pudełka i wąsów.

Dyskusja

Dyskusja, obejmująca sześć stron rozprawy, jest na ogół konkretna, choć wprowadzenie, obejmujące aż dwie strony, zanim Doktorantka przedstawia wyniki własne, jest zbyt długie. Autorka poprawnie prowadzi wywód konfrontując wyniki własne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Uwagi:

- Str. 61 pierwsze zdanie sugeruję zamienić określenie „życie roślin” na „okres wegetacji”
- Str. 61 (drugi akapit), Doktorantka, powołując się na wyniki zawarte w publikacji Sato i in. (2013) pisze, że rośliny w odpowiedzi na uszkodzenia mechaniczne wywołane przez owady roślinożerne „*indukują metabolizm pierwotny*”. To sformułowanie jest niejasne, w tym znaczeniu, że metabolizm pierwotny jest podstawowym i niezbędnym do życia rośliny ciągiem reakcji biochemicznych. Indukowany zaś, w wyniku różnych stresów, może być metabolizm wtórny.
- Str. 62, Określenie w zdaniu „*Wydaje się, że (...) jest faktem*” jest sprzeczne.
- W Dyskusji zabrakło użycia, przyjętego już w terminologii fachowej, terminu „allelobioza” (Ninkovic i in., 2006), określającego funkcję informacyjną LZO, związaną z wymianą sygnałów chemicznych pomiędzy roślinami.

W kolejnym rozdziale Autorka sformułowała siedem wniosków. Ich treść jest uzasadniona własnymi wynikami badań i odpowiada na postawione w celu dysertacji pytania. Wnioski powinny być jednak sformułowaniami w czasie teraźniejszym, ze względu na ich ogólny charakter dla nauki.

Spis piśmiennictwa jest umieszczony na 18 stronach i składa się ze 197 (195) pozycji, pochodzących z czasopism w większości o zasięgu międzynarodowym, z czego 90% pozycji jest anglojęzycznych. Większość cytowanego piśmiennictwa pochodzi z ostatnich 10 lat. Całość umiejętnie wkomponowano w Przegląd literatury i Dyskusję. Bogaty dobór literatury wskazuje na odpowiednie przygotowanie Doktorantki do analizy podjętego problemu badawczego i świadczy o dużym wkładzie pracy w rzetelne przedstawienie omawianych zagadnień.



Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej

Drobne uwagi:

- Pozycja 36 w tekście rok: 2016, w spisie 2011
- Pozycja 37 w spisie rok 2015, w tekście 2011.
- Pozycja 47 – brak cytowania w tekście
- Pozycja 54 i 55 oraz 75 i 76 – powtórzone cytowania w spisie

Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oddaje założenia i cel pracy oraz osiągnięte wyniki badań. Zabrakło w nich jednak syntetycznego ujęcia zastosowanych metod badawczych.

Przedstawione w recenzji uwagi mają charakter pomocniczy i nie wpływają na pozytywną ocenę merytoryczną dysertacji. Moim zdaniem wyniki otrzymane w ramach przeprowadzonych badań stanowią spójne opracowanie podjętego problemu badawczego. Wnioski są wyciągnięte poprawnie i stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Niniejszą pracę oceniam pozytywnie pod względem merytorycznym.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja Pani mgr Anity Krasieńskiej pt. „*Wpływ elicytorów (jasmonianu metylu i Z-jasmonu) na indukcję reakcji obronnej kukurydzy*” stanowi oryginalne opracowanie problemu naukowego i odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym oraz nauce z dn. 20 lipca 2018 roku oraz z dnia 3 lipca 2018 Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Art. 179.2.). W związku z tym przedkładam Radzie Dyscypliny *rolnictwo i ogrodnictwo* Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anity Krasieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Agnieszka Synowiec, prof. URK