

prof. dr hab. Kazimierz Trębacz
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki,
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Ocena rozprawy doktorskiej Moniki Olszewskiej
pt. „Analiza wzrostu łagiewek pyłkowych *Hyacinthus orientalis* L., segmentów
koleoptyli oraz całych siewek kukurydzy *Zea mays* L. za pomocą technik
półprzewodnikowego obwodu fotowoltaicznego lub funkcjonału wzrostu”

Rozprawa doktorska Moniki Olszewskiej pt. „Analiza wzrostu łagiewek pyłkowych *Hyacinthus orientalis* L., segmentów koleoptyli oraz całych siewek kukurydzy *Zea mays* L. za pomocą technik półprzewodnikowego obwodu fotowoltaicznego lub funkcjonału wzrostu” to opracowanie składające się z czterech opublikowanych artykułów naukowych oraz obszernego omówienia uzyskanych wyników. Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej to:

- A) Olszewska M., Konefał A., Pietruszka M. (2017) Proton kinetics through the cuticle layer in maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 257.
- B) Pietruszka M., Olszewska M., Machura L., Rówiński E. (2018) Single measurement detection of individual cell ionic oscillations using an n-type semiconductor-electrolyte interface. *Scientific Reports* 8:7875.
- C) Olszewska M., Haduch-Sendecka A., Pietruszka M. (2018) Determination of selected dynamic quantities of growing intact seeds of maize. *General Physiology and Biophysics* 37, 375–389.
- D) Pietruszka M., Olszewska M. (2020) Extracellular ionic fluxes suggest the basis for cellular life at the 1/f ridge of extended criticality. *European Biophysics Journal* <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01430-3>

Wszystkie te prace opublikowane zostały w międzynarodowych czasopismach posiadających impact factor, a więc znajdujących się w sferze zainteresowania szerokiego grona badaczy. W dwóch pracach A i C Doktorantka jest pierwszą Autorką; w pozostałych dwóch – drugą, co świadczy o Jej wiodącej roli w powstawaniu tych artykułów. Potwierdzają to oświadczenia współautorów zgodne z informacjami zawartymi w artykułach. Prace te cytowane były 22 razy

(sierpień 2024), co należy uznać za spory odzew, biorąc pod uwagę wąską, specjalistyczną tematykę opisywanych badań.

Prace A i C prezentują wyniki eksperymentów mających na celu weryfikację teorii kwasowego wzrostu. Zgodnie z tą koncepcją, obniżenie pH ściany komórkowej doprowadza do jej rozluźnienia, co ułatwia transport do komórki wody wraz z substancjami osmotycznie czynnymi, co z kolei prowadzi do nieodwracalnego powiększenia objętości komórki, a więc do jej wzrostu. W procesie tym istotną rolę pełni pompa protonowa, H^+ ATPaza zlokalizowana w błonie plazmatycznej.

Doktorantka wraz ze współpracownikami zastosowała do badań izolowane koleoptyle kukurydzy, *Zea mays*, które rosły w pożywce kontrolnej, APW (artificial pond water) lub w pożywkach z dodatkiem auksyny (kwasu indolilo-3-octowego, IAA), bądź fuzikokcyny, FC – stymulatora wzrostu pochodzenia grzybowego. Badania tego typu prowadzone były od lat, m.in. przez grupy Clelanda, Hagera i Lüthena. Swój udział w weryfikacji teorii kwasowego wzrostu mieli również: profesor Zygmunt Hejnowicz i Jego współpracownicy oraz profesor Waldemar Karcz z zespołem. Nowością zaprezentowanych w pracy A badań było użycie opracowanej przez Doktorantkę prostej, ale skutecznej metody abrazji kutikuli oraz zastosowanie modeli matematycznych: funkcjonału wzrostu i metody Monte Carlo do symulacji wyników uzyskiwanych w różnych warunkach eksperymentalnych. Abrazja kutikuli była sposobem na ograniczenie bariery dyfuzyjnej dla testowanych substancji. Potwierdzono silną korelację między grubością warstwy kutikuli, określoną na podstawie długości czasu abrazji, a szybkością wzrostu koleoptyli. Ponadto, obliczenie korelacji krzyżowych pozwoliło określić nie tylko stopień współzależności między badanymi procesami, ale również opóźnienie czasowe między podaniem badanej substancji a tempem wzrostu. Kinetyka wzrostu koleoptyli była z dużą dokładnością przybliżana za pomocą opracowanego wcześniej funkcjonału wzrostu. Składa się on z części liniowej związanej z dyfuzją oraz z części nieliniowej związanej z syntezą ściany komórkowej. Zaprezentowane w pracy A wyniki badań oraz symulacji matematycznych w pełni potwierdziły kwasową teorię wzrostu.

Przedstawiona w wyżej omawianej pracy metoda pomiaru wzrostu stosów koleoptyli i pH medium, w którym się znajdują, aczkolwiek prosta i elegancka, posiada kilka wad, których większości Doktorantka jest świadoma. To m.in. zranienie siewek w celu wyizolowania koleoptyli, uszkodzenie części komórek w trakcie abrazji, częściowa anoksja (mimo stosowanej aeracji medium) oraz użycie w kontroli sztucznej wody słodkiej (APW), której skład niekoniecznie przypomina roztwór wypełniający apoplast rośliny lądowej, jaką jest kukurydza.

Praca C, Olszewska i in. (2018) jest próbą wyeliminowania tych ograniczeń. Badania przeprowadzone zostały na nienaruszonych siewkach kukurydzy, a testowane substancje podawane były do roztworu, w którym zanurzone były tylko korzenie. Ponownie badano wpływ IAA i FC na wzrost siewek i pH pożywki. Badania rozszerzono o sprawdzenie efektu gibereliny, GA₃ i chlorku kadmu, CdCl₂. Testowano różne stężenia tych substancji. Niedogodnością, z jaką zetknęli się Autorzy pracy, były trudne do skontrolowania procesy transportu badanych substancji z medium do korzeni i z korzeni do części nadziemnej. Dotyczyło to zwłaszcza auksyny i jonów kadmu. W przypadku IAA trudnością metodyczną była niewątpliwie wysoka podatność korzeni na ten hormon. Już stosunkowo niskie stężenia hamują wzrost korzeni. Ponadto, w nienaruszonych siewkach, w części wierzchołkowej dochodzi do ciągłej syntezy auksyny i jej polarnego transportu w kierunku bazypetelnym. Jony kadmu są natomiast silnie unieruchamiane w korzeniach bądź poprzez wiązanie do składników ścian komórkowych, bądź do specyficznych białek - fitochelatyn. Zatem ilość jonów Cd²⁺ w części nadziemnej nie była w pełni kontrolowana. Pewnym wyjściem z tej sytuacji było zastosowanie roztworów tych substancji w różnych stężeniach, wychodząc z założenia, że przy odpowiednio dużej koncentracji zaznaczy się wpływ tych substancji na wzrost liści. Stosunkowo najmniejszy efekt zarejestrowano w przypadku zastosowania GA₃. Odnosząc się do tego wyniku, Doktorantka przytacza spekulacje innych badaczy, m.in. Jonesa i Clelanda, że być może mechanizm działania gibereliny nie obejmuje zakwaszenia apoplastu. Tu również nie ma pewności czy giberelina została w dostatecznej ilości pobrana przez korzenie i czy została przetransportowana do części nadziemnej. Obecnie uważa się, że giberelina prowadzi raczej do degradacji białka DELLA będącego naturalnym inhibitorem wzrostu. Innym, dość niespodziewanym wynikiem było stwierdzenie zakwaszenia medium przez jony kadmu, co mogłoby wskazywać na stymulację wzrostu, a nie na spowolnienie, co rzeczywiście rejestrowano. Trzeba jednak pamiętać, że wzrost lub jego zahamowanie następowało w części nadziemnej, a tam pomiar pH nie był prowadzony. To jeszcze raz pokazuje jak złożonym systemem są nienaruszone rośliny. Z drugiej strony, wybór kadmu jako inhibitora wzrostu uważam za niezbyt fortunny. Kadm wykazuje szerokie spektrum działania na rośliny, a inhibicja wzrostu może być efektem ubocznym ogólnego osłabienia metabolizmu rośliny.

Podobnie jak w pracy A, zastosowano funkcjonal wzrostu do opisu kinetyki rejestrowanych zmian. Obliczono też korelacje krzyżowe. Wyniki zawarte w tej pracy, choć nie tak jednoznaczne jak w przypadku izolowanych koleoptyli, potwierdziły słuszność kwasowej teorii wzrostu. Zastosowane metody matematyczne pozwoliły częściowo zniwelować ww. trudności pomiarowe.

W tym miejscu chciałbym poprosić o komentarz dotyczący stwierdzeń:

(...) FC in its „physiological” concentration depolarises the cell membrane potential (...) (str. 386). Według znanych mi źródeł, fuzikokcyna powoduje raczej hiperpolaryzację potencjału membranowego komórek roślinnych.

Of the three sets of data (of the growing seedlings), only one, which will henceforth be treated as representative, was chosen for further analysis and two seedlings that were farthest from the mean data were rejected (str. 377). Czy rzeczywiście takie podejście było metodycznie poprawne?

Artykuł B (Pietruszka i in. 2018) przedstawia wyniki pomiaru, za pomocą techniki Electrical Lab on a Photovoltaic-Chip (ELoPvC), zmian napięcia elektrycznego wokół łagiewki pyłkowej umieszczonej w kropli roztworu na półprzewodniku typu n. Autorzy, z użyciem m.in. analizy Fouriera, dokonali próby identyfikacji strumieni poszczególnych typów jonów: H^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- powstających w efekcie zmian aktywności kanałów jonowych. Jest to bez wątpienia nowatorskie podejście będące alternatywą dla takich technik jak MIFE (microelectrode ion flux estimation) czy metoda wibrującej elektrody. Zaletą tej metody jest prosty układ eksperymentalny, wadą natomiast jest m.in. brak odpowiedniej rozdzielczości przestrzennej. Jest to szczególnie ważne przy badaniu takich obiektów jak łagiewki pyłkowe, gdzie strumienie jonowe mają charakterystyczny wzór przestrzenny. Artykuł ten ma głównie charakter metodyczny. Późniejsze prace profesora Pietruszki rozwijają ten temat. Tym bardziej szkoda, że w pracy B nie zastosowano inhibitorów kanałów jonowych w celu weryfikacji metody. Pożądanym byłoby też, moim zdaniem, równoczesny pomiar wzrostu łagiewki pyłkowej, aby móc dokonać próby korelacji rejestrowanych sygnałów elektrycznych ze wzrostem. Pomiar tego typu zaprezentowano w kolejnej pracy, D (Pietruszka i Olszewska 2020). Generalnie, jest to nowa, ciekawa metoda i pewnie zyska szersze zastosowanie. Rolą Doktorantki było wykonanie eksperymentów i dokonanie analizy wyników, z czego wywiązała się bardzo dobrze. Utrzymanie szumów na poziomie znacznie poniżej $1 \mu V$ stanowi spore osiągnięcie.

W pracy D (Pietruszka i Olszewska 2020) metoda ELoPvC została zastosowana ponownie do badania łagiewek pyłkowych: *Hyacinthus orientalis* i *Nicotiana tabacum*. Tym razem były one poddawane stresowi osmotycznemu, stresowi termicznemu oraz hormonom wzrostu (IAA oraz 2,4-D). Wykazano, że stres osmotyczny, a także stres niskiej temperatury hamują strumienie jonów w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Podobny efekt wywoływało podanie auksyny zarówno naturalnej, IAA jak i sztucznej, 2,4-D. Poprosiłbym Doktorantkę o komentarz, bowiem znakomita większość publikowanych wyników wskazuje

raczej na przejściowy wzrost, a nie spadek, wielkości strumieni jonowych w warunkach stresowych.

Analiza przeprowadzonych eksperymentów pozwoliła Autorom na określenie tzw. temperatury krytycznej, tj. optymalnej temperatury wzrostu łagiewek pyłkowych.

Przedstawiony do oceny dorobek naukowy Doktorantki stanowi dowód na opanowanie przez Nią technik eksperymentalnych, skomplikowanych metod matematycznych oraz na umiejętność opracowywania i opisu wyników.

Moim zdaniem, wyniki zamieszczone w artykułach B i D mogłyby być opatrzone bardziej szczegółowymi wyjaśnieniami pozwalającymi na zainteresowanie nimi szerszego grona biologów roślin.

Formalna strona pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Ocena ta dotyczy głównie streszczenia w języku polskim, ponieważ opublikowane artykuły, będące zasadniczą częścią rozprawy, musiały spełniać wymogi formalne poszczególnych czasopism.

Ta część rozprawy napisana została zwięzłym językiem naukowym. „Wprowadzenie” zawiera wiele istotnych informacji dotyczących kwasowej teorii wzrostu. Autorka przedstawia kolejno budowę i mechanizm działania substancji regulujących tempo wzrostu: auksyny i jej sztucznego odpowiednika, 2,4-D, gibbereliny, fuzikokcyny i chlorku kadmu. Następnie opisuje mechanizm kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewki pyłkowej.

„Cel pracy” wynika jednoznacznie z tematyki omówionej we „Wprowadzeniu”. Kolejna część to rozdział 4. „Materiały i metody” opisująca metody pomiaru i metody analityczne zastosowane w rozprawie. Kolejność podrozdziałów budzi pewne zastrzeżenia. Zamiast, tak jak jest w oryginalnych pracach stanowiących trzon rozprawy, przedstawić obiekty badań (koleoptyle i całe siewki kukurydzy, kiełkujące ziarnka pyłku), poprzez układ eksperymentów i metody badawcze, a skończywszy na opisie metod analitycznych, Autorka proponuje następującą kolejność podrozdziałów: 4.1. Metoda funkcjonau wzrostu, 4.1.1. Metody eksperymentalne (*Z. mays*), 4.1.2. Metody analityczne, 4.2. Metoda obwodu fotowoltaicznego, 4.2.1 Metody eksperymentalne (łagiewki pyłkowe), 4.2.2. Metody analityczne/statystyczne. Tytuły podrozdziałów 4.1.1 i 4.2.1. zawierają skróty myślowe i nie odzwierciedlają problemu badawczego. Ponadto, w części opisowej Doktorantka przyjęła porządek chronologiczny omawianych artykułów. Moim zdaniem, lepsza byłaby kolejność tematyczna, np. A, C, B, D.

Kilka sformułowań budzi moją wątpliwość. Na str. 10 i 39 przypisywane jest celowe działanie komórkom roślinnym („w celu”). Strona 20 „fluktuacji kanałów jonowych”, str. 31

„zewnątrznych komórek kutikuli”, str. 40 „fluktuacje napięcia jonów”, str. 41 „jonowe działania”. Spis literatury nie obejmuje prac Autorki będących częścią rozprawy. Ponadto, są inne rozbieżności między cytowaniami w tekście i spisem literatury.

Uwagi te nie dotyczą meritum rozprawy i nie umniejszają jej wysokiej wartości merytorycznej.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Olszewskiej spełnia warunki określone w art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1, z dnia 3 lipca 2018 r. Ustawy Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669), który stanowi, że „przewody doktorskie (...) wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy (...) są przeprowadzane na zasadach dotychczasowych, z tym, że jeżeli nadanie stopnia doktora następuje po 30.04.2019 r. stopień nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy”.

Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Olszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 28 sierpnia 2024 r.

