



UNIWERSYTET WARSZAWSKI WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl



Dr hab. Anna Szakiel
Zakład Biochemii Roślin
Instytut Biochemii
e-mail: szakal@biol.uw.edu.pl
tel. 225543316

Warszawa, 2018-11-16

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker
pt. „Profil wolnych aminokwasów *Stellaria media* (L.) Vill. i *Viola tricolor* L. jako
wskaźnik reakcji na czynniki środowiskowe”**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker dotyczy wpływu warunków środowiskowych, zwłaszcza żyzności gleb, na zawartość wolnych aminokwasów w powszechnie występujących gatunkach chwastów: gwiazdnicy pospolitej i fiołkach – trójbarwnym i polnym. Tematyka pracy jest związana z dwoma ważnymi trendami współczesnych badań: wpływu środowiska na metabolizm, a co za tym idzie – skład chemiczny roślin, oraz tzw. metabolomiki, czyli analizy grup metabolitów w skomplikowanych matrycach próbek biologicznych. Trendy te są ze sobą powiązane, gdyż analiza metabolomiczna często służy ocenie wpływu różnych czynników wewnętrznych i zewnętrznych na stan organizmu. Taki też jest ogólny plan rozprawy, przedstawiający wykorzystanie opracowanej metody analitycznej do zbadania zmian profilu wolnych aminokwasów w znanych gatunkach chwastów w zależności od warunków siedliskowych. Zgodnie z tym planem, Doktorantka postawiła sobie dwa główne cele, pierwszy obejmował opracowanie szybkiej i wiarygodnej metody oznaczania wolnych aminokwasów w materiale roślinnym, a drugi polegał na wykorzystaniu tej metody w analizie próbek roślin pochodzących z różnych stanowisk siedliskowych oraz uzyskanych z eksperymentów w komorach klimatycznych.

Bez wątpienia jednym z najważniejszych osiągnięć Autorki przedstawionej rozprawy jest opracowanie i optymalizacja metody oznaczania aminokwasów techniką chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Przedstawiona procedura obejmuje wszystkie etapy postępowania, od ustalonego eksperymentalnie odpowiedniego przygotowania próbki do przetestowania różnych wariantów parametrów rozdziału chromatograficznego, wyboru

fazy ruchomej i optymalizacji infuzji. Opracowana metoda została następnie poddana starannej walidacji pod kątem jej specyficzności, parametrów krzywej kalibracji do oznaczeń ilościowych, precyzji, dokładności, procentu odzysku analitu, limitów detekcji i oznaczalności. Uzyskane dane zostały opublikowane w najbardziej wartościowej parametrycznie publikacji Doktorantki (Determination of free amino acids in plants by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Analytical methods*). Opracowana metoda pozwala na identyfikację 19 aminokwasów i ich oznaczenie ilościowe z dokładnością na poziomie pmol.

Realizując drugi cel swojej rozprawy, Autorka wykorzystała opracowaną przez siebie metodę do oznaczenia profilu wolnych aminokwasów w popularnych chwastach segetalnych pochodzących z kilku stanowisk polowych zróżnicowanych pod względem właściwości gleby, oraz uprawianych w komorach klimatycznych na glebach przywiezionych z różnych siedlisk i komercyjnym podłożu ogrodniczym. Uzyskane wyniki wykazały, że oznaczane 19 związków rzeczywiście występuje w puli wolnych aminokwasów we wszystkich badanych gatunkach chwastów, natomiast ich proporcje ilościowe są różne (np. u gwiazdnicy dominuje glutamina, kwas glutaminowy i asparaginowy, a w fiołkach alanina i walina). Wzajemne proporcje aminokwasów, zwłaszcza tych dominujących, pozostały zasadniczo niezmienione bez względu na pochodzenie badanych roślin z różnych stanowisk naturalnych lub z eksperymentalnej uprawy w różnych wariantach glebowych. Natomiast ogólna zawartość puli wolnych aminokwasów zmieniała się znacząco (często ponad dwukrotnie) w zależności od warunków siedliskowych. Większa żyzność gleby, przejawiająca się w większej zawartości azotu, węgla organicznego i frakcji iłu, generalnie sprzyjała zwiększeniu zawartości wolnych aminokwasów w analizowanych roślinach. Autorka rozprawy wyciągnęła zatem wniosek, że zawartość wolnych aminokwasów w badanych chwastach może być w pewnym stopniu wskaźnikiem żyzności gleby. Analizując właściwości gleb zebranych z różnych pól uprawnych oraz nieużytków rolnych ze stanowisk, z których zostały pozyskane rośliny fiołka polnego wykazała ponadto, że pula wolnych aminokwasów w tej roślinie może być także indykatorem antropopresji na środowisko. Fiołki zebrane z obszarów poddanych rolniczej działalności człowieka (jak intensywne nawożenie mineralne, regulacja odczynu gleby) charakteryzowały się znacznie niższą zawartością wolnych aminokwasów niż fiołki pochodzące z siedlisk naturalnych (nieużytków rolnych), co można wytłumaczyć m.in. zmianą struktury gleby skutkującą utratą zdolności do zatrzymywania składników mineralnych. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez Doktorantkę można

zatem założyć, że poziom wolnych aminokwasów w roślinie jest jednym z istotnych parametrów odzwierciedlających zmiany środowiskowe.

Rośliny tego samego gatunku rosnące w różnych siedliskach bardzo często wykazują zróżnicowanie zawartości metabolitów zarówno pierwotnych, jak i wtórnych. Przyczyną tej „chemoróżnorodności” mogą być jednak nie tylko różne warunki siedliskowe (obejmujące warunki glebowe oraz ogół czynników klimatycznych), ale także ewentualne zaistnienie stresów abiotycznych czy biotycznych, oraz zmienność genetyczna różnych, odległych geograficznie populacji. Dlatego trudno przypisywać wszystkie różnice w zawartości puli wolnych aminokwasów wyłącznie wpływom warunków glebowych. Niemniej jednak, w dobrze zaprojektowanym doświadczeniu przeprowadzonym w komorach klimatycznych, Doktorantka wykazała niezbicie, że właściwości gleby są jednym z najistotniejszych czynników determinujących pulę wolnych aminokwasów w roślinie. Aby wyeliminować element potencjalnej zmienności genetycznej rozdzielonych geograficznie populacji, wykorzystwała nasiona gwiazdnicy pospolitej zebrane na jednym stanowisku tej rośliny, a następnie wysiała je w czterech różnych rodzajach podłoża i uprawiała w ściśle kontrolowanych warunkach. Uzyskane wyniki potwierdziły ścisłą zależność zawartości wolnych aminokwasów w roślinie od żyzności i właściwości gleby.

W swoich badaniach, oprócz opracowanej metody oznaczania aminokwasów, Doktorantka zastosowała różne metody pobierania próbek roślinnych i glebowych ze stanowisk naturalnych, wykazała się umiejętnością uprawy roślin w kontrolowanych warunkach komory klimatycznej, przeprowadziła szczegółowe analizy fizykochemiczne gleb (badanie odczynu pH, składu granulometrycznego, uziarnienia, zawartości próchnicy, zawartości węgla organicznego oraz przyswajalnych form fosforu i potasu), a uzyskane wyniki opracowała kilkoma metodami statystycznymi. Można zatem orzec, że wykazała się znajomością wielu metod eksperymentalnych, umiejętnością planowania doświadczeń oraz dokonania właściwego wyboru adekwatnych technik badawczych do rozwiązania postawionego problemu naukowego.

Przedstawiona rozprawa stanowi zbiór pięciu spólnych tematycznie publikacji, z których trzy zostały opublikowane w czasopismach anglojęzycznych (w tym jedna w czasopiśmie z części A wykazu czasopism MNiSW, dwie w czasopismach z części B), a pozostałe są rozdziałami w polskojęzycznej monografii „Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania”. Publikacje są wieloautorskie (dwu-, trzy- i czteroautorskie), ale Pani mgr Magdalena Dziągwa-Becker jest w nich wszystkich pierwszą autorką oraz pełni rolę autora korespondującego. Ponadto, zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów, jej udział

w publikacjach jest zdecydowanie dominujący (70-80% w czterech publikacjach, 51% w jednym z rozdziałów w monografii). Rozprawa spełnia zatem wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim w regulaminie Rady Naukowej IUNG-PIB uchwalonym w marcu 2018 r.

Oprócz zbioru publikacji oraz odpowiednich oświadczeń współautorów, Doktorantki i Promotora, rozprawa zawiera opisową część wprowadzającą, złożoną z bardzo zwięzłego wstępu, hipotezy i celu badań, opisu dwóch etapów pracy (związanych z jej metodyczno-badawczym charakterem), zestawienia najważniejszych uzyskanych wyników, dyskusji, podsumowania, wniosków, spisu literatury oraz streszczeń w języku polskim i angielskim. Część wprowadzająca jest napisana poprawnym językiem naukowym, literówki i niedociągnięcia redakcyjne są nieliczne. Hipoteza i cele pracy są sformułowane poprawnie, ale dość lakonicznie, trochę szkoda, że Autorka nie rozwinęła wstępu o założenia swojej pracy, czyli uzasadnienie, dlaczego zajęła się właśnie aminokwasami i dlaczego wybrała takie, a nie inne modele roślinne do swoich analiz i eksperymentów. Ułatwiłoby to zrozumienie wagi i znaczenia podjętej tematyki badawczej. Te informacje oczywiście znajdują się w rozprawie, ale trzeba ich poszukiwać (np. dane o funkcjach wolnych aminokwasów w roślinie Autorka podała dość fragmentarycznie dopiero w dyskusji, a bardziej szczegółowo dopiero w publikacjach). Rozważania o potencjalnym znaczeniu puli wolnych aminokwasów w metabolizmie czy reakcjach stresowych są ujęte w przeglądzie literatury, ale zostały potraktowane dość skrótowo: na zaledwie jednej stronie przy cytowanych 109 pozycjach literaturowych, co pozostawia czytelnikowi pewnien niedosyt. Na początku niejasnym aspektem jest też dobór modeli doświadczalnych (dlaczego chwasty, a nie rośliny użytkowe), Autorka zaczyna to wyjaśniać dopiero pod koniec przeglądu literatury, a następnie w kolejnych rozdziałach opisujących drugi etap pracy oraz oczywiście w publikacjach.

W niektórych badaniach Autorka oznaczała zawartość aminokwasów w całości tzw. ziela, a więc w materiale zawierającym liście, łodygi i kwiaty w zapewne dość zmiennych proporcjach. Można podejrzewać, że pule wolnych aminokwasów w różnych organach tej samej rośliny w jakimś stopniu się różnią, a niestabilność proporcji poszczególnych organów w różnych porcjach badanego materiału może powodować pewną niezamierzoną zmienność wyników.

Powyższe drobne uwagi krytyczne nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy. Podsumowując należy podkreślić, że przedstawiona rozprawa doktorska bez wątpienia stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje

ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętności eksperymentalne Autorki oraz potwierdza nabycie przez nią umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Dziągwy-Becker spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Autorki do dalszego toku przewodu doktorskiego.

