

**Ocena**  
**rozprawy doktorskiej mgr Ewy Żebrowskiej**  
**pt: Mechanizmy zwiększające dostępność fosforanów u owsa (*Avena sativa* L.)**

Rozprawa doktorska mgr Ewy Żebrowskiej, napisana pod kierunkiem dr hab. Iwony Ciereszko prof. UwB, jest obszernym opracowaniem napisanym w języku polskim i dotyczy poznania strategii różnych odmian owsa do wzrostu w zróżnicowanych warunkach żywienia fosforanowego.

Fosfor jest jednym z głównych składników mineralnych niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Dostępność przyswajanych form fosforu w glebach jest zazwyczaj bardzo niska, a owies jest zbożem o dużym znaczeniu gospodarczym, uprawianym zazwyczaj na terenach o niskiej dostępności fosforu w glebie. Mechanizmy umożliwiające wzrost owsa w tych trudnych warunkach nie zostały dotąd poznane. Dlatego podjęta w rozprawie doktorskiej próba kompleksowej analizy przystosowań owsa do warunków niedoboru fosforanów w podłożu uważam za ważną zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu prac. Jest obszerna - obejmuje (wraz z załącznikami) 188 stron wydruku komputerowego, w tym: Wstęp (37 stron), Cel pracy (3 strony), Materiały i Metody (13 stron), Wyniki (75 stron), Dyskusja (10 stron), Podsumowanie i wnioski oraz Streszczenie. W pracy umieszczono 46 rycin, 20 tabel, 9 fotografii oraz spis 269 pozycji cytowanego piśmiennictwa (w dużej mierze - angielskojęzycznych prac oryginalnych).

Praca napisana jest, z naprawdę niewielkimi wyjątkami, bardzo dobrym językiem. Wstęp, oparty o najnowsze pozycje literaturowe i opatrzone licznymi schematami oraz rycinami, czyta się z dużą przyjemnością. Wątpliwości recenzenta budzą jedynie przytaczane przez Autorkę informacje, że w warunkach deficytu fosforu następuje przebudowa błon lipidowych w kierunku zastępowania fosfolipidów sulfolipidami i galaktolipidami (za Plaxton i Tran 2011). Niejasna jest też informacja że u owsa zamiany te zachodzą głównie w błonie komórkowej oraz tonoplacie (za Anderson i wsp. 2005). Galaktolipidy są bowiem lipidami dominującymi w tylakoidach i jednocześnie lipidami charakterystycznymi dla tych błon. Według wiedzy recenzenta zawartość MGDG oraz DGDG w błonie komórkowej roślin jest raczej śladowa.

Założenia i cel pracy zostały dobrze opisane. W rozdziale 2. można było na pewno pominąć pierwszy akapit, który jest powtórzeniem informacji podanych przez Doktorantkę już wcześniej we wstępie. Poszczególne zadania badawcze realizowano w oparciu poszukiwanie odpowiedzi na 8, a właściwie nawet 10, dobrze sformułowanych celów szczegółowych.

Doktorantka wykorzystuje w swojej pracy aż 18 technik analitycznych o różnym stopniu skomplikowania. I tak, poczynając od różnorodnych pomiarów biometrycznych, stosuje oznaczenia ilościowe zawartości wybranych metabolitów, analizy intensywności fotosyntezy netto poprzez pomiar wymiany gazowej, metody cytochemiczne, elektroforezę żelową SDS-PAGE i wreszcie metody klasycznej analizy enzymatycznej. Muszę przyznać, że ta różnorodność i mnogość zastosowanych metod budzi mój nieklamany podziw. Świadczy ponadto o znakomitym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań naukowych. W opinii recenzenta strona

metodyczna pracy nie budzi zastrzeżeń. Zastosowane metody są adekwatne do badanych zagadnień. W rozdziale metody znalazły się jedynie drobne niedociągnięcia.

Brak fosforu w pożywce (w podłożu) lub jego obecność Autorka oznacza, odpowiednio, symbolami –P oraz +P. Co prawda Autorka wyjaśnia znaczenie tych symboli na str. 43, ale oznaczenia te nie są zawarte w wykazie skrótów.

W podrozdziale 3.3 dotyczącym oznaczania stężenia fosforu nieorganicznego Autorka pisze, że wirowała homogenat „przy obrotach 10 000 g”. Chodzi oczywiście o wartość przyspieszenia, a nie o obroty. Jest to zdaniem recenzenta ewidentne przeoczenie, bo na stronie 48, w opisie oznaczania cukrów rozpuszczalnych, Autorka podaje już prawidłowo opis procedury wirowania.

W podrozdziale 3.17, w którym opisano metody analizy elektroforetycznej białek Autorka używa określeń „masa molekularna izoform” oraz „wzorce masy molekularnej”. W języku polskim mówi się raczej o masie cząsteczkowej i o wzorcach masy cząsteczkowej.

W podrozdziale 3.18 (wpływ mikoryzy na wzrost i zawartość fosforu w tkankach owsa) Doktorantka podaje skład roztworu barwiącego korzenie nie podaje jednak proporcji w jakich poszczególne składowe zostały zmieszane (użyte).

Ryciny i tabele obrazujące wyniki pomiarów Autorka zamieściła w całości po części opisowej wyników co bardzo utrudnia czytanie pracy. Taki układ pracy wymusza bowiem konieczność ciągłego wertowania tekstu dla porównania ryciny z jej opisem zawartym w zwartym tekście. Uwaga ta ma jednak charakter wyłącznie osobistej refleksji recenzenta. Podczas publikacji wyników układ ten i tak będzie musiał być zmieniony i dostosowany do wymogów redakcji.

W rozdziale „Wyniki”, Autorka niepotrzebnie moim zdaniem zamieszcza, każdorazowo, w tytułach poszczególnych podrozdziałów tekst „... badanych odmian owsa (*Avena sativa* L., cv.: Arab, Krezus, Rajtar, Szakal) w warunkach zróżnicowanego żywienia fosforowego”. Ponadto we wstępie do tego rozdziału Doktorantka informuje, że badania wykonano na roślinach rosnących 7, 14 i 21 dni na pożywkach płynnych podczas gdy na rycinach konsekwentnie używa tygodni jako jednostki czasu wzrostu. Na przyszłość zalecałbym stosowania tych samych jednostek na rycinach i w tekście. Autorka nie korzysta też w praktyce z możliwości odesłania czytelnika do konkretnego wykresu na rycinie (np. rycina 13A) choć zadbała, aby poszczególne wykresy miały swoje oznaczenia literowe.

Największe zastrzeżenia ma recenzent do nomenklatury jaką doktorantka posługuje się w podrozdziałach 4.1, 4.2, 4.4, 4.6; w podpisach do rycin 12 – 16 oraz na tychże rycinach w opisie osi „Y”. Chodzi mianowicie o określenie „**stężenie Pi**” np. w pędzie itp. Zdaniem recenzenta Doktorantka opisuje zmiany **zawartości Pi**, a nie zmiany stężenia Pi. Domyślam się, że Doktorantka użyła określenia stężenie ze względu na przeliczenie zawartości Pi na jednostkę świeżej masy tkanki. Nie zmienia to jednak faktu, że nadal mamy do czynienia z zawartością Pi w 1 gramie świeżej masy, a nie ze stężeniem Pi w świeżej masie. Termin „stężenie” ma wielorakie znaczenie, ale w chemii zarezerwowany jest dla roztworów lub mieszanin, gdzie substancja rozpuszczona rozproszona jest równomiernie w ośrodku dyspersyjnym. Trudno natomiast mówić o stężeniu np. Pi w suchej czy świeżej masie tkanki jako w ośrodku dyspersyjnym. Jest to tym bardziej niebezpieczne, że wiele substancji chemicznych jest alokowanych w konkretnych przestrzeniach komórkowych i mówienie o ich stężeniu w roślinie brzmi dziwnie (chyba że chodzi o sok komórkowy – czyli o roztwór). Zalecam zatem używania w takich przypadkach określenia zawartość, lub w publikacjach anglojęzycznych amount lub content. Czasami przy przeliczaniu zawartości substancji na świeżą lub suchą masę tkanki używa się w języku angielskim określenia „specific content”. Identyczne

zastrzeżenia mam do podawania „stężenia barwników fotosyntetycznych” (Tabele nr 12, 13 i 14) czy też stężenia cukrów oraz skrobi w tkankach (ryciny od 25 do 28).

Ryc. 19 oraz 22 zostały podzielone na dwie strony. Szkoda, że Autorka nie skorzystała z możliwości graficznych, używanego przez siebie programu Statistica, który umożliwia złożenie kilku wykresów na jednej stronie. Ryciny podzielone na dwie strony są naprawdę trudne do przeanalizowania zwłaszcza w przypadku gdy część ilustracyjna pracy została oddzielona od opisu. Ponadto, omawiane wykresy są wykresami liniowymi opartymi na trzech punktach. W zasadzie zależność funkcyjną (czyli łączenie punktów) można sugerować w przypadku 5 punktów. Przy mniejszej liczbie punktów powinno się stosować słupki czyli taki sposób prezentacji jaki Doktorantka, poza tymi dwoma wyjątkami, czyni. Ponieważ wiem, że czasami w pracach naukowych można znaleźć odejście od, nazwijmy to kolokwialnie, reguły 5 punktów nie czynię Doktorantce z tego powodu merytorycznego zarzutu. Nie mogę się natomiast całkowicie zgodzić z opisem ryciny 22A i B (str. 59, ostatni akapit) gdzie Doktorantka pisze o różnicach, występujących po pierwszym tygodniu kultury, w wartościach stosunku świeżej masy korzeni do świeżej masy pędu pomiędzy roślinami F i -P. Według mnie różnice te są statystycznie nieistotne, a i sama Doktorantka ich na wykresie (jako statystycznie istotne) nie zaznacza. Ponadto, na wykresie 22A nie widać linii zmian dla kontroli (+P). Jeśli, jak przypuszczam, są one identyczne jak dla roślin F to trzeba by to opisać (podobna sytuacja jest prawdopodobnie w przypadku wykresu 22D).

Dane pokazane w tabelach zawartych w pracy nie są łatwe do porównania. Wynika to z ich podziału na trzy części (osobnej dla każdego czasu wzrostu). Rozumiem, że jest to wynik bardzo dużej ilości danych, które chciała Doktorantka pokazać. Myślę jednak, że można (a w przypadku publikacji trzeba nawet będzie) pokazać poszczególne dane w jednej tabeli. I tak, np. w przypadku rezygnacji z pokazywania wartości odchylenia statystycznego  $\pm$ SD (zbędne bo Doktorantka i tak pokazuje w tabeli różnice statystycznie istotne oznaczając je gwiazdką), zastąpienia pełnej nazwy wskaźnika jego symbolem (wyjaśniony w wykazie skrótów wraz z wymiarem – czyli jednostką) Doktorantka zyskuje 4 wiersze w każdej z tabel od 8 do 11. Nie wykluczam, że wtedy przy przeformatowaniu tabeli z formatu poziomego na pionowy udało by się pokazać wszystko w jednej tabeli.

Na str. 68 Autorka w podrozdziale 4.11, opisując profil izoenzymatyczny kwaśnych fosfatyz i podając ich masy cząsteczkowe w kDa używa określenia „... najmniejsza z nich”. Powinno być najlżejsza z nich bo Dalton jest jednostką masy cząsteczkowej, a nie wielkości.

Nie bardzo rozumiem też określenie stężenie białek rozpuszczalnych w ekstraktach **enzymatycznych** – chodzi oczywiście o przymiotnik **enzymatycznych**.

Autorka w rozdziale „Dyskusja” omawia otrzymane wyniki na tle badań innych autorów. Uważam, że ten rozdział jest bardzo dobrze napisany choć znajdują się w nim niewielkie fragmenty, które są dla recenzenta niejasne (np. rozważania na temat związku pomiędzy deficytem fosforu a procesem fotosyntezy na str. 139). Autorka jest też nieco niekonsekwentna w swoich wypowiedziach zawartych w najpierw w rozdziale „Wyniki”, a potem w rozdziale „Dyskusja”. I tak omawiając rozdział elektroforetyczny białek w podrozdziale 4.13 (str. 69, Fot. 7) pisze, że białko o masie molekularnej (powinno być cząsteczkowej) ok. 55 kDa – to **najprawdopodobniej duża podjednostka Rubisco**. W rozdziale „Dyskusja” jest już bardziej kategoryczna w swoich stwierdzeniach i na str. 140 pisze, że badania własne wskazują na **spadek zawartości tego białka** (Rubisco) w pędach owsa -P. Choć przyznam, że określenie „wskazują” istotnie łagodzi kategoryczność wypowiedzi.

W części „Podsumowanie i wnioski” we wniosku nr 2 Doktorantka pisze: „W warunkach niedoboru Pi u owsa uruchamiane są dostosowania wzrostowe ...” – zdecydowanie wolałbym sformułowanie **mechanizmy wzrostowe**. Natomiast we wniosku nr 6 znajdujemy sformułowanie: „Najwyższa

aktywność kwaśnych fosfataz obserwowana była w korzeniach **na terenie** wiązek przewodzących, epidermy i włośników”. Dlaczego na terenie a nie w wiązkach przewodzących, epidermie i włośnikach? Autorka wydaje się być przywiązana do tego określenia bo wcześniej, na str. 66, użyła już określenia „Na terenie epidermy”. Zachęcam do zmiany tego przyzwyczajenia.

Autorka w rozdziale 9 „Załączniki” umieszcza podrozdział 9.1 zatytułowany „Wykaz **rycin** zamieszczonych w tekście”. I to dobrze, że tak go tytułuje bo w pracy zamiast określenia rycina konsekwentnie używa określenia rysunek. Tymczasem rysunek (zgodnie z definicją encyklopedyczną) to: „kompozycja linii wykonana na płaszczyźnie, polegające na nanoszeniu na powierzchnię walorów wizualnych przy użyciu odpowiednich narzędzi”. W literaturze naukowej przyjęte jest raczej stosowanie określenia rycina choć przyznam, że różnica pomiędzy tymi pojęciami jest dość płynna. Z punktu widzenia publikacji anglojęzycznej problem ten w ogóle nie istnieje, bo tam obowiązuje jeden termin: Figure(s).

Na zakończenie mam do Doktorantki dwa pytania:

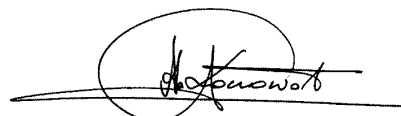
1. Wydaje się, że morfologia korzeni u wszystkich badanych odmian rosnących na pożywkach z kwasem fitynowym jest inna niż na pożywkach +P i –P. Czy mam rację? Nie znalazłem bowiem w tekście uwag Autorki na ten temat.
2. Jak się ma próba mikoryzowania korzeni owsa czy też nadzieja, że mikoryza poprawi pobieranie fosforu, do znanych faktów blokowania mikoryzy poprzez wysokie stężenia fosforu w glebie?

### **Wniosek końcowy**

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam wysoko. Uważam, że jest ona dobrym opracowaniem naukowym, i że wnosi nowe odkrycia pozwalające lepiej poznać skomplikowany mechanizm procesu żywienia mineralnego roślin. Część eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i metodycznie odpowiednio wykonana. Godna uznania jest bardzo duża ilość i różnorodność przeprowadzonych analiz. Postawione przez Doktorantka cele zostały w pełni zrealizowane.

Pomimo pewnych uwag krytycznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, niniejszym stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „Mechanizmy zwiększające dostępność fosforanów u owsa (*Avena sativa* L.)”, spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą o tytułach i stopniach naukowych.

W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie jej Autorki - mgr Ewy Żebrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Skoczowski