



UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII

Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

Instytut Biologii Środowiskowej

ul. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 5543916, FAX: (+22) 5543910



Warszawa, 23.08.2025

Prof. dr hab. Elżbieta Romanowska
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Niechemiczna metoda regulowania pokroju roślin rabatowych „

wykonanej przez Panią mgr inż. Natalię Annę Kuźma w Katedrze Ochrony Środowiska i Dendrologii Instytutu Nauk Ogrodniczych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Agaty Jedrzejuk, prof. SGGW.

Wprowadzenie

Kształtowanie pokroju roślin rabatowych, czyli regulacja ich wzrostu, pozwala na uzyskanie pożądanej formy i wysokości roślin. Metody mechaniczne tj. np. dotyk, przycinanie lub chemiczne np. przy użyciu regulatorów wzrostu pozwalają to osiągnąć. Wybór metody zależy od gatunku rośliny, oczekiwanego efektu, należy dopasować również metodę do warunków uprawy i fazy rozwoju rośliny

Ważną grupą regulatorów wzrostu roślin są retardanty, związki produkowane syntetycznie, hamujące wzrost wydłużeniowy komórek. Umożliwiają uzyskanie zwartego pokroju roślin.. Jednak jednocześnie hamują rozwój pąków kwiatowych i powodują ich zmniejszenie. Mechanizm ich działania związany jest z hamowaniem biosyntezy giberelin.

Regulacja wzrostu roślin z zastosowaniem retardantów wzrostu jest szkodliwa dla środowiska. Zatem w produkcji roślin stosuje się różne metody regulacji wzrostu, np. określone spektrum światła, które zmienia parametry wzrostu roślin. Barwa światła ma istotny wpływ na wzrost roślin, ponieważ rośliny wykorzystują różne długości fal świetlnych w procesach takich jak fotosynteza czy morfogeneza.

Stosuje się również skarlanie mechaniczne (SM), które wiąże się ze zjawiskiem tigmomorfogenezy, czyli regulowaniu wzrostu i pokroju roślin poprzez czynniki zewnętrzne np. wiatr, dotyk, strumień wody itp., rośliny wówczas modyfikują proces wzrostu i dostosowują się do panujących warunków – zmniejsza się

wydłużanie pędów, rośliny zawiązują większą liczbę pędów bocznych. Mechanizm ten opiera się na reakcjach biochemicznych, w tym na zmianach w stężeniu hormonów roślinnych, zwłaszcza auksyn, które mogą prowadzić do zahamowania wzrostu pędów i korzeni oraz ograniczeniu syntezy giberelin odpowiedzialnych za wydłużanie międzywęzli i odgrywają również decydującą rolę w mechanizmach korelacyjnego hamowania wzrostu (np. dominacji wierzchołkowej). Skutkiem działania hormonów hamujących wzrost jest bardziej zwarty pokrój rośliny, grubsze i silniejsze pędy oraz zmniejszenie dominacji wierzchołkowej, co sprzyja lepszemu krzewieniu i rozwojowi pąków bocznych. W interakcji hormonalnej regulującej wzrost roślin uczestniczą również: etylen, kwas jasmonowy, cytokininy.

Również prowadzi do zahamowania wzrostu produkcja reaktywnych form tlenu (ROS), w warunkach stresu, których nadmiar może uszkadzać błony komórkowe i białka obniżając intensywność wielu procesów w tym fotosyntezy i oddychania (gdzie głównie są produkowane).

W ocenianej rozprawie opisano metodę skarlania z zastosowaniem bodźca dotykowego stosowanego z różną intensywnością, zmienny był również czas trwania i częstotliwość bodźca, skarlanie prowadzono dla roślin petunii 4 odmian o różnym tempie wzrostu. Stosowano też porównawczo opryskiwanie roślin retardantami.

Niewiele wiadomo o mechanizmach regulujących wzrost i pokrój roślin w procesie stresu mechanicznego. Lepsze zrozumienie udziału hormonów w odpowiedzi na stres jest bardzo ważne aby poznać procesy/mechanizmy odpowiedzialne za adaptację roślin do zmiennych warunków środowiska. Ponieważ wykazano w licznych pracach, że zawartość hormonów zmienia się w warunkach stresu np. suszy, zasolenia, zmiany jakości światła podczas wzrostu, zmiany te dotyczą również interakcji różnych hormonów. Natomiast ograniczone są informacje dotyczące stresu mechanicznego, wskazuje to na konieczność wytyczenia nowego nurtu badań w warunkach przyjaznych dla środowiska.

Ocena szczegółowa dysertacji

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane pracom eksperymentalnym, jest krótka, obejmuje tylko 68 stron tekstu plus piśmiennictwo (13 stron) zawierające 255 pozycji literatury głównie angiojęzycznej oraz dołączono trzy publikacje (IF=11,463; pkt. MNiSW =420). Załączone do pracy oświadczenia współautorów publikacji wskazują jednoznacznie na dominującą rolę Doktorantki.

Treść pracy podzielona została na 10 rozdziałów, dodatkowo dołączono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz spis dorobku naukowego. Praca zawiera łącznie 17 rycin, z czego 7 stanowią tabele, 2 schematy, 2 wykresy i 6 zdjęć, ilustrujących zasadnicze tezy prezentowane i omawiane w części wstępnej pracy, materiale i metodach oraz w wynikach.

W opublikowanych 3 pracach znajduje się część wyników niniejszej rozprawy.

Celem recenzowanej pracy jest analiza wpływu stresu dotyku na wydłużanie roślin petunii (badano 4 odmiany o różnym tempie wzrostu w celu wyjaśnienia reagują podobnie/różnie na stres dotyku). Jednocześnie poszukiwano, która z dróg sygnalizacji uczestniczy w przekazywaniu informacji przy różnej

sile bodźca i czasie jego trwania. Analizowano zawartość: auksyn i giberelin, wybranych enzymów antyoksydacyjnych, transport auksyn, badano też ekspresję genów TCH odpowiedzialnych za syntezę kalmodulin i enzymów.

Założenia pracy są poprawne, oparte na solidnej znajomości literatury przedmiotu, cel został precyzyjnie zdefiniowany, jest oryginalny. Podjęcie tego tematu przez Doktorantkę można uznać za uzasadnione, zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i implikacji ich praktycznego wykorzystania w procesie hodowli roślin o pożądanym cechach.

Wstęp, określony w pracy jako "Przegląd literatury" zamieszczony na 21 stronach stanowi zwięzły przegląd opublikowanych wyników badań dotyczących zagadnień poruszanych w pracy i uzasadniających celowość podjętych badań. Wprowadzenie zostało podzielone na cztery podrozdziały, w których Doktorantka kolejno scharakteryzowała: odpowiedzi morfologiczne i anatomiczne roślin na dotyk, reakcję roślin na stres na poziomie hormonalnym i enzymatycznym, odpowiedzi molekularne związane z regulacją ekspresji wybranych genów, zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej.

Zostały zarysowane mechanizmy związane z udziałem kalmoduliny w ścieżce sygnałowej. Zbyt mało jednak poświęcono miejsca roli badanego czynnika stresowego jakim jest dotyk w regulacji dróg/i sygnalizacji komórkowej z udziałem Ca^{2+} /kalmoduliny. Szkoda, że omawiane treści wstępu zostały zilustrowane tylko jednym schematem, przedstawiającym udział białek DELLA w regulacji funkcji giberelin. We Wstępie znajdują się również 3 tabele ilustrujące udział różnych bodźców mechanicznych w regulacji morfologii rośliny.

Nie nasuwa się wiele uwag krytycznych, zauważalna jest natomiast duża ilość błędów stylistycznych.

Należy przyznać, iż Wprowadzenie zawiera najbardziej istotne informacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej, uwzględnia także najważniejsze pozycje piśmiennictwa dotyczące prezentowanej tematyki, co wskazuje na dobre opanowanie ogólnej wiedzy teoretycznej przez mgr inż. N. A. Kuźmę w obrębie naukowych zainteresowań.

Podsumowując tę część oceniam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Anny Kuźma prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną wymaganą do stopnia doktora w dyscyplinie "Rolnictwo i ogrodnictwo" SGGW w Warszawie.

Rozdział „Materiał i metody„ przedstawiony został na dalszych 9 stronach i zawiera bardzo ograniczony opis stosowanych w pracy technik badawczych. Część metodyczna jest momentami zdawkowa. Wynika to zapewne z faktu, że Kandydatka jest współautorką trzech prac dołączonych do rozprawy, opublikowanych w *Molecules*, *Scientific Reports* i *Scientia Horticulturae*. Kandydatka często odwołuje się do tych prac gdy chodzi o szczegóły zastosowanych technik. Nie jest to właściwe podejście przy pisaniu rozprawy doktorskiej gdzie oczekuje się szczegółowego opisu procedur np. różnorodnych technik hodowli roślin, oznaczenia zawartości hormonów i aktywności enzymów, immunodetekcji białek związanych z transportem auksyn czy badanie ekspresji wybranych genów. Kandydatka mogła zdecydować się na napisanie tylko streszczenia i zamieszczenie opublikowanych prac jako doktoratu, natomiast jeśli

zdecydowała się już na pisanie rozprawy, to według mnie należało część metodyczną opisać dokładnie, a znajdują się liczne odnośniki do publikacji.

Mało zrozumiałe są Schematy 1 i 2, prezentujące układ doświadczalny pilotażowy i właściwy, nie ułatwiają czytania rozprawy, zastosowano w tych eksperymentach inne odmiany petunii, *dlaczego?*. Moje obawy budzi fakt, że mgr inż. Natalia A. Kuźma nie podała w jakich warunkach świetlnych rosły rośliny retardowane chemicznie. Do wykonywania różnorodnych eksperymentów Doktorantka wykorzystywała rośliny rosnące w niskim natężeniu światła ($110 \mu\text{moli fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), zwiększano natężenie (nie podano na jakie?) gdy promieniowanie słoneczne było poniżej 400 W m^{-2} . *Dlaczego nie podano natężenia oświetlenia w tych samych jednostkach?* Istnieje niebezpieczeństwo, że rośliny z różnych warunków świetlnych mogły się różnić rozwojowo, a więc i metabolicznie i funkcjonalnie. W pracy natężenie światła podawane jest w $\mu\text{molach m}^{-2}\text{s}^{-1}$, podajemy w $\mu\text{molach fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Konstrukcja rozdziału **“Wyniki”** umożliwia śledzenie kolejnych kroków badawczych. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do postawionych hipotez co ułatwia śledzenie jak Autorka dochodziła do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania. Kandydatka sugeruje poszukiwanie szczegółów dotyczących wyników w publikacjach. Taka strategia nie ułatwiała analizy rozprawy.

Należy podkreślić, że w jednej pracy Kandydatka jest pierwszym autorem, w dwóch drugim. W informacjach podanych w publikacjach i oświadczeniach współpracowników wynika, że jej wkład nie polegał tylko na wykonywaniu eksperymentów, ale uczestniczyła ona również w tworzeniu planu badań, formułowaniu hipotez, pisaniu publikacji. We wszystkich pracach udział Doktorantki wynosi 55%. We współczesnej nauce współpraca z innymi badaczami jest niezbędną umiejętnością.

Zazwyczaj publikacje zawierają mniej informacji niż rozprawa doktorska, w ocenianej pracy jest odwrotnie.

W części omawiającej wyniki skarlania przez dotyk i z zastosowaniem retardantów umieszczono tabele i wykresy. Niestety objaśnienia w nich są bardzo mało czytelne ponieważ zastosowano wiele skrótów do poszczególnych eksperymentów, a w legendach brak objaśnień. W tej części pracy wykazano, np. że rośliny petunii o umiarkowanym wzroście były znacznie niższe po stresie niż rośliny kontrolne. Wynik skarlania był dobrze widoczny. Natomiast dla odmian silnie rosnących wykazano, że liczba cykli skarlania decydowała o hamowaniu wzrostu, badane dwie odmiany różniły się odpowiedzią na stres dotyku. Retardowanie chemiczne roślin o umiarkowanym wzroście dało podobny efekt jak stres dotyku. Rośliny te były znacznie niższe od kontrolnych. Analizowano też liczbę kwiatów w poszczególnych kombinacjach. Najintensywniejszy dotyk i retardowanie chemiczne prowadziło do tworzenia się największej liczby kwiatów, większej niż u roślin kontrolnych. Rośliny najstarsze traktowane retardantem miały więcej kwiatów niż przy skarlaniu mechanicznym, ale ich liczba była wyższa niż u kontroli.

- (1) Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazują, że intensywność stresu dotyku decyduje o intensywności wzrostu, najsilniejszy stres daje najlepszy efekt. Efekt skarlania zależy od badanej odmiany.

W celu wykazania, że mechanizm skarlania mechanicznego może być związany ze zmniejszoną zawartością endogennych auksyn i giberelin i/lub zahamowaniem transport auksyn, zwiększoną aktywnością

peroksydazową lub oksydazy IAA, wykonano szereg oznaczeń biochemicznych. Niestety w pracy brak wyników tych oznaczeń. Są tylko krótkie opisy. Doktorantka odsyła czytelnika do publikacji gdzie znajdują się wszystkie informacje. Zawartość auksyn oznaczano w stożkach wzrostu jednej odmiany ("Dark Red") i zależała ona od długości stresu, była najniższa po 7 dniach skarlania. Natomiast aktywność peroksydazowa zwiększała się wraz z czasem trwania stresu.

Badano również zawartość auksyn w stożkach wzrostu pędów i korzeni odmiany "Pegasus" ®Special Burgundy Bicolor oraz lokalizację białek: LAX1, AUX1 i PIN1, pośredniczących w transporcie IAA. Stwierdzono poprzez immunodetekcję obecność tych białek w wierzchołkach wzrostu pędu i korzeni, natomiast brak w pąkach bocznych. Nie stwierdzono różnic w transporcie auksyn pomiędzy roślinami kontrolnymi a skarłanymi mechanicznie.

Oznaczano również zawartość GA₃ w korzeniach i wierzchołkach pędów tylko u odmiany "Pegasus" ®Special Burgundy Bicolor. Stwierdzono, że zawartość kwasu giberelinowego zależała od intensywności i czasu trwania SM.

Badania aktywności oksydazy IAA wykazały różnice dla dwóch badanych odmian. U odmiany "Pegasus" ®Velvet Picotee aktywność zwiększała się wraz z czasem skarlania natomiast u odmiany "Pegasus" ®Special Burgundy Bicolor nie stwierdzono różnic na koniec eksperymentu.

Badanie aktywności peroksydazy POX w stożkach wzrostu pędów i korzeni odmiany "Pegasus" ®Special Burgundy Bicolor wykazało różnice w aktywności enzymu, ale po różnym czasie skarlania.

Stwierdzono również, że wzrostowi aktywności peroksydazowej towarzyszy lignifikacja i suberynizacja ścian komórkowych w łodygach.

- (2) Powyższe wyniki pokazują, że u roślin skarłanych mechanicznie obserwuje się obniżenie zawartości IAA i GA₃, bez wpływu na transport bazalny IAA. Aktywność peroksydaz może mieć wpływ na hamowanie wzrostu poprzez indukcję zmian w ścianach komórkowych łodyg.

Innym aspektem prowadzonych badań było wykazanie, wpływu skarlania mechanicznego na liczbę kwiatów. Badania wykazały, że zależy to od badanej odmiany. Najwięcej kwiatów w porównaniu z kontrolą stwierdzono u SM odmiany "Pegasus" ®Special Burgundy Bicolor. Jednocześnie u tej odmiany stwierdzono, że całkowita zawartość giberelin (GAs) była podobna jak u kontroli.

Celem badań było również wykazanie czy zmienia się ekspresja genów TCH związanych ze stresem dotyku. Badano ekspresję genu GH3.1 kodującego syntetazę amidową odpowiedzialną za inaktywowanie IAA przez wiązanie aminokwasów. Ponadto w celu wykazania czy sygnał indukujący zmiany w zawartości hormonów związany jest z ekspresją genów związanych z syntezą kolmoduliny badano ekspresję 3 genów CaM, mogło to pokazać, że ta droga sygnalizacji uczestniczy w mechanizmach hamowania wzrostu w warunkach stresu mechanicznego (dotyk).

Wyniki przeprowadzonych badań jasno wskazują, że skarłanie mechaniczne skutecznie redukuje wzrost roślin rabatowych bez obniżenia ich walorów dekoracyjnych i może być stosowane jako alternatywne rozwiązanie dla chemicznych regulatorów wzrostu.

Wszystkie założone przez autorkę pracy cele zostały w pełni zrealizowane

Ostatnia część pracy „Dyskusja” zawarta jest na 11 stronach, mimo licznych błędów stylistycznych i uproszczeń jest dobrze poprowadzona. Dyskusja została podzielona na części odpowiadające odpowiednim etapom pracy i podsumowuje osiągnięcia Doktorantki w tle prowadzonych na świecie badań. Doktorantka dobrze poradziła sobie z interpretacją ogromnej ilości wyników. Przeprowadziła pracochłonne i czasochłonne badania wykonując ogromną pracę doświadczalną. Dyskusja w świetle danych często pośrednich i trudnych interpretacyjnie stanowiła dla Doktorantki duże wyzwanie. Zawiera ona ciekawą propozycję prawdopodobnych funkcji kalmodulin, których ekspresja może być indukowana intensywnością stresu mechanicznego i np. uczestniczyć w regulacji zawartości czynników transkrypcyjny mających wpływ na ekspresję genu GH3.1, odpowiedzialnego za syntezę enzymu syntetazy amidowej, inaktywującą IAA. Inaktywacji auksyn jest ochroną przed negatywnymi skutkami spowodowanymi jej nadmiernym gromadzeniem i regulacją stężenia aktywnego biologicznie IAA w komórkach, poprzez magazynowanie bądź degradację tego hormonu. Auksyny mogą być inaktywowane odwracalnie poprzez tworzenie np. koniugatów amidowych z aminokwasami, peptydami lub białkami. Jest interesujące spostrzeżenie Kandydatki, że wzrost ekspresji genu GH3.1 jest skorelowany ze wzrostem aktywności oksydazy IAA, a jego wzmożona ekspresja przyczynia się do uzyskania przez rośliny większej odporności na stres.

Ważny dla regulacji poziomu aktywnej auksyny jest jej transport. Transport może być ograniczony do określonych szlaków, ze względu na konieczność występowania odpowiednich transporterów błonowych. Kandydatka badała poprzez immunolokalizację białka błonowe należące do 3 rodzin przenośników: AUX1, LAX1 i PIN1. Obecność tych białek stwierdzono w merystemie wierzchołkowym i tkance przewodzącej, a brak w pąkach bocznych. Mgr inż. N.A. Kuźma sugeruje, że obserwowane efekty mogą być też związane z syntezą cytokin w pąkach bocznych. Udział tych hormonów nie był badany. Stanowi to nowy problem badawczy gdyż analiza innych hormonów ma ogromne znaczenie dla zrozumienia, w jaki sposób rośliny regulują ich zawartość i lokalizację, czyli jak radzą sobie z różnorodnymi czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi, jak również warunkami stresowymi.

Obserwowane zahamowanie wzrostu roślin w warunkach SM było spowodowane obniżeniem zawartości auksyn i wiązało się ze wzrostem aktywności oksydazy IAA. Jest interesujące, że obserwowano wzrost aktywności peroksydazowej (POX) tylko w korzeniach, natomiast lignifikację i suberynizację ścian komórkowych w łodydze. Nie badano jednak aktywności innych enzymów antyoksydacyjnych podczas SM co mogło by wyjaśnić czy chronią one rośliny przed stresem oksydacyjnym przez wygaszanie reaktywnych form tlenu (ROS).

Podsumowując, w pracy doktorskiej mgr inż. Kuźmy przedstawiono nowe i oryginalne obserwacje naukowe. Szeroka gama eksperymentów jest oparta o niezbędne kontrole co świadczy o jakości i solidności wyników. Nie tylko dokumentacja, ale interpretacja uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. Fakt opublikowania wyników potwierdza tę opinie

Spostrzeżenia, pytania i uwagi krytyczne:

1. Praca napisana nietypowo, bardzo skrócone omówienie procedur i odwołanie do zamieszczonych publikacji, których tekst jest zmniejszony do czcionki 9, trudnej do czytania bez lupy.

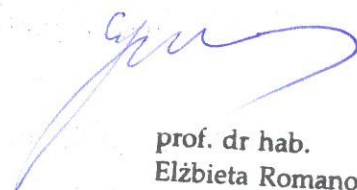
2. Wyniki z wyjątkiem tabel ilustrujących wysokości badanych roślin nie zawierają ilustrowanych wykresami, tabelami wyników badań !!!!!. Jest tylko opis słowny.
3. W „Dyskusji” brak odniesienia do stosowanych w badaniach retardantów.
4. Nie oznaczano poza POX aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Intensywność stresu można określić poprzez oznaczenie zawartości barwników: chlorofilu i karotenoidów. W warunkach stresu zawartość karotenoidów znacznie wzrasta (Chl/kar wynosi ok 10 w warunkach normalnych, w stresie ok. 4-5), ta ścieżka sygnałowa wydaje się być bardzo realna, a karotenoidy przecież wygaszają zarówno tlen singletowy jak i chlorofil tripletowy i emitowane jest ciepło.
5. Natężenia światła podajemy zawsze w tych samych jednostkach. Na str. 35 podano Wm^{-2} i w $\mu\text{molach m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (powinno być $\mu\text{mole fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Dlaczego?
6. Nie podano w ilu powtórzeniach przeprowadzono eksperymenty.
7. Praca zawiera błędy stylistyczne i uproszczenia.
8. Nie podano składu nawozu płynnego stosowanego w hodowli roślin. Ważne ze względu na jony Ca^{2+} .
9. Dlaczego w pracy nie wspomniano o kluczowym hormonie stresu kwasie abscysynowym (ABA)?
10. Uprzejmie proszę Doktorantkę by zechciała wyjaśnić jak rozumie proces stresu dotyku i w jaki sposób można wyrażać warunki tego stresu u roślin włączając drogi sygnalizacji komórkowej.
11. Jakie ścieżki transdukcji sygnałów funkcjonują w roślinach i czy są podobne/różne dla działających hormonów?

Wymienione powyżej uwagi mają głównie charakter redakcyjny i dyskusyjny, pozostają bez wpływu na merytoryczne walory pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej mgr inż. Natalii Anny Kuźma są wartościowe, zastosowano w nich szerokie spektrum technik doświadczalnych, są zinterpretowane w oparciu o dobrą znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmów skarlania roślin. Rozprawa świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Pani mgr inż. Natalii Anny Kuźma do samodzielnej pracy badawczej. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668, z późn. zm.). Wniosuję do Rady Dyscypliny „Rolnictwo i ogrodnictwo” SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Anny Kuźma do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Elżbieta Romanowska



prof. dr hab.
Elżbieta Romanowska

prof. dr hab.
Elżbieta Romanowska

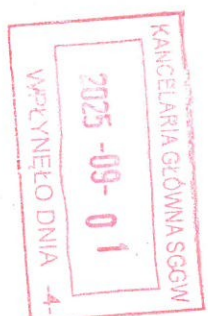
Nakład Nalekulanym Fizjologii Roslin
Instytut Biologii Srodowiskowej
Wydział Biologii UW



R



2025



Biurowo Obiektu Nauki
Szkola Główna Gospodarstwa
w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa