



Prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek
Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
jolanta.floryszak@up.poznan.pl

Poznań, dnia 05.01.2026 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wal

pt.: „Funkcje reaktywnych form tlenu i azotu w pułapce dzbanecznika brzuszego
(*Nepenthes x ventrata*) podczas rozwoju i trawienia pokarmu”

wykonanej na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW
pod kierunkiem dr hab. Urszuli Krasuskiej, prof. SGGW

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską stanowią cztery spójne w poruszanej tematyce artykuły naukowe. Z czego trzy publikacje dotyczą prac eksperymentalnych, a jedna stanowi artykuł przeglądowy. Wszystkie prace zostały opublikowane w latach 2022-2025 w czasopismach: *Plants*, *Biology*, *Plant Physiology and Biochemistry* oraz *Plant Science*, znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*, o łącznym współczynniku wpływu IF: 19,6 oraz sumie punktów 340, zgodnie z obowiązującą listą ministerialną.

W przedstawionym do recenzji wykazie prac znajdują się następujące publikacje:

1. ROS and RNS alterations in the digestive fluid of *Nepenthes x ventrata* trap at different developmental stages. Wal A., Staszek P., Pakula B., Paradowska M., Krasuska U. *Plants*, 2022, 11(23), 3304. <https://doi.org/10.3390/plants11233304>, (IF: 4,5 ; MNiSW: 70)
2. Do reactive oxygen and nitrogen species have a similar effect on digestive processes in carnivorous *Nepenthes* plants and humans? Krasuska U., Wal A., Staszek P., Ciacka K., Gniazdowska A. *Biology* 2023, 12(10), 1356., <https://doi.org/10.3390/biology12101356>, (IF: 4,0; MNiSW: 100),
3. Nitric oxide action in the digestive fluid of *Nepenthes x ventrata* is linked to the modulation of ROS level. Wal A., Piekarniak M., Staszek P., Chodór K., Bieniek J., Gniazdowska A., Krasuska U. *Plant Physiology and Biochemistry* 2024, 216, 109088. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109088>, (IF: 6,4; MNiSW: 70)
4. Nitric oxide stimulates digestion modifying the nutrient composition of the traps' fluid of *Nepenthes x ventrata*. Wal A., Staszek P., Gniazdowska A., Chrastný V., Šípková A., Bieniek

Wkład mgr Agnieszki Wal w powstanie prac eksperymentalnych, tj. w publikacje 1,3 i 4, jest wiodący i wynosi 50%. Wyjątek stanowi praca przeglądowa, w której Doktorantka deklaruje 40% udziału. Jak wynika z oświadczeń, Jej indywidualny udział w powstanie tych prac polegał na opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu kultury dzbanecznika brzuszego, wykonaniu lub współwykonaniu większości analiz i pomiarów laboratoryjnych w cieczy trawiennej pulapki dzbanecznika brzuszego oraz interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów. We wszystkich recenzowanych pracach mgr A. Wal pełni funkcje autora korespondującego. Do rozpraw zostały dołączone oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład dysertacji. Udział procentowy osób zaangażowanych wynosi od 5% do 20%, za wyjątkiem pracy przeglądowej, gdzie jeden współautor deklaruje 40% udział, podobnie jak Doktorantka. Zatem załączone wyjaśnienia nie budzą wątpliwości i gwarantują, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest bezdyskusyjnie autorstwa mgr Agnieszki Wal.

Prace stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane w ostatnich czterech latach i wg bazy Scopus na grudzień 2025, mają w kolejności opublikowanych prac odpowiednio 5,3,2 i 0 cytowań. Brak cytowania dotyczy pracy wydanej w bieżącym roku, podczas gdy wzrastająca liczba cytowania prac wcześniejszych świadczy o zainteresowaniu środowiska naukowego podjętą tematyką badań.

Przygotowana, w oparciu o wymienione powyżej publikacje, rozprawa doktorska nosi tytuł „Funkcje reaktywnych form tlenu i azotu w pulapce dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*) podczas rozwoju i trawienia pokarmu”. Struktura pracy jest poprawna. Na wstępie zawiera oświadczenie Autorki potwierdzające samodzielne wykonanie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW oraz akceptację Promotora. Rozprawa liczy 75 stron i obejmuje: *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Wykaz publikacji* stanowiących rozprawę, *Wykaz skrótów*, a w ramach *Wprowadzenia* Doktorantka scharakteryzowała rośliny owadożerne i dokonała wprowadzenia do tematyki badawczej poruszanej w rozprawie. W kolejnych podrozdziałach sformułowała: *Cel pracy*, *Hipotezy badawcze*, zamieściła *Materiał badawczy*, *Metody badań*, *Opis badań z elementami dyskusji*, *Podsumowanie z Wnioskami* oraz *Bibliografię* liczącą 113 pozycji anglojęzycznych. Do pracy dołączono 4 opublikowane kopie prac, wraz z materiałem uzupełniającym oraz odpowiednie oświadczenia o współautorstwie, dotyczące indywidualnego udziału w powstaniu pracy.

Należy zatem podkreślić, że dysertacja zawiera wszystkie elementy wymagane dla pracy doktorskiej z dyscypliny nauki biologiczne i spełnia kryteria stawiane rozprawie doktorskiej. Załączone w ramach rozprawy doktorskiej prace naukowe opublikowano w uznanych

czasopismach, a udział Doktorantki jest dominujący. Mgr Agnieszka Wal uczestniczyła we wszystkich etapach badań i w przygotowaniu każdego manuskryptu.

Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła w dysertacji wykazu swojego dotychczasowego dorobku naukowego, tj. pozostałych publikacji, czy pełnej aktywności w zakresie doniesień naukowych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Tematyka badawcza

W pracy podjęto oryginalną i nowatorską tematykę badawczą, mającą na celu poznanie wpływu tlenku azotu (NO) i jego pochodnych (NO_x) na interakcje rozwojowe i metaboliczne pułapek dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*). Prace, przedstawione w ramach niniejszej dysertacji, są kontynuacją i rozszerzeniem badań podjętych przez Panią Promotor dr hab. Urszulę Krasuską, prof. SGGW. W kontekście prowadzonych od ponad 25 lat intensywnych badań, m.in. nad rolą sygnałową, regulacyjną czy metaboliczną NO w świecie roślin, podjętą tematykę wyjaśniającą rolę tlenku azotu w rozwoju pułapek oraz pozyskiwaniu składników pokarmowych przez roślinę mięsożerną, uważam za bardzo nowatorską i cenną z poznawczego punktu widzenia.

Informacje w tym zakresie, dotyczące nie tylko generowania reaktywnych form azotu (RNS), czy reaktywnych form tlenu (ROS), ale także ich wzajemne interakcje (RNS/ROS) przełożone na zmiany statusu redoks, modyfikacje potranslacyjne białek oraz ekspresję genów kodujących enzymy trawienne w cieczy oraz tkance strefy gruczołowej pułapki dzbanecznika (*N. x ventrata*), stanowią ważny i dotąd nierozpoznany problem badawczy. Metody uprawowe i analityczne stosowane do weryfikacji sześciu przyjętych hipotez były właściwe. **Podjęta tematyka badawcza jest zatem istotna z wielu względów, a rozwiązywany problem w swoim nowatorskim ujęciu może stanowić podstawę dysertacji, której celem jest uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych.**

Merytoryczna ocena pracy

Wprowadzenie

We wstępie do tej części pracy Doktorantka scharakteryzowała rośliny mięsożerne (*Plantae carnivorae*), ze szczególnym akcentem położonym na monotypową rodzinę dzbaneczników (*Nepenthaceae*). Podala naturalne występowanie tych unikatowych organizmów autotroficznych, które w środowiskach Azji Południowo-Wschodniej, bardzo ubogich w składniki pokarmowe, wykształciły rzadki dla roślin syndrom mięsożerności. Pułapka dzbanecznika jest zmodyfikowanym liściem, stąd Autorka dużo uwagi poświęciła rozwojowi i budowie pułapki oraz zawartości cieczy trawiennej dzbaneczników. W oparciu o dane literaturowe, wnikliwie scharakteryzowała skład roztworu trawienno-dzbanecznika, którego istotnymi komponentami są różne związki o aktywności biologicznej oraz enzymy hydrolityczne, takie jak: proteazy, fosfatazy, chitynazy, esterazy czy RNazy. Dalej w sposób dosyć hasłowy, opisała powstanie i biologiczne funkcje reaktywnych form tlenu, w powiązaniu

z systemem antyoksydacyjnym odpowiedzialnym za utrzymanie ROS w komórkach roślinnych. Najprawdopodobniej z braku innych danych literaturowych, podaje jeden przykład stwierdzonej obecności ROS w cieczy trawiennej u trzech gatunków dzbanecznika (Chia i in., 2004). W nawiązaniu do realizowanych celów pracy doktorskiej, kolejne poruszone w wstępie zagadnienie dotyczyło tlenku azotu, reaktywnych form azotu, modyfikacji potranslacyjnych inicjowanych przez RNS, wybranych przykładów funkcji pełnionych przez NO w świecie roślin oraz w przewodzie pokarmowym zwierząt.

Do tej części pracy mam, niestety, wiele zastrzeżeń. Co prawda Doktorantka zamieściła wykaz skrótów, ale w tekście omawianej sekcji prawie wyłącznie operowała skrótami, co często czyniło zdanie mało czytelnym i prowadziło do licznych błędów edytorskich. Przytaczam wybrane przykłady:

- str. 18 Wykaz skrótów HNO – nitorksyl (*zamiast nitroksyl*)
- str. 30 Legenda Ryc. 6 W opisie ryciny HNO₂ opisany jako kwas azotowy (*zamiast azotawy*)
- str. 32 Nitrowanie Tyr*pięć linijek poniżej*nitrowanie Try
- str. 33W konsekwencji prowadzi to do obniżenia stężenia ·OH i ONOO·. W ten sposób zwiększa się ilość wolnego NO, który wchodzi w reakcję z GSH, prowadząc do powstania GSNO. GSNO to najlepiej poznany S-nitrotiol (*tu błąd S-nitrozotiol*) o niskiej masie cząsteczkowej w roślinach.
- str. 51Równolegle ze wzrostem zawartości P i poziomu traksrtyptów (*chyba transkryptów*) genów kodujących Pap odnotowano zwiększenie aktywności Pap w cieczy trawiennej *N. x ventrata* po dodaniu NO_x, niezależnie od czasu po karmieniu.

Cel badań i hipotezy badawcze

Doktorantka sprecyzowała główny Cel pracy, który obejmował realizację sześciu celów szczegółowych. Sformułowanie głównego celu pracy powinno być bardzo precyzyjne. W tym względzie mała uwaga recenzenta. Autorka wielokrotnie podkreśla nowatorskość podjętych badań, akcentując fakt, że w literaturze brakuje informacji dotyczących obecności RNS w cieczy trawiennej roślin mięsożernych. Natomiast w głównym celu pracy i całym tekście, znajdują się wielokrotnie powtarzane zwroty, jakoby Doktorantce chodziło o **potwierdzenie**, a nie stwierdzenie po raz pierwszy, występowania tlenku azotu oraz reaktywnych form azotu i dalej poznanie udziału RNS w kooperacji z ROS w procesie trawienia pokarmu w pułapkach dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*). Realizacja nadrzędnego celu pracy wymagała zastosowania dwóch podejść eksperymentalnych: pierwszy wariant zakładał analizę składników pokarmowych w różnej fazie rozwoju pułapki, podczas gdy drugi wariant polegał na podaniu pokarmu lub pokarmu wraz z donorem NO w postaci zakwaszonego azotynu sodu, z zamiarem analizy zmian metabolicznych modyfikowanych *via* NO, w rozwoju pułapek otwartych oraz w regulacji procesów pozyskiwania składników pokarmowych przez roślinę mięsożerną.

Realizacja celów szczegółowych obejmowała sześć logicznie zaplanowanych zadań do wykonania. Jednak zadanie ostatnie brzmi bardzo enigmatycznie i wymaga gruntownej korekty stylistycznej. Cytat ze str. 37: Potwierdzenie obecności i zamian (*chyba zmian*) zawartości białek podlegającym (*chyba podlegających*) RONS zależnym nieodwracalnym (???) PTM białek (karbonylacji i nitrowania tyrozyny) izolowanych z cieczy trawiennej w obecności NOx wprowadzanych z pokarmem podczas trawienia.

Doktorantka postawiła sobie ambitne cele, których realizacja możliwa była wyłącznie dzięki wykorzystaniu nowoczesnych narzędzi badawczych z zakresu fizjologii roślin, biologii molekularnej oraz dzięki zastosowaniu technik wizualizacji *in situ* czy spektroskopii emisyjnej, opisanych szczegółowo w kolejnym rozdziale: Materiał badawczy i modele doświadczalne.

Bardzo precyzyjny opis pozwala czytelnikowi zrozumieć poszczególne etapy prac badawczych realizowanych przez Doktorantkę, w tym prowadzoną kulturę dzbanecznika brzuszego, kryteria doboru i sposób podawania pokarmu. **Nie ma zastrzeżeń co do stosowanych metod badawczych i przypisanie ich do poszczególnych publikacji.** Za wyjątkiem metody amperometrycznego pomiaru stężenia NO z wykorzystaniem systemu pomiarowego Nitric Oxide Measuring System, błędnie przypisanego do publikacji 1.

Wyniki i ich dyskusja z podsumowaniem

Realizacja prac eksperymentalnych została zaplanowana logicznie. Kolejność wykonywanych zadań oraz zastosowane warianty doświadczalne dawały szansę na prawidłową weryfikację przyjętych hipotez badawczych. Jednak **we wnioskach końcowych i weryfikacji hipotez** (str.60) postawiono zdecydowane odpowiedzi na wyznaczone uprzednio cele szczegółowe typu: NOx stymulują ekspresję genów....., NOx modulują ilość i jakość składników cieczy trawiennej, NOx modulują zawartość ROS itp. Biorąc jednak pod uwagę wysoką reaktywność i różnorodność funkcjonalną NO i jego pochodnych, które z kolei pozostają w złożonych interakcjach z innymi komponentami i sygnałami endogennymi, bezpieczniejsze byłoby wnioskowanie typu: stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy zwiększoną (bio)dostępnością NOx, a wzrostem ekspresji genów..... itd. Proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do poruszanej kwestii.

Cztery prace, wchodzące w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej, zostały wydane w liczących się czasopismach z zakresu Plant Science, o wysokim współczynniku oddziaływania i tym samym uzyskały pozytywne recenzje od ekspertów z tej dziedziny wiedzy. Jednak z obowiązku recenzenta odniosę się do najważniejszych osiągnięć i ich omówienia w kontekście postawionych zadań badawczych.

W pracy nr 1, na wszystkich etapach rozwoju pulapki dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*), stwierdzono występowanie NO w płynie trawiennym pulapki. Najwyższy poziom NO, mierzony sygnałem pochodnych znacznika fluorescencyjnego DAF-FM DA, odnosił się do pulapki dojrzałej, zarówno karmionej, jak i pozbawionej pokarmu. Z kolei wysoki poziom nadtlenoazotynu w

dojrzałej i niekarmionej pułapce, współgrał z produkcją rodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$) i okresowym spadkiem całkowitej zdolności antyoksydacyjnej cieczy trawiennej. Zdaniem Autorki, stosunkowo wysoki poziom $O_2^{\cdot -}$ w pułapkach niedojrzałych i zamkniętych, może mieć związek z procesami rozwoju dzbanka trawienno oraz działaniem przeciwbakteryjnym ROS.

Zarówno w publikacji nr 1, jak i 3, pomimo różnych modeli eksperymentalnych, tzw. rozwojowego i wzbogaconego w donor NO, Doktorantka zastosowała różne pokarmy dozowane do pułapek, tj. białko jaja kurzego lub muszki owocówki (w przypadku oznaczania poziomu NO w cieczy pułapek). W pracy podała uzasadnienie metodyczne, związane z oznaczaniem NO. Proszę jednak o ustosunkowanie się do następujących kwestii: 1. Czy w celu wyeliminowania NO pochodzącego od żywych muszek owocówek, zastosowano też muszki martwe w pokarmie? 2. Czy przy tak zróżnicowanym pokarmie, jak białko jaja kurzego i muszki owocówki, można porównywać kinetykę generowania RNS i ROS w pułapkach - Ryc.12? 3. Ilość donora NO została zweryfikowana eksperymentalnie (dane nieopublikowane - str.41), w jaki sposób? Kolejne pytanie dotyczy oznaczania poziomu rodnika ponadtlenkowego w pracy nr 1 i 3, w odniesieniu do dojrzałej niekarmionej pułapki oraz dojrzałej pułapki karmionej roztworem białka jaja kurzego. W publikacji nr 1, po podaniu pokarmu, odnotowano ok. 30% spadek poziomu rodnika ponadtlenkowego, a w pracy nr 3, około 3-krotny wzrost w stosunku do niekarmionej (lub NF) pułapki. Proszę o odniesienie się do powyższych kwestii.

Wysoko oceniam publikację nr 2, która już w samym tytule stawia kwestię porównania udziału ROS i RNS w procesie trawienia pokarmu, w pułapce roślin mięsożernych i przewodzie pokarmowym człowieka. Doktorantka oprócz poruszanych kwestii funkcjonowania ROS/RNS, dyskutowanych w oparciu o bogatą literaturę tematyczną, podaje szczegółową charakterystykę roślin mięsożernych i tym samym popularyzuje stosunkowo rzadki obiekt badań naukowych.

W pracy nr 3, po podaniu donora NOx wraz z pokarmem, stwierdzono wzrost aktywności proteolitycznej cieczy trawiennej, większą liczbę prążków białkowych po rozdiale elektroforetycznym, obecność białek zawierających nitrowaną tyrozinę oraz białka z grupami karbonylowanymi (w pracy nr 4), w cieczy oraz w tkance strefy gruczołowej pułapek otwartych. Szkoda, że nie dokonano identyfikacji tych modyfikowanych białek.

W ostatniej pracy eksperymentalnej udokumentowano, że zwiększona dostępność reaktywnych form azotu podana z pokarmem, korelowała ze wzrostem ekspresji genów (*NepI* i *NepII*) kodujących proteazy aspartylowe, co współgrało ze wzmoczoną aktywnością proteolityczną w cieczy trawiennej. Obecność NOx wraz z pokarmem, zwiększała także aktywność kwaśnych fosfataz (Pap), esteraz oraz poziom transkryptów kodujących *Pap* i *RNazy*, co wpływało pozytywnie na proces trawienia i pozyskiwania składników pokarmowych przez analizowaną roślinę mięsożerną.

Podsumowanie recenzji

Niezależnie od szczegółowych dociekań i krytycznych uwag recenzenckich, wysoko oceniam pod względem merytorycznym opublikowane cztery prace autorstwa mgr A. Wal. Doktorantka wykazała się umiejętnością wykonania analiz i porównania uzyskanych wyników empirycznych. Muszę jednak zaznaczyć, że opis otrzymanych danych i przeprowadzona dyskusja z podsumowaniem, nie dorównuje wysokiemu standardowi merytorycznemu wydanych publikacji, które czyta się z przyjemnością. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr A. Wal w czasie realizacji pracy opanowała szereg metod i technik badawczych, tj. immunoenzymatyczna, spektroskopii emisyjnej czy wizualizacji *in situ*. Uzyskane w pracy dane empiryczne przedyskutowała w oparciu o bogatą literaturę anglojęzyczną, dotyczącą powstania i funkcji, jakie pełnią ROS oraz RNS w świecie roślin, w odniesieniu do bardzo ubogiej wiedzy z zakresu fizjologii roślin owadożernych. W tym względzie Doktorantka pokusiła się o dość ryzykowne, chociaż dyskusyjnie dopuszczalne i atrakcyjne porównanie funkcji regulacyjnej NO w pulapce trawiennej dzbanecznika brzuszego, do roli jaką pełni NO w przewodzie pokarmowym ssaków.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej do oceny pracy doktorskiej zaliczam:

1. Unikatowe podejście doświadczalne, czyli eksperymentowanie na bardzo ciekawej roślinie mięsożernej - dzbaneczniku brzuszonym (*N. x ventrata*), zapewne trudnej w uprawie.
2. Nowatorskie udokumentowanie generowania tlenu azotu przez pulapki pokarmowe dzbanecznika, na różnym etapie ich rozwoju.
3. Stwierdzenie, na bazie uzyskanych wyników, że podanie donora NO wraz z pokarmem amplifikuje procesy trawienne, zarówno w cieczy, jak i w tkance strefy gruczołowej pulapek, w postaci zwiększonej ekspresji genów (*nepentezyn*, *RNazy* i kwaśnej fosfatazy), aktywności enzymów proteolitycznych oraz wzmocnienia dekompozycji składników pokarmowych, w formie nitrowania tyrozyny oraz karbonylacji białek, ułatwiając tym samym przyswajanie pokarmu.
4. Potwierdzenie obecności anionorodnika nadadtlenkowego w pulapce dzbanecznika brzuszego (*N. x ventrata*), oraz wzbogacenie wiedzy o dotąd nieznany aspekt funkcjonalnej interakcji reaktywnych form tlenu i reaktywnych form azotu, w rozwoju pulapek i trawieniu pokarmu w dzbanku rośliny mięsożernej.

Jestem przekonana, że uzyskane wyniki, w efekcie realizacji przedstawionej dysertacji, wnoszą nowe informacje do stanu współczesnej wiedzy na temat udziału RNS/ROS w procesie funkcjonowania i regulowania balansu redoks pulapek dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes x ventrata*), przed i po przyswojeniu przez nie pokarmu. Zatem, zasługują na uwagę szerokiego kręgu badaczy, nie tylko z zakresu nauk biologicznych. O faktycznym zainteresowaniu opublikowanych czterech prac niech świadczy wzrastająca liczba ich cytowań do 10.

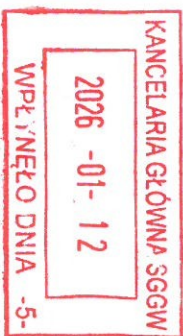
Zamieszczone w tekście recenzji uwagi krytyczne, wskazujące na niejasności i błędy edytorskie, w niczym nie pomniejszają wysokiej wartości merytorycznej dysertacji.

Wnioski końcowe

Zdaniem recenzenta, oceniającego przedłożoną dysertację mgr Agnieszki Wal, rozprawa spełnia wszystkie wymagania określone w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora prowadzone na podstawie Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), w trybie określonym Uchwałą Nr 89-2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku, w sprawie uchwalenia Regulaminów przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Agnieszki Wal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek/



**PRIORITET
PRIORITAIRE**

BIURO OBSŁUGI NFAU
SGGW w Warszawie
ul. Nowoursynowska 1
02-787 Warszawa



R



Poczta Polska
Opłata pobrana 1 zł 81