

Dr hab. inż. Tomasz Warzecha, prof. URK
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Ul. Łobzowska 24, 31-140 Kraków

Kraków, 23.12.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Koniecznej pt. „Rola metalotionein owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe” wykonanej w Katedrze Genetyki Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem Prof. dr hab. Grażyny Dąbrowskiej, oraz dr Agnieszki Mierek-Adamskiej (promotor pomocniczy).

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. Justyny Rogalskiej, Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu nr 81 z dnia 25.10.2024.

Pani mgr Wiktoria Konieczna jest autorką 6 publikacji w czasopismach znajdujących się na liście JCR. W czterech artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem, w grupie tych prac znajdują się artykuły wykorzystane do przygotowania rozprawy doktorskiej. Kandydatka aktywnie brała udział w zdobywaniu funduszy na pokrycie kosztów wyjazdów na staże, konferencje międzynarodowe, oraz realizację dwu projektów badawczych (fundusze w ramach działalności statutowej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika oraz w ramach projektu Uczelnia Badawcza - Inicjatywa Doskonałości (IDUB) - Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu). Uczestniczyła w realizacji trzech projektów w tym jeden przedwdrożeniowy w charakterze wykonawcy, ponadto brała udział w sześciu konferencjach naukowych, na których była współautorką 4 posterów oraz 3 referatów. Odbyła dwa krótkoterminowe staże naukowe, jeden zagraniczny w Warwick University, Department of Chemistry, Coventry, Wielka Brytania (17.01-16.02.2023) oraz jeden w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie (09.05-28.05.2021). Tu drobne sprostowanie zapewne jako przejęzyczenie w opisie dorobku Doktorantki w rozdziale „Dorobek naukowy” pojawia się „Staż krajowy do Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Państwowej Akademii Nauk w Krakowie w dniach 09.05-28.05.2021” zamiast Polskiej Akademii Nauk. Pani mgr Wiktoria Konieczna dotychczas nie ubiegała się o nadanie stopnia doktora.

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Koniecznej dotyczy identyfikacji genów metalotionein owsa *Avena sativa* L. (AsMT) i określenia roli kodowanych przez nie białek w reakcji owsa na różne czynniki środowiskowe. Kandydatka w swojej analizie uwzględniła następujące czynniki: stres suszy, stres osmotyczny, metale ciężkie jako abiotyczne czynniki stresowe, badała również wpływ grzybów *Trichoderma viride* jako przykład induktorów biotycznych, które znane są jako czynniki promujące wzrost roślin.

Kandydatka wybrała do testowania hipotez badawczych owies będący ciekawym ale też trudnym obiektem do badań genetycznych z powodu swojego poliploidalnego charakteru, jest to również ważna roślina uprawna o dużym znaczeniu gospodarczym. Ten fakt podnosi wartość opracowania przedstawionego przez Panią mgr Wiktorię Konieczną gdyż poza aspektem poznawczym wnosi również aspekt społeczny, ekologiczny i aplikacyjny gdyż przed postępowaniem biologicznym w branży hodowlanej i nasiennej owsa staje ogromne wyzwanie dopasowania uprawianych odmian do wymagań społecznych (np. alergie pokarmowe jak celiakia), rynkowych oraz do zmieniających się warunków środowiskowych (np. globalne ocieplenie i okresy suszy). Kandydatka analizowała role metalotionein w regulacji odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe abiotyczne i induktory biotyczne, które mają wpływ na szereg procesów fizjologiczno-biochemicznych od kiełkowania poprzez tworzenie biomasy i ostatecznie formowania plonu. Wyniki badań Doktorantki zostały dobrze udokumentowane a ich efekty Pani mgr Wiktoria Konieczna opublikowała wraz z współautorami w następujących artykułach opublikowanych na przestrzeni lat 2023-2024:

1. Konieczna W., Mierek-Adamska A., Warchoń M., Skrzypek E., Dąbrowska G. B. The involvement of metallothioneins and stress markers in response to osmotic stress in *Avena sativa* L. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2023, 209(3), 371-389. doi.org/10.1111/jac.12633 (IF: 3,7 ; IF5-year: 4,0; MEiN: 140)
2. Konieczna W., Warchoń M., Mierek-Adamska A., Skrzypek E., Waligórski P., Piernik A., & Dąbrowska G. B. Changes in physio-biochemical parameters and expression of metallothioneins in *Avena sativa* L. in response to drought. *Scientific Reports*, 2023, 13(1), 2486. doi.org/10.1038/s41598-023-29394-2 (IF: 3,8; IF5-year: 4,3; MEiN: 140)
3. Konieczna W., Mierek-Adamska A., Chojnacka N., Antoszewski M., Szydlowska-Czerniak A. and Dąbrowska G. B. Characterization of the metallothionein gene family in *Avena sativa* L. and the gene expression during seed germination and heavy metal stress. *Antioxidants*, 2023, 12(10), 1865. doi.org/10.3390/antiox12101865 (IF: 6,0; IF5-year: 6,7; MEiN: 100)
4. Konieczna W., Turkan S., Warchoń M., Skrzypek E., Dąbrowska G. B., and Mierek-Adamska A. "The contribution of *Trichoderma viride* and metallothioneins in enhancing the seed quality of *Avena sativa* L. in Cd-contaminated soil." *Foods*, 2024, 13(15), 2469. doi.org/10.3390/foods13152469 (IF: 4,7; IF5-year: 5,1; MNiSW: 100)

Sumaryczny IF prac Kandydatki wchodzących w skład rozprawy to 18,20; natomiast sumaryczna liczba punktów ministerialnych (wg roku opublikowania) to 480. Pozostały dorobek publikacyjny Pani mgr Wiktorii Koniecznej to prace w dwóch czasopismach z listy JCR (*Agronomy* MDPI 2021 oraz *PeerJ* 2023) o łącznej punktacji MEiN 200 oraz IF 6,0.

Chciałbym tu uwypuklić, że prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach znajdujących się w wykazie JCR i posiadają wysokie współczynniki wpływu. Ponadto prace te przeszły proces estymacji przez recenzentów wybranych przez redakcje czasopism będących ekspertami w danej dziedzinie. Stąd też w swojej recenzji chciałbym skupić się na układzie rozprawy doktorskiej i spójności prezentowanego w każdym artykule tematu jako rozwiązanie ogólnego problemu badawczego.

Stres roślin może być wywołany czynnikami abiotycznymi jak wysoka lub niska temperatura, nadmierne lub zbyt niskie natężenie światła, zmiany w ilości dostępnej wody, ponadto zanieczyszczenie powietrza i wody. Druga grupa czynników to czynniki biotyczne, jak szkodniki i patogeniczne mikroorganizmy wpływające wielokierunkowo na ograniczenie wzrostu i rozwoju roślin. To cała gama czynników zewnętrznych, które powodują zmiany w optymalnym środowisku rośliny i które mają wpływ na szereg procesów, których efekty można zaobserwować makroskopowo jak choćby zmiana pokroju rośliny, ograniczenie wzrostu, zmiany w intensywności wybarwienia organów roślinnych, oraz obniżenie zdolności reprodukcyjnych. W przypadku roślin użytkowych stresy środowiskowe powodują zmniejszenie plonowania co prowadzi do dużych strat ekonomicznych. Stąd też tematyka

podjęta przez Doktorantkę ma istotny aspekt poznawczy ale również spory potencjał aplikacyjny co na pewno podnosi wartość opracowania.

Pani mgr Wiktoria Konieczna podjęła się trudnego zadania identyfikacji genów metalotionein owsa (*AsMT1-4*) i oznaczenia roli białek które kodują w odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe (stres abiotyczny – susza, stres osmotyczny, metale ciężkie). Szczegółowe cele badawcze to: 1) poznanie i scharakteryzowanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych MT owsa zwyczajnego; 2) sprawdzenie udziału AsMT we wzroście i rozwoju roślin owsa zwyczajnego; 3) ustalenie roli AsMT w odpowiedzi roślin owsa zwyczajnego na obecność jonów metali ciężkich (Cd i Zn) i grzybów z rodzaju *Trichoderma*; 4) ocenie wpływu stresów suszy i osmotycznego na ekspresję AsMT i parametry biochemiczne roślin owsa zwyczajnego.

Poznanie mechanizmów molekularnych kontrolujących podstawowe procesy zachodzące w roślinach to kluczowy element rozwoju hodowli roślin i efektywnej produkcji roślinnej. Ponadto zrozumienie mechanizmów ukrywających się za odpowiedzią na stresowe czynniki środowiskowe da możliwość dostosowania optymalnych działań rolników w celu ograniczenia strat w plonowaniu przy zmniejszeniu kosztów i obniżeniu konieczności stosowania chemicznych środków ochrony roślin i przyczyni się do zmniejszenia zanieczyszczenia środowiska. Kandydatka w swojej pracy doktorskiej postawiła hipotezę badawczą, która zakłada, że metalotioneiny to białka konserwowane ewolucyjnie, o potencjalnej roli w wielu procesach zachodzących w roślinach w tym we wzroście i rozwoju oraz odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe.

W genomie *Avena sativa* L. zidentyfikowano 21 genów *MT*, należących do czterech typów (*AsMT1-4*). Geny te w swoich sekwencjach promotorowych zawierają cis-elementy odpowiedzialne za reakcję rośliny na takie czynniki jak: metale ciężkie, fitohormony, światło, niedobór wody i czynniki biotyczne, ponadto znajdują się tam też elementy regulatorowe związane z rozwojem roślin. Kandydatka wraz z zespołem badawczym założyła, że metalotioneiny pełnią specyficzną rolę i są niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Pani mgr Wiktoria Konieczna wykazała zmiany ekspresji *AsMT1-4* w pierwszych godzinach kiełkowania nasion owsa, przy czym całkowita ilość transkryptów AsMT pozostawała taka sama. Obecność jonów metali (Zn, Cd oraz mieszaniny Zn i Cd) powodował w różnym stopniu zmiany ilości transkryptów *AsMT1-4* w korzeniach i pędach siewek owsa. Doktorantka obserwowała wzrost zawartości fenoli oraz antyoksydantów hydrofilowych i lipofilowych, a zmiany te korelowały z ekspresją *AsMT*, zmiany te obserwowała po zastosowaniu stresu wywołanego metalami ciężkimi w 21-dniowych roślinach owsa. Ponadto w eksperymencie donicowym Kandydatka wraz z zespołem wykazała, że wzrost zawartości Cd w glebie powoduje zmniejszenie biomasy owsa i liczby wytworzonych nasion oraz wzrost zawartości Cd w części nadziemnej roślin, natomiast nie stwierdziła istotnych statystycznie zmian ekspresji *AsMT*. Do zmian w ekspresji *AsMT1-3* doszło w obecności *Trichoderma viride*, co wskazuje na udział AsMT w interakcji tego gatunku z grzybem saprofitycznym. Jak wskazuje Doktorantka stres osmotyczny oraz stres suszy powodował zmiany ekspresji genów *AsMT* w pędach i korzeniach oraz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak również zawartości kwasu abscysynowego, związków fenolowych i cukrów.

Pani mgr Wiktoria Konieczna w swoim opracowaniu podkreśla, że przeprowadzone badania wskazały, iż metalotioneiny owsa biorą udział nie tylko w odpowiedzi na obecność jonów metali w środowisku, ale są nieodłącznym elementem odpowiedzi na stresse osmotyczny i suszy oraz biorą udział w interakcji roślina-grzyb. U *Avena sativa* poszczególne typy AsMT pełnią różnorodne funkcje, czego dowodzi wykazanie korelacji pomiędzy poziomem ich ekspresji a zmianami biochemicznymi zachodzącymi w komórkach roślinnych na skutek różnorodnych stresów. Kandydatka wskazuje iż metalotioneiny AsMT2 i AsMT3 mogą stanowić odpowiednio markery molekularne suszy i stresu osmotycznego. Natomiast AsMT1 może być

wskaźnikiem stresu powodowanego metalami ciężkimi gdyż jego ekspresja jako pierwsza zmienia się pod wpływem stresu wywołanego obecnością kadmu.

Podsumowując powyższe stwierdzenia, myślę że podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie funkcji metalotionein i oznaczenia ich roli w odpowiedzi na różnorodne czynniki środowiskowe (stres abiotyczny – susza, stres osmotyczny, metale ciężkie, obecność mikroorganizmów z rodzaju *Trichoderma*) oraz identyfikacja genów metalotionein owsa (*AsMT1-4*) jest wysoce uzasadnione biorąc pod uwagę zarówno aspekty poznawcze jak i możliwości potencjalnego wykorzystania uzyskanych wyników w doskonaleniu owsa metodami klasycznej hodowli rekombinacyjnej czy zastosowaniem transgenezy bądź edycji genomu. Ponadto przedstawione opracowanie spełnia również wymóg spójności tematycznej rozwiązując problem badawczy jakim jest znaczenie stresów środowiskowych w procesach wzrostu i rozwoju *Avena sativa* również w ujęciu molekularnym.

Ocena i uwagi dotyczące poszczególnych rozdziałów

W otrzymanej do recenzji pracy występują wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich zatem spełnia ona wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Obejmuje ona 67 stron druku plus kopie prac będących podstawą opracowania, Załączniki 1-4 (Publikacje I-IV), oraz 3 strony zawierające załącznik 5. „Dorobek naukowy” a tekst uzupełniają 2 ryciny. Praca opiera się na cyklu 4 publikacji które są dostępne w całości w Rozdziale VIII. Załączniki.

W toku wywodu Autorka cytuje 243 pozycje literatury, w tym większość to prace anglojęzyczne (95%) wiele z ostatnich 5 lat, ponadto cytowane są czterokrotnie również źródła internetowe. Tak rozbudowany wykaz literatury, który na pewno wyróżnia pracę Pani mgr Wiktorii Koniecznej ma swój wydzźwięk w obszernym i wyczerpującym rozdziale „Wstęp” oraz „Wyniki i dyskusja”. Recenzowana rozprawa doktorska została napisana w sposób staranny i przejrzysty.

Rozprawę doktorską otwiera „Wykaz skrótów”, który jest pomocny, zwłaszcza w tego typu pracach zawierających treści molekularne i biochemiczne, następnie rozdział I Streszczenia. 1. Streszczenie w języku polskim; 2. Streszczenie w języku angielskim (abstract). Kolejny rozdział to II. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, wykaz jest tabelaryczny i zawiera wartości IF oraz punktacje MEiN oraz MNiSW dla poszczególnych artykułów oraz sumaryczne wartości naukometryczne.

W rozdziale III. „Wstęp” liczącym nieco ponad 11 stron Autorka zamieściła informacje na temat specyfiki wymagań siedliskowych roślin, zależności pomiędzy występowaniem stresów a produkcją biomasy roślin w aspekcie potencjału plonotwórczego roślin użytkowych. W rozdziale tym Kandydatka wyodrębnia podrozdział 1. Stres u roślin, w którym opisuje rodzaje stresów środowiskowych, mechanizmy umożliwiające roślin odbiór bodźców środowiskowych i zbieranie informacji, które mogą przyczynić się do zmian w metabolizmie roślin adaptacji do zmian środowiskowych, oczywiście w pewnym zakresie tolerancji (są to jony Ca^{2+} , tlenek azotu (NO) i reaktywne formy tlenu (RFT, ang. reactive oxygen species). Doktorantka w zwięzłym i logicznym wywodzie przedstawia, w których procesach metabolicznych głównie biorą udział poszczególne cząsteczki sygnałowe. W podrozdziale 1.1 Stres suszy Autorka przedstawia w skrócie problem zmian klimatycznych, na skutek których spada dostępność wody zwłaszcza w krytycznych fazach dla wzrostu i rozwoju roślin i formowania plonu. Przyznam, że bardzo spodobały mi się odniesienia literaturowe na temat znaczenia wody nie tylko pochodzące z fachowych artykułów naukowych ale również te filozoficzne, łącznie z cytatem z powieści Antoine de Saint-Exupér’ego „Ziemia, planeta ludzi” - „Woda, [...] Nie jesteś niezbędna do życia: jesteś samym życiem”. To w pewnym sensie dowód na holistyczne podejście do problemu braku wody nie tylko w aspekcie stresu u roślin ale znaczenia wody dla wszystkich organizmów żywych. Kandydatka przedstawia

mechanizmy walki roślin ze skutkami suszy które pogrupować można w trzy kategorie: a) produkcji i akumulacji osmoprotektantów, takich jak prolina, cukry rozpuszczalne czy betaina; b) syntezie kwasu abscysynowego (ABA) – hormon odpowiedzialny np. za zamykanie aparatów szparkowych i hamowanie wzrostu roślin, a ponadto za regulacje ekspresji wielu genów na przykład akwaporyn czy metalotionein; c) ograniczeniu negatywnego wpływu reaktywnych form tlenu powstających w odpowiedzi na stres, włączając stres suszy. Kolejny podrozdział 1.2. Wpływ zanieczyszczenia środowiska na wzrost i rozwój roślin w zasadzie przedstawia negatywny wpływ jonów metali ciężkich na rośliny. Z tego powodu nadał bym temu podrozdziałowi nieco zawężony tytuł, bo obecny sugeruje przegląd innych pierwiastków czy związków negatywnie wpływających na rośliny. Natomiast podrozdział ten bardzo trafnie i kompleksowo przedstawia wpływ metali ciężkich na procesy fizjologiczne roślin ale też ich znaczenie dla zdrowia człowieka jako konsumenta produktów rolnych potencjalnie zawierających ponadnormatywne ilości metali ciężkich (niektóre z nich jak cynk czy miedź są w małych ilościach konieczne to prawidłowego przebiegu np. procesów enzymatycznych). Z tej tematyki Pani mgr Wiktoria Konieczna bardzo celnie i sprawnie przechodzi do kolejnego podrozdziału 2. Metalotioneiny, w którym to przedstawiono budowę tych białek o niskiej masie cząsteczkowej i dużej zawartości cysteiny, aminokwasu dość wyjątkowego bo najczęściej konserwowanego aminokwasu w białkach obok glicyny, prolina i tryptofanu. Następnie przedstawiono klasyfikacje metalotionein oraz ich właściwości wynikające z wysokiego udziału cysteiny zawierającej grupy tiolowe (występowanie w miejscach aktywnych enzymów, wiązanie metali ciężkich czy zdolność reakcji z ROS i dzięki temu ochrona przed stresem oksydacyjnym). W podrozdziale 2.1. Funkcje metalotionein w komórkach roślinnych, Autorka w zwięzły sposób przedstawia znaczenie metalotionein w utrzymaniu homeostazy mikroelementów, w procesie wiązania metali ciężkich w komórkach czy reakcjach z reaktywnymi formami tlenu. Poziom ekspresji genów *MT* zmienia się pod wpływem czynników środowiskowych (biotycznych i abiotycznych) oraz zmienia się w różnych fazach rozwojowych roślin i Doktorantka przytacza liczne pozycje literatury gdzie takie zależności wykazano.

W kolejnym podrozdziale 3. Owies zwyczajny przedstawiono syntetycznie znaczenie owsa jako surowca paszowego, ale również jego wzrastające znaczenie w żywieniu człowieka jako gatunku prozdrowotnego polecanego przez dietetyków. Kandydatka umieściła następnie informacje na temat wymagań glebowo-klimatycznych owsa, oraz krótki opis form uprawnych. Znajdujemy w tym rozdziale również informacje na temat genomu owsa jako alloheksaploida. Umieszczenie tego podrozdziału w opracowaniu Kandydatki uważam, za bardzo trafne, gdyż zwraca on uwagę na aplikacyjny charakter badań z powodu obiektu badawczego *Avena sativa* jako ważnej rośliny uprawnej o dużym znaczeniu ekonomicznym. Aplikacyjny aspekt badań podkreślany jest również w kontekście zmian klimatycznych i potrzebny poznania procesów fizjologicznych, czy też na poziomie transkryptomu czy proteomu związanych z reakcją roślin uprawnych na stresy środowiskowe jak susza. Stresy te zagrażają prawidłowemu funkcjonowaniu rośliny i zmniejszają produkcję biomasy i w rezultacie również plon.

Następnie w rozdziale IV. Cel pracy Kandydatka prawidłowo i jasno przedstawiła hipotezę badawczą i cel pracy doktorskiej, ta pierwsza zakłada wpływ metalotionein na procesy związane ze wzrostem i rozwojem roślin oraz na reakcje roślin na stresy środowiskowe abiotyczne i biotyczne.

Doktorantka zaprezentowała cztery cele szczegółowe: 1) Poznanie i scharakteryzowanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych *MT* owsa zwyczajnego; 2) Sprawdzenie udziału *AsMT* we wzroście i rozwoju roślin owsa zwyczajnego; 3) Ustalenie roli *AsMT* w odpowiedzi roślin owsa zwyczajnego na obecność jonów metali ciężkich (Cd i Zn) i grzybów z rodzaju *Trichoderma*; 4) Ocena wpływu stresów suszy i osmotycznego na ekspresję *AsMT* i parametry biochemiczne roślin owsa zwyczajnego. Mam drobną uwagę co do celu nr.1

ponieważ zastosowano tu pewien skrót myślowy w określeniu: „...sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych MT owsa zwyczajnego” skrót MT bez kursywy sugeruje że Kandydatka miała na myśli polipeptydy MT, cel brzmiałby czytelniej gdyby użyto określenia np. „sekwencji nukleotydowych genów *MT* i aminokwasowych metalotonein owsa zwyczajnego”. Oczywiście cel ten jest bardzo czytelnie i wyczerpująco opisywany w kolejnym rozdziale, więc zapewne to uproszczenie wynika z dobrej znajomości tematu badawczego Kandydatki. Natomiast chciałbym wyraźnie zaznaczyć, że cel pracy (oraz cele szczegółowe) koresponduje z tematem pracy, założeniami metodycznymi oraz wnioskami.

Kolejny rozdział V. Wyniki i dyskusja obejmuje 18 stron, przedstawiony w sposób uporządkowany i jasny wykazując zrealizowanie założonego celu. Doktorantka podzieliła opis uzyskanych wyników zgodnie z zakresem merytorycznym eksperymentów poszczególnych publikacji.

Wyniki przedstawione w podrozdziale V.1. Identyfikacja i charakterystyka rodziny genów *AsMT* zawierają wyniki analiz *in silico* sekwencji promotorowych genów *AsMT* pod kątem obecności potencjalnych cis-elementów. Kandydatka w oparciu o analizy *in silico* genomu owsa wykazała obecność 21 genów kodujących MT (*AsMT*). W zidentyfikowanych sekwencjach odnalazła charakterystyczne dla MT motywy bogate w reszty cysteinowe. Na ich podstawie sekwencje zaklasyfikowała do czterech typów roślinnych MT – pięć z nich koduje MT1, dziewięć MT2, trzy MT3 oraz cztery MT4. Autorka podkreśla, że przeprowadzone analizy z dużym prawdopodobieństwem wskazują, że geny *AsMT* są zaangażowane we wzrost i rozwój roślin, a także w odpowiedź rośliny na stropy środowiskowe.

W kolejnym podrozdziale V.2. Udział *AsMT* w kiełkowaniu owsa zwyczajnego Kandydatka przedstawia badania będące wynikiem wcześniejszych analiz *in silico* sugerujących że w promotorach genów *AsMT* typu 1 i 3 obecne są cis-elementy RY-element i GCN4_motif, biorące udział w rozwoju nasion. Ten ciekawy element poznawczy jest zarazem formalnym dowodem na spójność tematyczną i przemyślany układ publikacji Doktorantki w prezentowanym cyklu. Pani mgr Wiktoria Konieczna badała ekspresję czterech genów *AsMT1-4* owsa w kiełkujących ziarniakach i wykazała ich wysoką ekspresję w czasie kiełkowania co sugeruje ich ważną rolę w tym procesie. W podrozdziale V.3. Zaangażowanie *AsMT* w reakcję siewek owsa zwyczajnego na obecność metali ciężkich przedstawiono wyniki badań dotyczące roli *AsMT* w ochronie komórek przed stresem wywołanym Zn i Cd. Doktorantka wykazała iż bakterie *E. coli* transgeniczne zawierające geny *AsMT3* i *AsMT4* lepiej tolerowały obecność jonów Zn i Cd w środowisku, w porównaniu do bakterii z pustym wektorem ekspresyjnym. Ponadto wykazała, że w przypadku bakterii transformowanych wektorem ekspresyjnym niosącym geny *AsMT1* i *AsMT2* tempo wzrostu było na takim samym poziomie jak u bakterii niosących wektor ekspresyjny nie zawierający wstawki (publikacja 4). Kandydatka wraz z zespołem w oparciu o przedstawione wyniki zakłada że *AsMT1* pełni rolę w detoksykacji Cd, a *AsMT2* i *AsMT3* są zaangażowane w utrzymanie homeostazy Zn. Jednakże role te są prawdopodobnie organospecyficzne oraz zależą od etapu rozwoju i/lub czasu trwania stresu (publikacja 3). W podrozdziale 3.1. Ocena zawartości Zn i Cd w *A. sativa* rosnącym w obecności HM i *Trichoderma viride* Kandydatka przedstawia moim zdaniem niezwykle ważne wyniki badań będące dowodem, że obecność grzybów *Trichoderma viride* wpłynęła pozytywnie na biomasę pędów i korzeni oraz liczbę wyprodukowanych nasion owsa w obecności Cd, ale nie wpłynęła na zawartość Zn, Cd i Cu w części nadziemnej roślin. Sugeruje to, że obecność tych grzybów ograniczała negatywny wpływ Cd na rośliny. Fakt ten jest istotny biorąc pod uwagę problem bioakumulacji Cd w łańcuchu pokarmowym, wyniki uzyskane przez Doktorantkę pokazują, że *T. viride* zwiększa wytwarzanie nasion przez rośliny owsa, a jednocześnie nie zwiększa akumulacji Cd w częściach nadziemnych roślin. Ta informacja jest bardzo istotna z formalnego punktu widzenia i bardzo podnosi wartość opracowania Pani mgr Wiktorii Koniecznej, wnosząc kolejny aspekt aplikacyjny. W rozdziale 4. Zaangażowanie *AsMT* w reakcję siewek owsa zwyczajnego na stres osmotyczny i suszy Kandydatka wykazuje zmiany ekspresji *AsMT* roślin pochodzących z hodowli hydroponicznej. Obecność D-mannitolu

powodowała wzrost ekspresji *AsMT1-3* w pędach i *AsMT2-3* w korzeniach owsa zwyczajnego. Natomiast PEG wpłynął na wzrost ekspresji *AsMT2* w korzeniach. Zmiany ekspresji *AsMT1-3* korelowały ze zmianami parametrów biochemicznych, co wskazuje na zaangażowanie *AsMT1-3* w odpowiedź owsa na stres osmotyczny. Autorka wykazała również zmiany w ekspresji genów *AsMT1-3* w doświadczeniu donicowym, czyli w warunkach bardziej zbliżonych do naturalnych.

Rozdział 5. Zmiany parametrów biometrycznych owsa zwyczajnego w reakcji na czynniki abiotyczne, zawiera dwa podrozdziały: 5.1 Metale ciężkie oraz 5.2. Stres osmotyczny i suszy. Kandydatka wraz z zespołem wykazała, że stres wywołany przez PEG i D-mannitol spowodował w siewkach owsa wzrost zawartości ABA, fenoli, cukrów rozpuszczalnych i enzymów antyoksydacyjnych. Natomiast rośliny traktowane Cd lub mieszaniną Zn i Cd miały niższe tempo wzrostu i były znacząco mniejsze od roślin kontrolnych – po 14 dniach hodowli pędy tych roślin były ponad dwukrotnie krótsze w porównaniu do roślin kontrolnych, u roślin po 7 dniach traktowania Cd wzrastała zawartość związków fenolowych. W rozdziale tym Pani mgr Wiktoria Konieczna przedyskutowała bardzo ważną kwestię korelacji między poziomem ekspresji genów *AsMT1-3* a parametrami biochemicznymi roślin owsa poddanych stresom abiotycznym. Kandydatka stwierdziła wysoką pozytywną korelację między ekspresją *AsMT1* i *AsMT2* a całkowitą zawartością związków fenolowych (TPC) i pojemnością antyoksydacyjną (AC), a także między *AsMT3* a pojemnością antyoksydacyjną w pędach owsa. Natomiast w korzeniach, stwierdziła ujemne korelacje ekspresji *AsMT1-3* z całkowitą zawartością związków fenolowych i pojemnością antyoksydacyjną.

Doktorantka podsumowała wyniki badań w formie rozdziału VI. Podsumowanie i wnioski w którym przedstawiła dziewięć punktów, które można pogrupować w następujące obszary: 1. Charakterystyka genów *AsMT1-4*, sekwencje promotorowe. 2. Zmiany poziomu ekspresji genów *AsMT1-4* podczas procesów fizjologicznych (kiełkowanie nasion). 3. Wykazanie zmian w poziomie ekspresji genów *AsMT1-4* pod wpływem stresów abiotycznych: obecności Zn, Cd i mieszaniny Zn i Cd, stresu osmotycznego i stresu suszy. 4. Wykazanie różnic w tempie rozwoju kolonii *E. coli* w warunkach kontrolnych i stresowych (obecność Zn i Cd oraz PEG i D-mannitolu) – analiza funkcjonalna. 5. Wykazanie wpływu stresów abiotycznych na wybrane parametry fizjologiczne i biochemiczne roślin owsa, oraz wykazanie korelacji pomiędzy zmianami ekspresji genów *AsMT1-3* a poziomem ABA i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych.

Wnioski są sformułowane rzetelnie, w pełni uzasadnione i adekwatne do uzyskanych wyników. Recenzowana rozprawa posiada wszystkie elementy określone w Ustawie i została napisana w przejrzysty i prawidłowy pod kątem układu rozdziałów sposób.

Mam jednak pewne uwagi i sugestie dotyczące rozdziału VI. Podsumowanie i wnioski. Uwagi te będą zarazem moimi pytaniami do ewentualnego przedyskutowania i ustosunkowania się przez Doktorantkę. Jak już wspominałem w poprzednich rozdziałach recenzji, opracowanie ma duży potencjał aplikacyjny. W jakim stopniu uzyskane wyniki mogą wspomagać prace hodowcy w następujących obszarach:

1. Generowanie zmienności na drodze transgenezy oraz edycji genomu.
2. Jakie metody zaproponowała by Pani w celu wprowadzenia cechy zwiększonej odporności na stesy abiotyczne do form hodowlanych.
3. Czy wykorzystanie mikroorganizmów promujących wzrost mogłoby zwiększyć odporność na stesy środowiskowe (przykłady, również u innych gatunków)

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej to VII. Literatura zawierający 243 pozycje z czego 95% to literatura anglojęzyczna, ściśle związana z przedmiotem rozprawy, to zdecydowanie kolejny element wyróżniający opracowanie Doktorantki. Następny rozdział VIII. Załączniki, Załącznik 1-4. Publikacja I-IV, Załącznik 5. Dorobek naukowy – 1. Wykaz publikacji niebędących podstawą rozprawy doktorskiej, 2. Inne osiągnięcia naukowe, 2.1. Uzyskane granty, 2.2. Udział w realizacji projektów, 2.3. Konferencje naukowe, 2.4. Staże naukowe.

Do pracy nie załączono oświadczeń Doktorantki oraz współautorów dotyczących ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych. Tu mała krytyczna uwaga, gdyż pomocne byłoby zamieszczenie sumarycznej informacji na temat udziału Doktorantki w powstaniu poszczególnych prac. Oczywiście informacje takie możemy znaleźć w dołączonych publikacjach (rozdział VIII. Załączniki), w związku z tym w ocenie formalnej udziału Pani mgr Wiktorii Koniecznej opieram się na podrozdziałach poszczególnych publikacji „Autor contributions”. We wszystkich publikacjach będących podstawą do napisania autoreferatu Kandydatka jest pierwszym autorem. Jej udział polegał na współautorstwie w opracowaniu koncepcji badań (publikacje 2,3), następnie w szerokim ujęciu wykonaniu technicznym (metodyka, część eksperymentalna, część graficzna) i kontroli merytorycznej, udziale w napisaniu manuskryptu oraz korekcie po recenzjach (publikacje 1-4). To istotne informacje z formalnego punktu widzenia, na podstawie których wnioskuję o wiodącym udziale Doktorantki w powstaniu publikacji wykorzystanych do przygotowania rozprawy doktorskiej. W rozprawie brak wydzielonego rozdziału metody, ale studiując poszczególne publikacje można zauważyć iż warsztat metodyczny był bardzo zaawansowany (analiza transkryptomyczna, proteomiczna w połączeniu z pomiarami parametrów fizjologicznych i biochemicznych, badanie korelacji pomiędzy nimi). Tak rozbudowana metodyka świadczy o szerokim warsztacie metodologicznym Pani mgr Wiktorii Koniecznej, ale również jest dowodem iż kolejne etapy badań wynikały w logiczny sposób z pytań, które pozostawiały poprzednie wyniki badań, to kolejne elementy wyróżniające pracę.

Wniosek końcowy

Praca doktorska Pani mgr Wiktorii Koniecznej została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, a wartość jej wyników oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki wnoszą nowe oryginalne wartości poznawcze w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Autorka posiada umiejętności wykorzystania zaawansowanych metod molekularnych i właściwego ich zastosowania w badaniu roli metalotionein w rozwoju bardzo ważnej rośliny użytkowej jaką jest owies oraz wpływie tej grupy związków na procesy fizjologiczne i reakcje obronne w celu niwelowania abiotycznych stresów środowiskowych. Doktorantka wykazała się również umiejętnościami właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Prezentowane wyniki badań spełniają również ważny formalny wymóg spójności tematycznej, gdyż oscylują wokół analiz molekularnych i próbie wyjaśnienia mechanizmów związanych z reakcją owsa na abiotyczne stresy środowiskowe. Poziom edytorski rozprawy jak również jej styl, poprawność, przejrzystość i jednoznaczność oceniam pozytywnie.

Praca doktorska Pani mgr Wiktorii Koniecznej spełnia zatem warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2021 r., poz. 478) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową prezentowanej rozprawy oraz potencjalne znaczenie aplikacyjne prezentowanych wyników wnioskuję o wyróżnienie dysertacji. Uzasadnienie zostało dołączone do recenzji w osobnym wniosku do prof. dr hab. Justyny Rogalskiej, Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.