

Lublin, 21.03.2016 r.

**Prof. dr hab. Aleksandra Badora**

Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej,

Zakład Kształtowania Jakości i Standaryzacji Surowców Roślinnych

Wydział Agrobiotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

e-mail: [aleksandra.badora@up.lublin.pl](mailto:aleksandra.badora@up.lublin.pl)

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Szerement

pt. „*Wpływ kadmu i cynku na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne korzeni i ścian komórkowych roślin z rodziny Apiaceae L*”

### 1. Wprowadzenie

Z punktu widzenia medycyny takie metale, jak ołów, kadm, arsen, czy rtęć są substancjami trującymi. Trucizny te dostają się do organizmu człowieka lub zwierząt przez przewód pokarmowy i oddechowy. Natomiast pierwiastek taki, jak cynk, bierze udział w produkcji ważnych enzymów, które odgrywają istotną rolę w setkach reakcji chemicznych, niezbędnych dla zachowania zdrowia i podtrzymania życia. Jeśli w diecie brakuje wystarczającej ilości cynku lub jakichkolwiek innych pierwiastków śladowych, toksyczne metale ciężkie mogą zająć ich miejsce. Committee on Dietary Allowances w Stanach Zjednoczonych ustaliło, że RDA (Recommended Daily Amount – zalecana dzienna dawka) cynku wynosi: 12 mg dla kobiet i 15 mg dla mężczyzn. Największe znaczenie jako źródło metali śladowych ma konsumpcja produktów pochodzenia roślinnego. Tą drogą jest pobierane przez organizm ludzki 60 - 70% różnych metali.

Rośliny pobierają metale ciężkie przez korzenie i liście. Organy te są najbardziej narażone na skażenie, ponieważ metale ciężkie (oprócz kadmu) na ogół nie przemieszczają się w roślinach, ale kumulują się w miejscach, przez które wniknęły. Duże znaczenie ma również gatunek i stadium rozwojowe rośliny.

W ciągu ostatnich lat wzrosła różnorodność spożywanych warzyw. **Obok tradycyjnych** i powszechnie dostępnych jak: marchew, pietruszka, **seler**, cebula, burak czerwony, ogórki, coraz częściej sięgamy po te mniej znane: bakłażany, brokuły, skorzonę, kabaczkę, cukinię, dynię. Do **mniej znanych i zapomnianych** warzyw należy **pasternak**. Był on, w dawnej Polsce, przed rozpowszechnieniem ziemniaków, najczęściej uprawianym warzywem.

Roślina pasternak odznacza się największą wartością odżywczą wśród warzyw korzeniowych. Jest niesamowicie odporny na wszelkie niedogodności klimatyczno-pogodowe. Jest bardzo łatwy w uprawie, plenny i bardzo dobrze się przechowuje. Natomiast bez selera nie obejdzie się żadna dieta odchudzająca ani oczyszczająca. Kochają go gwiazdy Hollywood. Korzeń selera dodaje smaku zupie i może zastąpić sól. Seler naciowy świetnie

sprawdza się jako składnik różnego rodzaju sałatek. Wszystkie warzywa mają mało kalorii, lecz seler wieździe tu prym.

Należy zatem stwierdzić, że w celu zagwarantowania wysokiej jakości, wartości odżywczej oraz bezpieczeństwa różnorodnych innowacyjnych diet, które mają na celu polepszenie jakości życia człowieka, konieczne są coraz to nowe, kompleksowe badania fizykochemicznych, chemicznych i biochemicznych reakcji korzeni roślin oraz ścian komórkowych wyizolowanych z korzeni na stres związany z obecnością metali śladowych, zarówno w nadmiarze, jak i w niedoborze.

**W kontekście powyższych rozważań należy podkreślić, że wybór tematyki badań przez Panią mgr Justynę Szerement wpisuje się w globalne trendy związane z innowacyjną poprawą jakości życia.** Doktorantka założyła w hipotezie badawczej, że zmiany morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne, zachodzące w korzeniach pod wpływem czynników stresogennych, będą również wpływały na zmiany właściwości powierzchniowych korzeni. Założyła także, że w warunkach stresowych modyfikacja ścian komórkowych będzie skorelowana z wyżej badanymi właściwościami. **Zrozumienie tych mechanizmów otwiera, według mnie, nowe drogi uprawy warzyw w warunkach kontrolowanych, a nawet na sztucznych podłożach.**

## 2. Ocena merytoryczna

Na samym początku Doktorantka wprowadza Czytelnika w opisywane w pracy zagadnienia poprzez krótki, ale treściwy rozdział 1 „**Wstęp i cel pracy**”, w którym uzasadnia wybór tematyki badawczej, pierwiastków śladowych (zbędnego Cd oraz potrzebnego Zn), a także wybór roślin (seler i pasternak). Uzasadnia także, dlaczego konieczne i zarazem nowatorskie jest kompleksowe przeanalizowanie zmian fizykochemicznych i biochemicznych właściwości korzeni i ścian komórkowych tych atrakcyjnych dietetycznie roślin w warunkach stresowych.

Doktorantka prawidłowo postawiła hipotezę badawczą oraz właściwie podała cele badań, które posłużyły do sprawdzenia założonej hipotezy. Dwa główne cele badawcze zostały uszczegółowione i w pełni obrazują etapy zaplanowanych badań, uwypuklając jednocześnie, że Pani mgr Justyna Szerement podjęła się zgłębienia kontrowersyjnych opinii dotyczących roli ściany komórkowej w detoksykacji metali ciężkich. Bowiem jedni autorzy uważają, że jej tolerancyjna rola jest niewielka ze względu na ograniczoną liczbę miejsc adsorpcji kationów, natomiast inni autorzy sugerują, że skład i właściwości ściany komórkowej są modyfikowane w warunkach stresu, co powinno zwiększać jej rolę w tolerancji na stres.

**W założonych celach Doktorantka wprowadza element nowości, gdyż Jej próba opisu reakcji badanych roślin na stres w kontekście zmian właściwości powierzchniowych ściany komórkowej, należy do mało rozpoznanych.**

W rozdziale 2 „**Materiał badawczy i opis doświadczenia**” Doktorantka w sposób szczegółowy scharakteryzowała wybrany do analiz materiał badawczy, uzasadniając, że kryterium doboru w/w gatunków było ich różne wymaganie co do pH - seler (*Apium graveolens L.*) wrażliwy na zakwaszenie i pasternak (*Pastinaca sativa L.*) odporny - przedstawiła także walory odżywcze obydwu roślin. Opis schematu badań został przedstawiony przez Doktorantkę w trzech etapach:

- a) Etap I – pozyskanie materiału badawczego.

- b) Etap II – dotyczył opisu, co zbadano w badaniach biometrycznych, chemicznych i fizykochemicznych części nadziemnych i korzeni roślin.
- c) Etap III – wyizolowanie ściany komórkowej z korzeni badanych roślin i jej charakterystyki strukturalne i biochemiczne.

Doktorantka prawidłowo i bardzo szczegółowo opisała założenie doświadczeń hydroponicznych według określonych w literaturze standardów, zmodyfikowanych na potrzeby niniejszych badań. W częściach nadziemnych i w korzeniach roślin oznaczyła zawartości mikroelementów – Zn, Fe, Mn, Cu oraz makroelementów – Ca, Mg, K, P, N, S, a także zawartość Cd. Określiła też suchą masę obydwu części roślin oraz długość i grubość korzeni.

Badania fizykochemiczne korzeni roślin obejmowały wyznaczenie pozornej powierzchni właściwej (S) metodą adsorpcji-desorpcji pary wodnej. W oparciu o metodę miareczkowania potencjometrycznego wyznaczyła całkowity ładunek powierzchniowy ( $Q_{tot.}$ ) i całkowita pojemność wymiany kationów (CEC), a także funkcję rozkładu stałych dysocjacji charakteryzującą powierzchniowe grupy funkcyjne o różnej mocy kwasowej, a więc generujące różny ładunek powierzchniowy oraz średnie ze stałych dysocjacji ( $pK_{app}$  śr.), przedstawiające ogólne zmiany kwasowości powierzchni. Z wielkości pozornej powierzchni właściwej (S) i całkowitej pojemności wymiany kationów (CEC) Doktorantka wyliczyła gęstość ładunku na powierzchni (SCD). Przedstawione powyżej wielkości w fizykochemii i fizjologii roślin charakteryzują najważniejsze funkcje korzenia (pobieranie i transport wody i jonów (zwłaszcza bierny i bliski).

W charakterystykach strukturalnych i biochemicznych Doktorantka skupiła się na oznaczeniu zawartości pektyn i poszczególnych frakcji pektyn (w różnym stopniu związanych ze ścianą komórkową, tj. WSP – pektyny luźno związane, CSP – wzbogacone w wiązanie jonowe i DASP – wzbogacone w wiązanie kowalencyjne) oraz na stopniu ich metylacji (DM). Oznaczono także enzym metyloesterazy (PME), który determinuje proces demetylacji pektyn, a więc ilość anionu karboksylowego.

**Zarówno procedura przeprowadzenia doświadczeń, jak i etapów laboratoryjnych badań, została pokazana prawidłowo. W pracy zastosowano profesjonalne metody i instrumenty badawcze, które szczegółowo zostały opisane w rozdziale 3 „Metody pomiarowe”. Doktorantka pieczołowicie i klarownie przedstawiła wymagane w metodach równania i obliczenia. Zastosowała także obliczenia statystyczne pomiędzy otrzymanymi wielkościami, korzystając z programu Statistica version 10.0 (StatSoft INC.). Zostały obliczone m.in.: współczynniki korelacji  $R$  i determinacji ( $R^2$ ), a także testowano jednoczynnikową analizę wariancji F – test Fisher-Snedecor oraz test Tukeya (0,05).**

**Należy tu podkreślić rozległość i różnorodność użytych metod i technik badawczych, co wskazuje dobitnie, że Pani mgr Justyna Szerement opanowała w bardzo dobrym stopniu procedury badawcze związane z prezentowanymi zagadnieniami. Świadczy o tym także zrozumiały opis wszystkich tych metod.**

Przechodząc do następnych rozdziałów 4, 5, 6, proponuję w przyszłości opatrzyć je wspólnym tytułem: „Wyniki badań i dyskusja” i w ramach tego rozdziału umieścić istniejące rozdziały i podrozdziały. Ta część rozprawy doktorskiej jest najbardziej obszerna, mieści się bowiem na 57 stronach. Doktorantka wykazała w nich redukcyjny wpływ nadmiarów czynników stresogennych (zarówno Cd, jak i Zn) na długość i grubość korzeni badanych roślin, przy czym doktorantka powiązała to z zahamowaniem pobierania wody i substancji pokarmowych przez rośliny w obecności metali ciężkich, a także z uwarunkowaniami genetycznymi. Czynniki stresogenne spowodowały także zmiany w zawartości badanych mikro- i makroelementów, przy czym były to zmiany zróżnicowane w zależności od dawki toksycznego metalu i gatunku rośliny **Badania Pani mgr Justyny**

Szerement pokazały także pośrednio ciekawe oddziaływania synergistyczne i antagonistyczne pomiędzy Zn, Cd oraz pozostałymi badanymi pierwiastkami w obydwu roślinach (tabele 2 i 3). Moim zdaniem są to bardzo ważne wskaźniki jakości badanych roślin, uprawianych w warunkach stresowych. Poddaję te zagadnienia dla Doktorantki do dyskusji na obronie. Oczywiście zmiany współczynników tolerancji (Ti) i translokacji (IT) oraz zmiany biomasy roślinnej pod wpływem stresogennych czynników są również bardzo ważnymi wskaźnikami jakości, wykazanymi w niniejszej pracy.

**Do istotnych elementów nowatorskich niniejszej pracy należy to, że:**

- a) Doktorantka potwierdziła w swoich badaniach hipotezę, iż „niska zawartość pektyn i/lub wysoki stopień ich metylacji przyczyniają się do odporności badanych roślin (większe w przypadku pasternaka) na badane metale ciężkie. Zmiany biochemiczne ścian komórkowych miały także wpływ, w badaniach Pani mgr Justyny Szerement, na właściwości fizykochemiczne korzeni, a te determinują pobieranie wody i składników odżywczych.
- b) Pozorna powierzchnia właściwą (S) korzeni i całkowita pojemność wymiany kationów (CEC), a także gęstość ładunku powierzchniowego (SCD), wykazały tendencje spadkowe pod wpływem stresów związanych z obecnością różnych dawek metali ciężkich (Cd i Zn).

**Reasumując wyniki badań i dyskusję**, przedstawione przez Panią mgr Justynę Szerement, należy stwierdzić, że są one napisane zrozumiale i dostarczają cennych informacji z zakresu reakcji roślin na stres oraz z zakresu fizykochemii roślin. Szczególnie cennych informacji dostarczyły badania fizykochemiczne ścian komórkowych, które po raz pierwszy w takim ujęciu zostały przedstawione w niniejszej rozprawie. Przy czym odmienne reakcje oraz różny stopień korelacji i determinacji badanych paramentów fizykochemicznych z charakterystykami ścian komórkowych w obecności metali ciężkich, świadczą o genetycznej determinacji roślin, będących w stresie.

**Rozdział 7 „Podsumowanie i wnioski” na 9 stronach podsumowuje najważniejsze wyniki badań oraz przedstawia 5 prawidłowo wysuniętych wniosków.** Należy tu dodać, że wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej mają przede wszystkim charakter poznawczy, wnoszą bowiem cenne informacje na temat wiedzy z zakresu fizykochemii roślin i ich reakcji na czynniki stresowe związane z obecnością metali ciężkich. Nie mniej jednak mogą służyć jako analogia dla badań reakcji roślin na stres związany z obecnością np. Al mobilnego jako czynnika stresogennego. **Być może Pani mgr Justyna Szerement ma na ten temat jakiś swój pogląd?**

**Rozdział 8 „Literatura”** zawiera 201 pozycji najnowszej literatury. Przy czym 80% stanowi literatura zagraniczna i w języku angielskim.

### **3. Ocena formalna pracy**

Rozprawa doktorska pt. *„Wpływ kadmu i cynku na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne korzeni i ścian komórkowych roślin z rodziny Apiaceae L”* autorstwa Pani mgr Justyny Szerement jest 105-stronicowym opracowaniem podzielonym na następujące zasadnicze części: „1. Wstęp i cel pracy”, „2. Materiał badawczy i opis doświadczenia”, „3. Metody pomiarowe”, „Rozdziały 4, 5, 6”, które według mnie powinny być ujęte pod wspólnym tytułem „Wyniki badań i dyskusja”, następny rozdział to „7. Podsumowanie i

wnioski” oraz „8. Literatura”. Dodatkowo w pracy zamieszczone są streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów i oznaczeń, które zostały użyte w tekście.

W pracy znajdują się 20 tabel i 24 rysunki, które są przedstawione starannie, przejrzystie i czytelnie.

Spis literatury, zacytowanej w niniejszej rozprawie doktorskiej, obejmuje 201 pozycji, w tym aż 80% to literatura obcojęzyczna.

**Należy podkreślić, że niniejsza rozprawa doktorska zawiera wszystkie niezbędne rozdziały wymagane w takich opracowaniach.** Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Szerement spełnia zatem wymogi formalne, a Autorka jawi się jako osoba niezwykle pracowita, skrupulatna i dokładna oraz o dużej znajomości literatury światowej związanej z tematem niniejszej pracy.

#### 4. Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Szerement pt. „*Wpływ kadmu i cynku na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne korzeni i ścian komórkowych roślin z rodziny Apiaceae L*” stanowi: (i) oryginalne rozwiązanie problemu naukowego z elementami nowatorskimi włącznie, (ii) udowadnia szeroką wiedzę Doktorantki w prezentowanej przez nią dziedzinie naukowej.

Duża ilość wyników sprawnie i przejrzystie zaprezentowana i zinterpretowana oraz ponadprzeciętna ilość pozycji anglojęzycznej literatury, świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr Justynę Szerement.

**Należy dodatkowo podkreślić, że wysoki poziom niniejszej pracy doktorskiej w zakresie wiedzy teoretyczno-laboratoryjnej znakomicie przekłada się na krajowe, a nawet globalne znaczenie otrzymanych wyników badań.** Znajomość bowiem mechanizmów reakcji roślin należących do tej samej rodziny na stresogenne czynniki związane z obecnością metali śladowych, może przyczynić się do lepszego zrozumienia jakości i wartości odżywczej nie tylko roślin znanych, ale także zapomnianych, a nabierających coraz większego znaczenia w dietach nowej generacji oraz w produkcji szklarniowej i na sztucznych podłożach.

Praca spełnia ponadto wszelkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. **Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie Panią mgr Justynę Szerement do dalszych czynności związanych z przewodem doktorskim i wnoszę jednocześnie o wyróżnienie niniejszej pracy i jej Autorkę stosowną nagrodą.**

Lublin, 21 marca 2016 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Badora

